



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA

**Uso di tecniche elettrochimiche transienti per ottenere
dati termodinamici e cinetici su complessi di Fe(III) con
1,6-dimetil-4-idrossi-3-piridincarbossilato e 2-metil-4-
idrossi-3-piridincarbossilato, utilizzabili nella terapia di
chelazione.**

RELATORE: PROF. PAOLO PASTORE

CONTRORELATORE: DOTT.SSA LAURA ORIAN

LAUREANDO: MORENO MARCON

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

*“La teoria è quando si sa tutto e niente funziona.
La pratica è quando tutto funziona e nessuno sa il perché.*

*Noi abbiamo messo insieme la teoria e la pratica:
non c'è niente che funzioni... e nessuno sa il perché!”*

(Albert Einstein)

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 Farmaci chelanti per Fe(III) e Al(III)	1
1.2 Acidi idrossi-piridin-carbossilici	3
1.3 Proprietà acide degli acidi 4-idrossi-3-piridincarbossilici	7
1.4 Il ferro	11
1.5 Speciazione del ferro in soluzione acquosa	12
1.6 Formazione di complessi tra Fe(III) ed un legante	13
1.7 Speciazione del Fe(III) in soluzione acquosa: aspetti cinetici	14
1.8 Biochimica del ferro	15
1.9 Patologie provocate da bioaccumulo di ferro	16
1.10 Meccanismi molecolari della tossicità del ferro	17
2. Scopo della tesi	19
3. Reagenti e strumentazione	21
3.1 Reagenti	21
3.2 Strumentazione	21
3.3 Preparazione delle soluzioni	22
3.4 Misure voltammetriche	23
4. Studio voltammetrico di Fe(III)	25
4.1 Effetto della concentrazione di Fe(III)	25
4.2 Effetto del pH	26
4.3 Effetto dell'elettrolita di supporto	27
4.4 Determinazione del coefficiente di diffusione	31
4.5 Determinazione di k^0 da voltammetria ciclica	34
4.6 Determinazione di α ed E^0 mediante voltammetria idrodinamica	36

5. Studio voltammetrico dei complessi del Fe(III)	
con 16M4H3P e 2M4H3P	41
5.1 Forza dei leganti	41
5.2 Scelta delle condizioni	43
5.3 Determinazione di parametri termodinamici e cinetici del sistema Fe(III)/ 16M4H3P	45
5.3.1 Effetto della concentrazione di legante sulle voltammetrie	45
5.3.2 Caratterizzazione delle curve sperimentali : risoluzione di un sistema di equazioni	49
5.3.3 Caratterizzazione delle curve sperimentali : approccio matematico- empirico	54
5.3.4 Costanti termodinamiche da stimare	55
5.4 Determinazione di parametri termodinamici e cinetici del sistema Fe(III)/ 2M4H3P	61
6. Conclusioni	67
<i>Ringraziamenti</i>	69

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Farmaci chelanti per Fe(III) e Al(III)

Per curare intossicazioni acute e croniche dovute all'eccesso di ioni metallici, la sola terapia risultata efficace è la così detta terapia per chelazione (chelation therapy). Essa consiste nel somministrare un farmaco chelante, cioè una sostanza in grado di legare selettivamente il metallo incriminato e permetterne l'espulsione dall'organismo. I farmaci chelanti usati per il Fe(III) e Al(III) sono il deferiprone (L1) e/o la deferossamina (DFO) (figura 1.1).

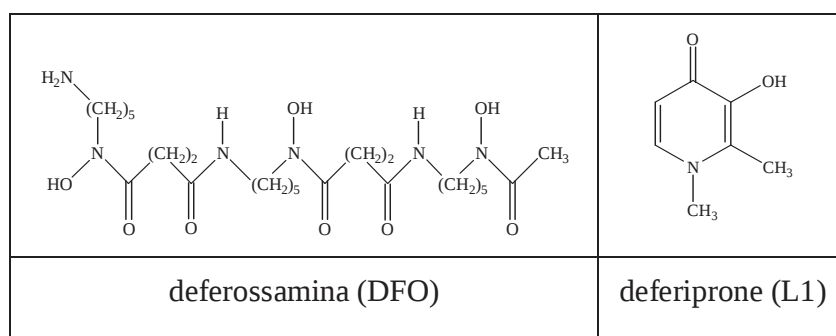
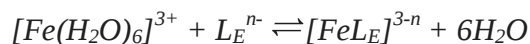
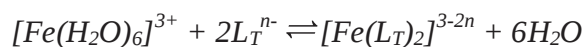
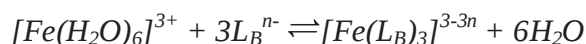


Figura 1.1: Leganti usati nella terapia per chelazione: deferossamina (DFO) e deferiprone (L1)

Perché una molecola si possa definire un buon chelante deve presentare particolari caratteristiche; queste sono molteplici e spesso contrastanti tra loro. Un chelante ideale dovrebbe presentare innanzitutto specificità ed affinità per il metallo d'interesse, in quanto deve essere competitivo con i leganti normalmente presenti nell'ambiente fisiologico ed essere in grado di sottrarre il metallo dagli organi bersaglio, senza perturbare i normali processi biologici dell'organismo che coinvolgono altri ioni essenziali; deve essere sufficientemente idrofilico per agevolare il trasporto nel plasma, ma allo stesso tempo sufficientemente idrofobico per poter attraversare le membrane

cellulari e agire nei tessuti. Queste proprietà sono importanti anche per evitare la ridistribuzione del metallo nei tessuti, che potrebbe provocare l'aumento della tossicità. Vi sono inoltre caratteristiche non propriamente chimiche, quali i contenuti effetti collaterali, la facilità e la frequenza di somministrazione, i bassi costi di produzione^{1, 2}. Le molecole leganti possono essere classificate strutturalmente in base al loro numero di atomi donatori e per metalli potenzialmente tossici, quali Fe(III) e Al(III), la giusta coordinazione si raggiunge tramite 6 atomi donatori, che si dispongono in una geometria ottaedrica attorno al centro metallico. La stabilità termodinamica dei complessi, a parità di affinità di legame tra legante e metallo, risulta massima per i leganti esadentati (per fattori entropici). Le reazioni di formazione dei complessi con leganti bidentati (L_B), tridentati (L_T) ed esadentati (L_E) sono:



Le molecole tridentate e bidentate tuttavia possono presentare un'attività per via orale migliore delle esadentate, possedendo una massa molecolare sufficientemente bassa per un buon assorbimento gastrointestinale; generalmente il valore limite di massa molecolare, al di sopra della quale l'assorbimento gastrointestinale risulta limitato o assente, è intorno a 400 Dalton³. Le molecole bidentate sono a loro volta preferibili rispetto alle tridentate, dato che possono più facilmente formare complessi neutri a pH fisiologico (anche se poi tale proprietà dipende fortemente dal tipo di legante), hanno una minore facilità a formare complessi polimerici, insolubili e potenzialmente tossici. Leganti azotati tridentati (con gruppi funzionali piridinici, amminici, imminici, ecc.)

¹ P. M. May; R. A. Bulman, *Progress in Medicinal Chemistry*, **20**, 225–336, 1983.

² C. Hider; R. Choudhury, *Acta haematology*, **95**, 6–12, 1996.

presentano, in genere, una notevole affinità verso ioni metallici aventi stato di ossidazione (II), quali Cu(II) e Zn(II), cioè verso un'ampia serie di ioni metallici essenziali. Per questo motivo possono interferire con la biochimica di tali elementi e causare effetti tossici rilevanti in seguito alla loro assunzione. Va anche rimarcato che l'affinità dell'azoto nei confronti dello stato d'ossidazione 2 del ferro favorisce le reazioni di ossidoriduzione che portano alla formazione dei radicali liberi e quindi ad effetti tossici collaterali; tali reazioni sono promosse anche da complessi coordinativamente insaturi.

1.2 Acidi idrossi-piridin-carbossilici

Questo lavoro di tesi s'inserisce in un progetto di ricerca che prende in considerazione una classe di leganti bidentati finora poco considerati in letteratura, gli acidi idrossipiridincarbossilici, come nuovi potenziali farmaci chelanti per il Fe(III) e per l'Al(III). I composti più semplici (non sostituiti all'anello) che possono essere presi in esame, cioè i possibili isomeri nei quali i gruppi chelanti (fenolico e carbossilico) sono in posizione adiacente, sono rappresentati in figura 1.2:

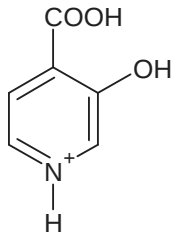
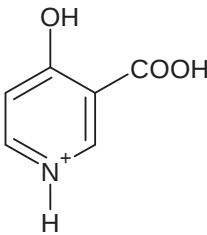
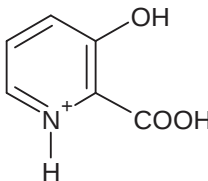
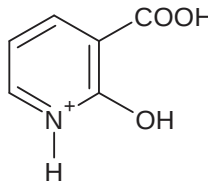
			
3H4P	4H3P	3H2P	2H3P

Figura 1.2 : Acidi 3 – idrossi – 4 – piridincarbossilico (3H4P), 4 – idrossi – 3 – piridincarbossilico (4H3P), 3 – idrossi – 2 – piridincarbossilico (3H2P), 2 – idrossi – 3 – piridincarbossilico (2H3P).

³A. Gaeta ; R. C. Hider, *British Journal of Pharmacology*, **146**, 1041–1059, 2005.

Il fatto che i due sostituenti siano in posizione orto l'uno rispetto all'altro è un requisito essenziale per la formazione di un anello chelato a sei termini (con due gruppi funzionali dotati di buona affinità per i metalli d'interesse e quindi per la formazione di complessi metallici stabili). Studi precedentemente condotti sui catecoli, idrossipiridoni e idrossipironi, oltre che sull'acido salicilico, mostrano come la presenza dell'azoto sull'anello sia essenziale per diminuire l'effetto competitivo del protone in soluzione acquosa, aumentando l'affinità della molecola nei confronti del metallo⁴ rispetto ai corrispondenti derivati benzenici. Oltre ad avere i requisiti strutturali necessari per la formazione di complessi forti, gli acidi idrossipiridincarbossilici presentano alcuni vantaggi, per esempio la bassa massa molecolare, che, come già citato, è essenziale per l'efficacia dell'assunzione orale. Studi recentemente condotti sulla formazione di complessi tra Zn(II) e 3H2P e 2H3P⁵ dimostrano che questa classe di composti non dovrebbe interferire con la biochimica dello zinco e di altri ioni essenziali durante un eventuale regime di terapia per chelazione. Un ulteriore vantaggio potenziale è che la tossicità intrinseca di tali molecole è probabilmente minima. Infatti, 3H4P è già stato testato in passato come possibile antinfiammatorio e antieritemico in sostituzione all'aspirina, e non ha dimostrato alcun effetto collaterale per dosi di 80 mg/kg⁶; 4H3P è stato proposto come antireumatico e antiflogistico⁷; per quest'ultimo in letteratura è riportata la dose letale per il topo: LD₅₀ > 1000 mg/kg. Un altro dato incoraggiante desumibile dalla letteratura medica è costituito dal fatto che l'acido 4-piridossico (figura 1.3), il metabolita principale del piridossolo (vitamina B6), strutturalmente molto simile agli acidi studiati, non presenta effetti tossici, e a differenza del deferiprone non subisce la coniugazione con il glucoronato alla funzione 3-ossidrilica nell'organismo.

⁴ R. C. Scarrow; P. E. Riley et al., *Inorg. Chem.*, **24**, 954-967, 1985.

⁵ V. B. Di Marco, R. A. Yokel, H. Li, A. Tapparo, G. G. Bombi, *Chimica Acta*, **357**, 3753-3758, 2004.

⁶ W. O. Foye; J. M. Kauffman, *Chim. Ther.*, **2**, 462, 1967.

⁷ H. Tendeloo; F. Broekman; V. Stroes; J. Siemelink, *Neth. Appl.* **70** (11), 749, 1972.

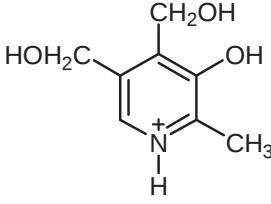
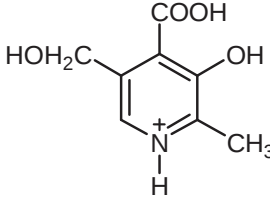
	
piridossolo	acido 4-piridossico

Figura 1.3 : Struttura del piridossolo (vitamina B6) e del suo metabolita, l'acido 4-piridossico

Lo studio della formazione di complessi tra Fe(III) e Al(III) e le molecole mostrate in figura ha dimostrato che i derivati sostituiti in posizione 2 e 3 dell'anello formano complessi meno stabili rispetto ai derivati sostituiti in 3 e 4 ^{8,9,10,11}. Un effetto analogo era stato osservato anche per gli idrossipiridinoni, ed era stato attribuito all'effetto di destabilizzazione del complesso indotto dalla repulsione tra il centro metallico e l'atomo d'azoto carico positivamente a pH acidi: nel caso dei complessi di 3H2P e 2H3P, lo ione metallico e l'atomo di azoto risultano spazialmente più vicini tra di loro, che non nel caso dei complessi di 3H4P e 4H3P. Per tale motivo, i derivati 2,3 sono stati abbandonati. Tuttavia, anche la stabilità dei complessi formati tra i derivati 3,4 e dei due ioni metallici di interesse seppur elevata, è ancora decisamente inferiore a quella del L1 ^{10,11}.

Per quanto riguarda gli studi di elettrochimica sugli acidi idrossipiridincarbossilici essi hanno riguardato soprattutto i derivati di 3H4P e in particolare l'acido 2-metil-3 – idrossi – 4 – piridincarbossilico (2M3H4P) ^{12,13}. Il meccanismo di ossidazione proposto coinvolge due siti di ossidazione della molecola a seconda che il gruppo ossidrilico della molecola sia protonato o meno (analogamente a quelli, noti, del fenolo e dell'acido salicilico):

⁸ V. B. Di Marco; A. Tapparo; G. G. Bombi, *Ann. Chim. (Rome)*, **89**, 535-546, 1999

⁹ V. B. Di Marco; A. Tapparo; G. G. Bombi, *Annali di Chimica*, **91**, 595-603, 2001

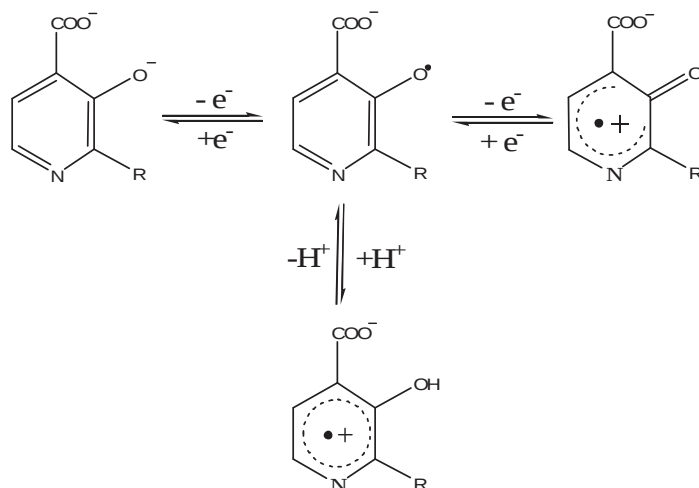
¹⁰ V. B. Di Marco; R. A. Yokel; M. G. Ferlin; A. Tapparo; G. G. Bombi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **10**, 2648-2655, 2002

¹¹ V. B. Di Marco, A. Tapparo, A. Dolmella, G. G. Bombi, *Inorg. Chim. Acta*, **357**, 135-142, 2004.

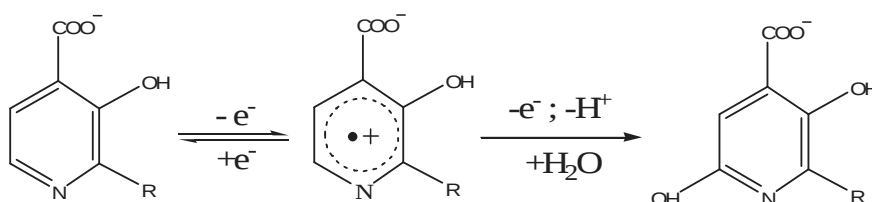
¹² Dean A., Di Marco V., Badocco D., Pastore P., *Dalton Trans.*, **13**, 1689, 2008

¹³ Lovato A., "Studio del comportamento voltammetrico dell'acido 2-metil-3-idrossi-4-piridincarbossilico e dell'acido 2-etil-3-idrossi-4-piridincarbossilico e dei loro complessi con Fe(II) e Fe(III)", tesi di laurea, università di Padova, 2007.

- a pH maggiori di $pK_{a,3}$:



- A pH minori di $pK_{a,3}$:



Per quanto concerne i complessi Fe(III)-2M3H4P si è seguita la speciazione a vari pH e con l'ausilio della voltammetria idrodinamica e diffusiva. A $pH = 5$ il rapporto stechiometrico Fe(III) : 2M3H4P è di 1,19 : 3 mentre a $pH = 2$ è di 3 : 2,5 molto vicini ai valori ottenuti per via potenziometrica. Inoltre, in base agli $E^{0'}$ calcolati delle varie specie si notava che non esistono delle specie capaci di effettuare “cicli redox” al pH fisiologico, in accordo con Merkofer¹⁴.

Per quanto riguarda 4H3P e i suoi derivati, questi presentano voltammogrammi nei quali non è riconoscibile una chiara onda a pH acidi¹⁵, probabilmente per il fatto che in queste

¹⁴ Merkofer M., Kissner R., Hider R.C., et al, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 1263, 2006

¹⁵ Pes L., “Studio del comportamento voltammetrico degli acidi idrossipiridincarbossilici e dei loro complessi con Fe(III)”, tesi di laurea, università di Padova, 2007.

condizioni esistono in due forme tautomeriche, nelle quali appare chiaramente la perdita dell'aromaticità (figura 1.4):

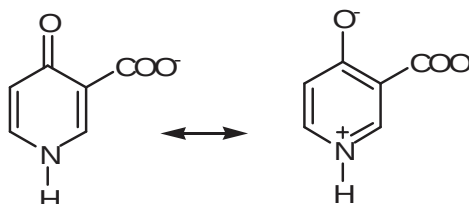


Figura 1.4 : Equilibrio tautomerico degli acidi 4-idrossi-3-piridincarbossilici

Nonostante ciò, i complessi Fe(III)-4H3P sono elettroattivi e il loro comportamento a varie condizioni non è mai stato valutato e analizzato.

1.3 Proprietà acide degli acidi 4-idrossi-3-piridincarbossilici

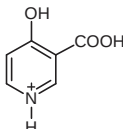
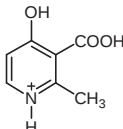
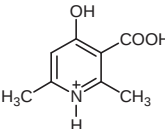
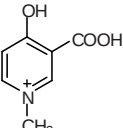
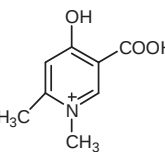
Le soluzioni acquose dell'acido 4-idrossi-3-piridincarbossilico e dei suoi derivati sono state studiate potenziometricamente e spettrofotometricamente da Di Marco e Dean¹⁶ alla temperatura di 25°C, e nell'intervallo di pH 2 – 11.40.

Nella tabella 1.1 sono riassunti i valori di pK_a ottenuti per i vari leganti. I valori delle costanti d'acidità relative a 4H3P e 1M4H3P sono riportati per confronto anche se sono stati determinati in lavori precedenti^{10, 17}.

¹⁶ Dean A., “Sintesi e studio delle interazioni metallo-legante per nuove molecole potenzialmente impiegabili nella terapia di chelazione di Fe(III) e Al(III)”, tesi di dottorato, università di Padova, 2006

¹⁷ Di Marco V. B., Dean A., Ferlin M. G., Yokel R. A., Li H., Venzo A., Bombi G. G. , *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1284-1293, 2006

Tabella 1.1 : Costanti d'acidità di alcuni derivati di 4H3P

Nome	Struttura	pK_1	pK_2	pK_3
4H3P		-0.061	5.955	10.820
2M4H3P		0.218	4.906	11.291
26M4H3P		0.593	5.325	11.829
1M4H3P		0.115	5.958	—
16M4H3P		0.470	6.326	-

Va rimarcato che mentre nel caso dei derivati di 3H4P l'assegnazione delle varie costanti di acidità ai gruppi funzionali che deprotonano (nel seguente ordine -COOH, -NH, -OH) è piuttosto semplice, ciò non è vero per i derivati di 4H3P. La difficoltà è dovuta al fatto che tali composti possono presentare un equilibrio tautomerico tra la forma aromatica e quella ammidica (chinoide), come già accennato al paragrafo 1.2.

È ben noto che i più semplici composti di questo tipo, le 4-idrossipiridine (così come le 2-idrossipiridine) esistono in soluzione sotto forma aromatica e chinoide (figura 1.5), con un abbondanza relativa dei due tautomeri dipendente dalla polarità del solvente e dagli altri sostituenti sull'anello. In soluzione acquosa ed in altri solventi polari risulta in genere favorita la formazione del piridinone, grazie alla separazione di cariche che si ottiene nella struttura di risonanza associata e quindi all'aumento del momento di dipolo della molecola; per quanto riguarda la 2-idrossipiridina, un ulteriore effetto stabilizzante della forma chinoide è dato dalla formazione di un legame ad idrogeno intramolecolare che favorisce il trasferimento del protone. Tali effetti aumentano notevolmente (di oltre

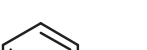
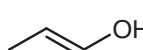
Chemical reaction scheme showing the tautomerization of 4-hydroxypyridine to 4-pyridone:

Oc1ccncc1>>[O-]c1ccncc1>>[O-]c1cc[nH]c1>>O=C1C=CC=CN1

The scheme illustrates the following steps:

- 4-hydroxypyridine (top left) loses a proton ($-H^+$) to form the 4-hydroxypyridine anion (top right).
- The 4-hydroxypyridine anion loses another proton ($-H^+$) to form the 4-pyridone anion (bottom right).
- The 4-pyridone anion gains a proton (H^+) to form 4-pyridone (bottom left).
- The 4-pyridone anion and 4-pyridone are shown in resonance, indicated by a double-headed arrow.
- The 4-pyridone and 4-hydroxypyridine are also shown in resonance, indicated by a double-headed arrow.

Tabella 1.2 : Confronto tra le costanti d'acidità delle idrossipiridine

		
2-idrossipiridina (I=1.0, 25°C) ¹⁹	4-idrossipiridina (I=1.0, 25°C) ²⁰	3-idrossipiridina (I=0.0, 25°C) ²¹
-	-	pK _{NH} = 4.86
pK _{OH} = 0.98	pK _{OH} = 3.52	pK _{OH} = 8.78

²¹ Sanchez-Ruiz, J. M.; Llor, J.; Cortijo, J. *Chem. Soc. (Perkin trans., 2)*, **12**, 2047–2051, 1984

Nel caso specifico di 4H3P e dei suoi derivati, la formazione del legame ad idrogeno intramolecolare tra il sostituito fenolico e quello carbossilico, favorisce la struttura aromatica molto più di quanto non avviene per le semplici monoidrossipiridine prima citate; la prevalenza della forma aromatica è suggerita anche dal fatto che le costanti di acidità dei derivati di 4H3P sono molto simili a quelle per i derivati di 3H4P. Per tale ragione, anche per 4H3P si dovrebbe avere la deprotonazione iniziale del gruppo carbossilico, seguita dall'azoto ed infine dall'ossidrile. Tuttavia, dati potenziometrici ottenuti suggeriscono chiaramente un contributo significativo della forma chinoide in particolare per i derivati metilati (per esempio l'acido 2-metil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (2M4H3P) in figura 1.6).

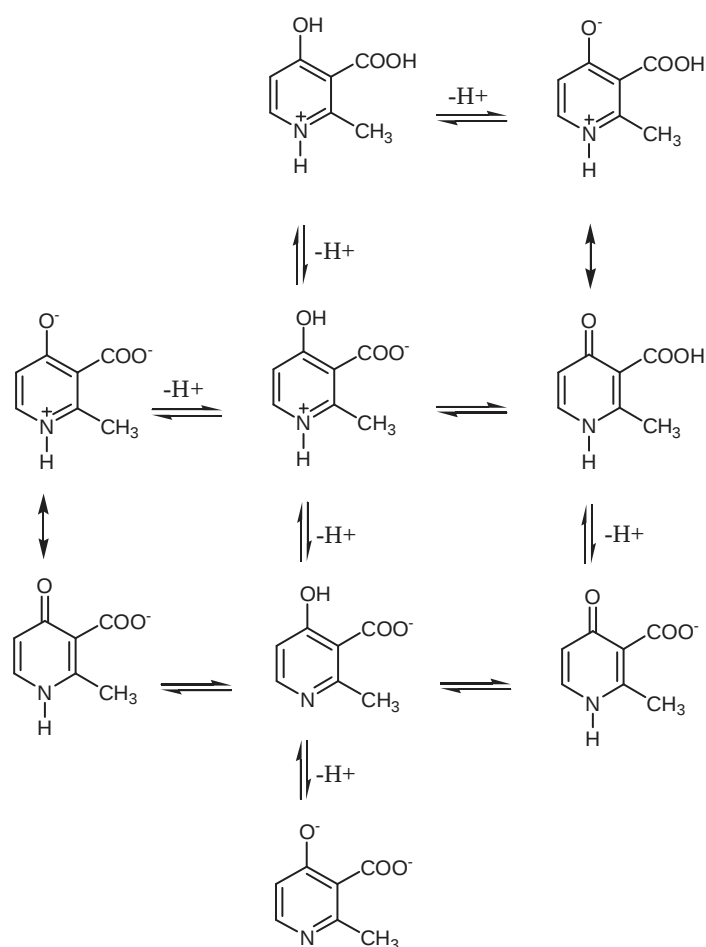


Figura 1.6 : Possibili sequenze di deprotonazione di 2M4H3P

L'aumento del contributo della forma chinoide comporta che la seconda deprotonazione abbia un maggior "carattere" carbossilico piuttosto che amminico, e la terza un maggior carattere ammidico piuttosto che fenolico. In effetti, in seguito alla metilazione dell'anello piridinico nella posizione 2, si osserva una diminuzione della pK_a relativa alla seconda deprotonazione, ed un aumento della terza (per 2M4H3P $pK_2 = 4.9061$ e $pK_3 = 11.291$, per 4H3P $pK_2 = 5.9548$ e $pK_3 = 10.820$). Un effetto analogo si osserva anche per il 2,6-dimetil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (26M4H3P); per tale composto il doppio sostituito metilico esercita anche un effetto elettron-donatore che in parte compensa il maggior carattere chinoide della molecola, e di conseguenza i valori di pK_a aumentano leggermente rispetto a quelli del derivato monometilato in 2.

1.4 Il ferro

Il ferro è il ventiseiesimo elemento della tavola periodica, nella serie chimica degli elementi di transizione. Nella tabella 1.3 sono riassunte alcune proprietà dell'elemento.

Tabella 1.3 : Alcune proprietà del ferro

peso atomico	55.845	Elettronegatività	1.83
raggio atomico (calc.) (pm)	140	Calore specifico J/(kg·K)	440
raggio covalente (pm)	125	Cond. elettrica/m ohm	$9.93 \cdot 10^6$
conf. elettronica	[Ar]3d ⁶ 4s ²	Cond. termica J/(kg·K)	440
d ²⁰ (kg·dm ⁻³)	7.874	entalpie di ionizz.	763 (1°)
punto di fusione (°C)	1535	(kJ/mol)	1562 (2°)
punto di ebollizione (°C)	2750		2957 (3°)
calore di evaporazione (kJ/mol)	349.6		5290 (4°)
calore di fusione (kJ/mol)	13.8	Isotopi naturali	54, 56, 57, 58
		Isotopi sintetici	55, 59, 60

Il ferro è il metallo più abbondante sulla Terra costituendo il 34.6 % della massa del nostro pianeta (si suppone che la sua grande abbondanza sia una delle principali cause del campo magnetico della Terra) e si stima che sia il decimo elemento per abbondanza nell'intero universo. Nell'ambiente è raro trovare il ferro in forma elementare, poiché reagisce facilmente anche a basse temperature con molti non metalli, quali alogeni, lo zolfo, il carbonio e il silicio ²²; è inoltre facilmente ossidato dall'ossigeno atmosferico. Si trova principalmente nei terreni e in numerose rocce allo stato combinato; i principali minerali utilizzati industrialmente sono l'ematite (Fe_2O_3), la magnetite (Fe_3O_4), la siderite (FeCO_3) e la pirite (FeS). Il metallo si trova praticamente in tutti gli alimenti e nell'acqua potabile. Essendo un elemento di transizione, oltre allo stato elementare presenta numerosi stati di ossidazione: (-II), (I), (II), (III), (IV) e (VI), di cui i principali sono (II) e (III). In questo lavoro di tesi viene studiato il metallo allo stato d'ossidazione (III).

1.5 Speciazione del ferro in soluzione acquosa

In soluzione acquosa lo stato d'ossidazione più stabile del metallo è il (III), poiché il metallo allo stato d'ossidazione (0) e (II) viene facilmente ossidato dall'ossigeno atmosferico a tutti i pH ¹⁸. A pH basici l'ossidazione del Fe(II) a Fe(III) procede molto velocemente, possedendo la velocità della reazione una dipendenza quadratica dall'attività dello ione idrossido ²³; a pH 7 l'ossidazione dello ione ferroso richiederebbe pochi minuti, tuttavia il Fe(III) formatosi può precipitare sotto forma di idrossido, diminuendo il pH della soluzione e portando a cinetiche molto più lente, che in alcuni casi possono essere anche dell'ordine dei mesi. La chimica in soluzione acquosa del Fe(III) non è ancora completamente nota. A pH molto acidi lo ione è presente come esaaquo complesso $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, usualmente indicato come Fe(III). A partire da valori di pH superiori a 2 tale complesso subisce una serie di reazioni di idrolisi, con formazione di specie mononucleari quali FeOH^{2+} e $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, e polinucleari quali $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ e $\text{Fe}_3(\text{OH})_4^{5+}$. Per pH ancora superiori, le medesime idrossospecie a bassa massa molecolare partecipano a reazioni di condensazione. È necessario dire che non vi è affatto concordanza, tra i diversi autori, né sulle idrossospecie presenti all'equilibrio, né

²² Cotton, F.A.; Wilkinson, G., *Chimica inorganica*, III ed., 1984

sulle relative costanti di formazione, anche operando alla stessa temperatura e forza ionica.

In tabella 1.4 è riportato un prospetto dei valori proposti da Flynn ²⁰ per le costanti di formazione dei prodotti di idrolisi del Fe(III).

Tabella 1.4 : Costanti di formazione dei prodotti di idrolisi del Fe(III) e prodotto di solubilità dell'idrossido di ferro da Flynn ²⁰. I dati si riferiscono alla temperatura di 25 °C e a forza ionica 1 M (NaClO₄). I dati tra parentesi si riferiscono invece ai valori ottenuti da Di Marco ⁹ in ambiente di cloruro di sodio 0.6 m (costanti riferite agli equilibri $m\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons [\text{Fe}_m(\text{OH})_n]^{3-n} + n\text{H}^+$)

Specie	log β	pK _a
Fe(H ₂ O) ₆ ³⁺	–	2.87
Fe(OH) ²⁺	–2.8 (–2.87)	3.29
Fe(OH) ₂ ⁺	–6.0 (–6.16)	6.0
Fe(OH) ₃	–12.16	10.0
Fe(OH) ₄ [–]	–22.16	–
Fe ₂ (OH) ₂ ²⁺	–2.9	–
Fe ₃ (OH) ₄ ⁵⁺	–6.3	–
Fe(OH) ₃ (s)	pK _s = 4.1	–

1.6 Formazione di complessi tra Fe(III) ed un legante

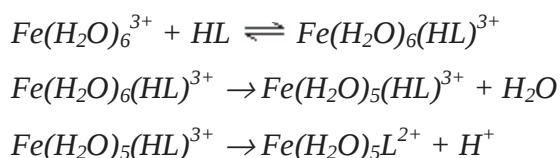
Lo ione Fe(III), in aggiunta agli idrossocomplessi elencati nel paragrafo precedente, può formare complessi con altre molecole contenenti residui basici. L'affinità del Fe(III) nei confronti dei principali gruppi funzionali è, almeno qualitativamente, prevedibile. Il metallo presenta un'elevata carica localizzata e un ridotto raggio ionico, e viene perciò classificato come un acido di Lewis di tipo "hard"; ciò determina una buona affinità solo per le basi di Lewis dello stesso tipo. Per quanto riguarda i leganti organici, i gruppi dotati di migliore affinità sono quelli contenenti l'atomo di ossigeno e, tra questi, quelli aventi la maggior carica parziale negativa, quali gli ioni fenossido (Ar–O[–]), alcossido (R–O[–]), carbossilato (COO[–]), idrossammico (N–O[–]) e carbonile (C=O), quest'ultimo

²³ Singer, P. C.; Stumm, W., *Science*, **167** (3921), 1121 – 1123

soltanto in presenza di una forma di risonanza C–O[−] significativa. I complessi risultanti possono tuttavia avere un'elevata stabilità solo quando i gruppi leganti sono disposti nella molecola in modo da formare con l'atomo metallico anelli chelati a 5 o 6 termini, quindi solo se il legante è almeno bidentato. Gruppi funzionali contenenti azoto coordinano il Fe(III) in condizioni particolari, cioè se il legante è tridentato (o esadentato) e preferibilmente in presenza di altri gruppi chelanti ossigenati. L'affinità del Fe(III) nei confronti degli ioni inorganici è elevata per F[−], CO₃^{2−}, SO₄^{2−}, SiO₄^{2−} e PO₄^{3−}.

1.7 Speciazione del Fe(III) in soluzione acquosa: aspetti cinetici

In soluzioni acquose acide le specie principalmente presenti, gli ioni Fe(H₂O)₆³⁺ e Fe(H₂O)₅OH²⁺, possono subire la sostituzione di un legante mediante vie parallele, dipendenti dalle rispettive sfere di coordinazione ²⁴. Il meccanismo proposto per lo ione esaquo è un interscambio associativo, dedotto in base alla valutazione delle variazioni del volume di attivazione del processo:



Il primo stadio è la formazione di una coppia ionica a sfera esterna (outer-sphere complex), e costituisce lo stadio lento del processo; in seguito si verifica la perdita della molecola d'acqua e la formazione del complesso. La presenza di un sostituito ossidrilico, oppure di un legante donatore, labilizza le altre molecole d'acqua coordinate al metallo, rendendo la specie significativamente più reattiva, e il meccanismo del processo diventa un interscambio dissociativo:



²⁴ Albrecht – Gary, A. M.; Crumbliss, A. L., *Met. Ions. Bio.l Syst.*, 1998

A titolo d'esempio, le costanti di velocità del secondo ordine relative allo scambio di una molecola d'acqua per le specie $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+}$ e $\text{FeL}(\text{OH})_2$ (L = o-fenilenediamina–N,N,N',N'–tetracetato) valgono rispettivamente $1.7 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$, $1.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ e $1.2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Nel caso di leganti chelanti, le successive sostituzioni delle molecole d'acqua divengono significativamente più rapide man mano che si procede con la chelazione, con velocità che dipendono dal tipo di chelante e dalla sua struttura.

1.8 Biochimica del ferro

Il ferro è un metallo essenziale per tutti gli organismi viventi. Nell'uomo esso partecipa a numerosi processi metabolici, legandosi a proteine che risultano essenziali per il trasporto di ossigeno e di elettroni, per la trasduzione di energia, per la sintesi del DNA, ecc.²⁵. La maggior parte del ferro corporeo totale si trova legato all'emoglobina (57.6%) e alla mioglobina (8.9%); ferro non eme si trova principalmente nel fegato, muscoli, midollo osseo e milza; soltanto piccole quantità di ferro, inferiori all'1%, sono distribuite nelle proteine dei citocromi mitocondriali, catalasi e transferrina. Il contenuto totale di ferro nell'organismo di un adulto è stimato tra i 3 e i 5 g²⁶. Il ferro viene assorbito principalmente mediante l'ingestione e l'inalazione, mentre l'assorbimento attraverso la cute è ritenuto trascurabile. L'assorbimento avviene in quantità differente a seconda dello stato di ossidazione; infatti è stato stimato che Fe(III) viene assorbito in quantità pari ad un terzo rispetto al metallo con stato di ossidazione (II)²⁷. Poiché il ferro contenuto nelle sostanze nutrienti è principalmente presente sotto forma di specie complessa allo stato (III), la secrezione di acido nello stomaco e la presenza di specie riducenti, come l'acido ascorbico o il glutathione, facilitano l'assorbimento.

Il contenuto totale di ferro è mantenuto costante mediante un equilibrio tra assorbimento ed eliminazione, in quanto la quantità giornaliera eliminata è normalmente pari alla quantità assorbita²⁸; le normali vie metaboliche di escrezione includono la bile, l'urina,

²⁵ Kontoghiorghes, G.J., *Analyst*, **120**, 845–851, 1995

²⁶ Gutteridge, J. M.; Halliwell, B., *Baillière's Clinical Haematology*, **2**, No.2, 1989

²⁷ Covelli, I.; Fratti, L., *Fisiopatologia delle cellule ematiche, Patologia generale e fisiopatologia*, **IV ed.**, 870–888, 1986

²⁸ Porter, J. B., *Drug Safety*, **17** (6), 407–421, 1997

lo sfaldamento delle cellule mucosali e, in minor quantità, il sudore, le unghie e i capelli. Non esiste nessun meccanismo specifico in grado di regolare l'escrezione del metallo²⁹.

1.9 Patologie provocate da bioaccumulo di ferro

Sebbene le patologie più comunemente legate al metabolismo del ferro siano quelle dovute ad una carenza del metallo (anemia), quelle legate ad un eccesso dello stesso sono assai più gravi, anche a causa della mancanza di un meccanismo regolatore atto ad eliminare le quantità di ferro eccedenti. L'accumulo eccessivo di ferro può essere la conseguenza di frequenti trasfusioni ematiche necessarie per la terapia di patologie non direttamente legate all'eccesso di Fe(III). Il metallo, però, si accumula nell'organismo malato in quanto immesso in grandi quantità mediante le trasfusioni medesime. Tra queste patologie vanno menzionate le talassemie, disfunzioni di carattere genetico particolarmente diffuse tra le popolazioni del bacino del Mediterraneo, del sud-est asiatico e di alcuni paesi dell'Africa equatoriale. La selezione dei geni talassemici in queste zone è stata favorita in passato dalla stretta correlazione esistente tra talassemia e malaria: come notato già nel 1949 da Haldane³⁰ il parassita malarico non trova un ambiente idoneo alla sua sopravvivenza nei soggetti talassemici e nei portatori sani. Le talassemie sono un gruppo di malattie ematologiche ereditarie caratterizzate da anomalie strutturali della molecola dell'emoglobina, la proteina contenuta nei globuli rossi del sangue; in seguito a queste mutazioni genetiche i globuli rossi non possono essere prodotti normalmente, ma risultano più piccoli del normale e deformati. I difetti di una o più delle catene emoglobiniche causano le diverse sindromi talasemiche, in particolare le α -talassemie e le β -talassemie. La β -talassemia, identificata per la prima volta da Cooley nel 1925, è caratterizzata dalla deficienza assoluta o relativa della sintesi delle catene β -globiniche; a seconda della gravità della patologia può essere classificata in tre forme principali: β -talassemia major (la forma più grave, caratterizzata da anemia marcata che richiede ripetute trasfusioni), β -talassemia intermedia (presenta un grado di anemia meno grave, non sono richieste trasfusioni ripetute), β -talassemia minor

²⁹ Faa, G.; Crisponi, G., *Coord. Chem Rev.*, **184**, 291–310, 1999

³⁰ Haldane, J. B. S., *Ric. Sci. Suppl. A* **19**, 68-76, 1949

(asintomatica; comporta anomalie morfologiche dei globuli rossi ma non anemia). Le β -talassemie rappresentano un problema socio-sanitario di notevole rilevanza anche tra la popolazione italiana, poiché l'incidenza media degli eterozigoti è del 7% e del 12% nel Delta Padano; secondo stime recenti, le persone affette da talassemia nel mondo sono circa 3 milioni; in Italia i talassemici sono circa 8.000, mentre ben 2.500.000 sono i portatori sani. L'aspettativa di vita delle persone affette da β -talassemia major è di pochi anni in assenza di cure. Oggigiorno, l'utilizzo frequente di trasfusioni, associato alla terapia per chelazione, ha portato la durata media della vita dei pazienti oltre i trent'anni e con qualità di vita praticamente normale. Altre patologie che sono dovute a un eccessivo assorbimento di ferro comprendono il morbo di Alzheimer e di Parkinson, l'atassia di Friedreich, la sclerosi amiotrofica laterale e alcune altre patologie minori i cui disordini neurodegenerativi vedono coinvolto lo stress ossidativo promosso dal ferro e l'aggregazione di proteine indotta da un eccesso di metalli.

1.10 Meccanismi molecolari della tossicità del ferro

Gli effetti tossici causati da un accumulo di ferro nell'organismo sono simili, indipendentemente dalle cause, e comprendono disturbi della funzionalità epatica, endocrina e cardiaca; ad esempio, l'eccesso di ferro causato da frequenti trasfusioni nella talassemia genera prevalentemente tossicità cardiaca e aritmia letali²⁸. Negli ultimi anni inoltre sono state evidenziate delle complicazioni neurologiche nei pazienti affetti da β -talassemia, quali ipossia cronica ed espansione del midollo osseo.³¹ La caratteristica del ferro di partecipare a cicli redox con formazione di radicali liberi (ROS, reactive oxygen species) mediante le reazioni di Fenton può portare ad una condizione di "stress ossidativo", definito come uno sbilancio tra la formazione di radicali e l'abilità della cellula di difendersi da essi mediante l'azione di antiossidanti ed enzimi detossificanti. I ROS generati a basse concentrazioni possono agire come secondi messaggeri, regolatori genici e mediatori dell'attivazione cellulare³², tuttavia l'elevata formazione in caso di sovraccarico di ferro è in grado di provocare la morte cellulare in seguito ad una serie di eventi che comprendono l'ossidazione del DNA, danni mitocondriali e ossidazione delle

³¹ Zafeiru D., Economu M., *Brain an development*, **28** (8), 477-481, 2006

membrane lipidiche ³³. Il cervello è uno dei principali organi a rischio per lo stress ossidativo, dato l'elevato consumo di ossigeno, la tendenza ad accumulare metalli e la presenza relativamente bassa di agenti antiossidanti protettivi.

³² Polla B., *Biochem.Pharm.*, **57**, 1345-1349, 1999

³³ Bergeron, R. J., Streiff, R. R., Creary, E. A., Daniels, R. D. J., *Blood*, **81**, 2166, 1993

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di studiare le proprietà leganti di alcuni acidi idrossi-piridin-carbossilici al fine di poterli usare come leganti nella terapia di chelazione (per la cura da intossicazioni acute da ferro). In particolare, si vuole dimostrare la possibilità di ottenere informazioni accurate sull'entità delle costanti di stabilità dei complessi da essi formati con lo ione Fe(III) , sui potenziali standard di ossido-riduzione delle diverse coppie, e soprattutto la determinazione dei parametri cinetici che caratterizzano il sistema (non ottenibili da misure potenziometriche), attraverso l'utilizzo di tecniche voltammetriche transienti effettuate sia in soluzioni statiche che con elettrodo rotante. Verrà preventivamente caratterizzato voltammetricamente il Fe(III) e le informazioni ottenute saranno usate per lo studio dei suoi complessi con i leganti sotto esame. Verranno presi in considerazione due leganti: l'acido 1,6-dimetil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (16M3H4P) e l'acido 2-metil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (2M4H3P). Verrà, in primo luogo, formulata un'ipotesi di meccanismo di reazione con la quale verranno simulate le risposte voltammetriche. I dati sperimentali verranno confrontati con le simulazioni e verranno elaborati due metodi empirici basati sui punti notevoli delle curve voltammetriche per ricavare alcuni parametri direttamente dalle curve sperimentali. Sarà possibile determinare il coefficiente di diffusione del Fe(III) , il coefficiente di trasferimento elettronico, il potenziale standard e la costante cinetica di trasferimento elettronico (D , α , $E^{0'}$ e k^0).

CAPITOLO 3

REAGENTI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reagenti

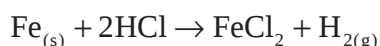
HNO ₃	Fluka, titolo minimo 65%
HCl	Carlo Erba Reagenti, 37%
H ₂ SO ₄	AnalaR, 98%
NaOH	Fluka, titolo minimo 98 %
Soluzione di Fe(III)	v. paragrafo 3.3
Acido 1,6-dimetil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (16M4H3P)	Prodotto di sintesi
Acido 2-metil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (2M4H3P)	Prodotto di sintesi

3.2 Strumentazione

- μ -autolab potenziostatico, generatore di impulsi di potenziale;
- portaelettrodo tipo *rde* μ -autolab e motor controller collegato;
- cella di misura Metrohm di capacità pari a circa 50 mL ;
- pHmetro Crison;
- elettrodo Metrohm di grafite vetrosa (GC, con $A = 0,07 \text{ cm}^2$)
- elettrodo di riferimento Hg/Hg₂Cl₂/Cl⁻ saturo (SCE);
- controelettrodo di Platino;
- Sistema Millipore Milli-Q/plus per la purificazione dell'acqua mediante scambio ionico, trattamento con carbone attivo e filtrazione su membrana porosa da 0.4 μm e resistività media dell'acqua prodotta: 18.2 M Ω ·cm.

3.3 Preparazione delle soluzioni

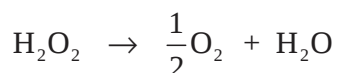
La soluzione di Fe(III) è stata preparata per dissoluzione dei granuli di ferro zerovalente in una soluzione circa 1 M di acido cloridrico. In questo ambiente il ferro viene ossidato allo stato d'ossidazione (II) secondo la reazione:



La reazione procede a completezza in circa 24 ore scaldando debolmente la soluzione. Lasciando invecchiare la soluzione stessa, l'ossigeno atmosferico tende ad ossidare lentamente il metallo allo stato di Fe(III); tuttavia si è preferito accelerare l'ossidazione aggiungendo goccia a goccia a freddo un piccolo eccesso d'acqua ossigenata:



Il colore della soluzione muta rapidamente dal verde pallido al giallo. L'acqua ossigenata in eccesso viene rimossa scaldando debolmente la soluzione; la rapida decomposizione ad acqua ed ossigeno è catalizzata dalla presenza di ferro:



Le quantità residue di Fe (II) e di acqua ossigenata nella soluzione risultante sono trascurabili.

La soluzione di Fe(III) è stata preparata in volume, poiché non è possibile controllare la massa totale di acqua. Il titolo finale in ferro è esattamente noto, quello dell'acido residuo deve invece essere determinato.

Le soluzioni di legante a titolo noto sono state preparate per dissoluzione delle quantità necessarie (o disponibili) in acqua, eventualmente addizionate della minima quantità di NaOH, essendo queste molecole poco solubili a pH neutro. In genere la soluzione madre di legante, che si utilizzava per le nostre prove, aveva una concentrazione media di 50 mM : a concentrazioni maggiori si osservava precipitazione del legante. Le soluzioni sono state conservate in frigorifero ed utilizzate entro pochi giorni dalla preparazione.

Eventuali aggiustamenti di pH durante la raccolta delle scansioni sono stati attuati aggiungendo minimi volumi di soluzioni di NaOH o H₂SO₄ molto concentrati, in modo da ridurre al minimo la diluizione della soluzione in analisi.

3.4 Misure voltammetriche

Per ogni misura sono stati prelevati 20 mL di soluzione in esame (solitamente con concentrazione di Fe(III) o legante inferiore a 5 mM) e sono stati posti nella cella. Sono stati quindi immersi l'elettrodo lavorante, l'elettrodo di riferimento, il contro elettrodo e il gorgogliatore con l'azoto. Le voltammetrie, a meno di casi particolari eventualmente specificati, avevano le seguenti caratteristiche: potenziale di pre-condizionamento: 0,8 V; durata del pre-condizionamento: 10 s; potenziale iniziale: 0,8 V, potenziale di inversione: -0,3 V; velocità di scansione: 10 mV/s. La soluzione veniva degasata con un gas inerte (N₂) prima di eseguire qualsiasi analisi sulla stessa, in modo da ridurre al minimo la quantità di O₂ disciolto, la cui riduzione si noterebbe altrimenti sui voltammogrammi date le basse concentrazioni (e quindi i bassi segnali) con cui si lavora. La durata del degasamento era, in media, tra i 5 e i 7 minuti. Le voltammetrie idrodinamiche sono state eseguite per mezzo di un controller collegato all'elettrodo e in genere la velocità di rotazione era di 1000 rpm (rotazioni per minuto).

CAPITOLO 4

STUDIO VOLTAMMETRICO DI Fe(III)

4.1 Effetto della concentrazione di Fe(III)

In soluzione acquosa, il Fe(III) è presente sotto diverse forme in dipendenza dal pH. La specie prevalente a pH molto acidi ($\text{pH} = 0$) è lo ione esaquo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ mentre all'aumentare del pH si osserva la formazione di $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$ (oltre a specie di e polinucleari derivanti dall'idrolisi di $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$) fino al pH limite di formazione di idrossidi $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$ e/o ossoidrossidi $[\text{FeO}(\text{OH})]$, composti molto insolubili ($\text{pK}_{\text{ps}} = 37$) (vedi cap. 1.5). Queste proprietà rappresentano una difficoltà nella preparazione della soluzione di partenza da usare nelle prove elettrochimiche preliminari. Essa dovrebbe consistere in una soluzione nella quale sia presente una sola specie elettroattiva in un ampio intervallo di pH. E' stato necessario, perciò, individuare una serie di condizioni sperimentali (concentrazione di Fe(III), pH ed elettrolita di supporto) in modo da minimizzare gli inconvenienti e successivamente determinare i parametri elettrochimici (termodinamici e cinetici) più importanti (D , k^0 , α e $E^{0'}$) di questo sistema, che verranno utilizzati come base per gli studi successivi con i leganti idrossipiridincarbossilici (cap. 5). Premesso ciò, lo scoglio maggiore per i nostri esperimenti voltammetrici è stato il rischio di precipitazione di $\text{Fe}(\text{OH})_3$ nell'intervallo di pH tra 2 e 3, che è quello di maggiore interesse. In questo contesto si definisce come Fe(III) lo ione presente in tutte le sue forme tranne quelle complesse con i leganti sotto studio. Nella figura 4.1 sono mostrate voltammetrie idrodinamiche per alcune concentrazioni.

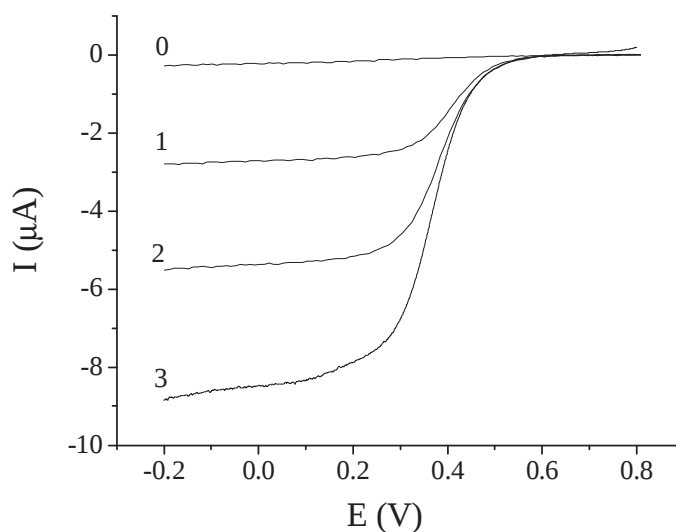


Figura 4.1: Voltammetrie idrodinamiche di una soluzione acquosa al variare della concentrazione di Fe(III); curva 0 : fondo solfato, curve da 1 a 3 rispettivamente di 0.1, 0.2 e 0.3 mM di Fe(III) a pH=3 , $v = 10\text{mV/s}$ da 0.8 V a -0.2V , dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, contro elettrodo Pt, riferimento SCE, velocità di rotazione 1000rpm.

E' da notare che la precipitazione avviene dopo 0.3 mM, cioè oltre il limite teorico calcolato (0.1 mM) per la precipitazione di $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a causa della presenza di anioni nella soluzione che lo complessano. In particolare, il pH della soluzione è stato aggiustato con acido solforico. Inoltre la soluzione madre di Fe(III) è stata preparata in acido cloridrico 0.5 M.

4.2 Effetto del pH

Oltre alla concentrazione di Fe(III), un'altra variabile da tenere in considerazione per evitare fenomeni di precipitazione, è il pH. A causa di ciò, il pH di lavoro ottimale deve essere basso, ma abbastanza alto da stabilizzare il maggior numero di complessi tra il Fe(III) e i leganti idrossipiridincarbossilici, che a $\text{pH} < 2$ si formano in quantità trascurabile rispetto al solo Fe(III). Inoltre, il pH più utile agli scopi di ricerca è quello fisiologico dei sistemi biologici, cioè tra 5 e 7, e l'obiettivo è quello di avvicinarsi per quanto possibile a questi valori. Una serie di voltammetrie idrodinamiche come quelle

riportate in figura 4.2 mostrano come varia l'andamento con il pH nell'intervallo tra 2 e 3.30.

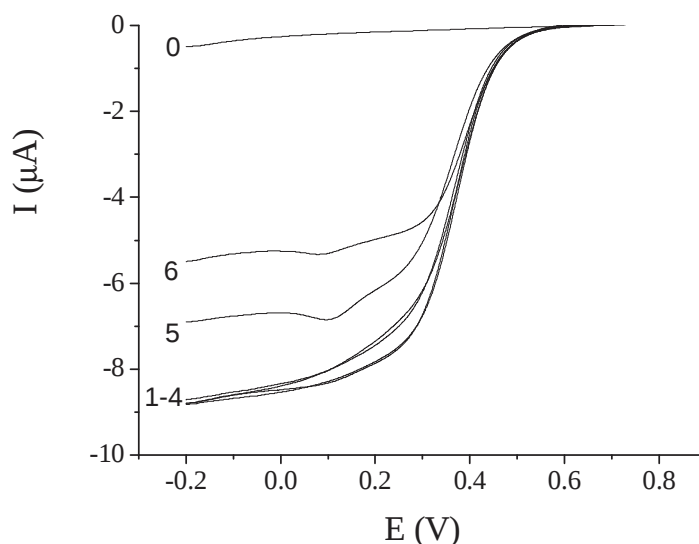


Figura 4.2: Voltammetrie idrodinamiche di Fe(III) 0.3mM a vari valori di pH; curva 0 : fondo solfato, curve da 1 a 6 rispettivamente pH = 2, 2.3, 2.5, 2.9, 3.1, 3.3 , $v = 10\text{mV/s}$ da 0.8 V a -0.2V , dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, controelettrodo Pt riferimento SCE, velocità di rotazione 1000 rpm.

La figura 4.2 evidenzia come rimanga invariata la voltammetria con il pH fino al valore di 3 – 3.05 mentre a valori superiori compare un picco adsorbitivo centrale e un visibile calo di corrente limite (e quindi una diminuzione della concentrazione di Fe(III) nella soluzione), dovuti alla formazione dell'idrossido di Fe(III) . Questi effetti hanno portato spesso a problemi di ripetibilità delle misure a questo pH e occorre prestare molta attenzione nel valutare i dati ottenuti. Il picco adsorbitivo scompare dopo passivazione del GC (cioè dopo parecchie corse voltammetriche). La precipitazione del Fe(OH)_3 è osservabile ad occhio nudo solo per $\text{pH} > 3.30$.

4.3 Effetto dell'elettrolita di supporto

Il comportamento elettrochimico di Fe(III) è fortemente influenzato dal tipo di elettrolita di supporto utilizzato, e in particolare, dalle caratteristiche degli anioni presenti. Infatti la maggior parte degli elettroliti utilizzabili contengono anioni capaci di legarsi al Fe(III)

per formare complessi, ognuno dei quali caratterizzato dalla sua costante di dissociazione del complesso (Tabella 4.1).

Tabella 4.1: Valori di costanti di dissociazioni di alcuni complessi del Fe (III) presi da G.Charlot "Analisi Chimica Qualitativa" eccetto per i valori con l'asterisco presi da (34)

<i>Metallo / Legante</i>	<i>pK</i>
$\text{Fe}^{3+}/6 \text{CN}^-$	$\text{pK}_6 = 31$
$\text{Fe}^{3+}/\text{EDTA}^{4-}$	24.2
$\text{Fe}^{3+}/\text{HPO}_4^{2-}$	9.4
$\text{Fe}^{3+}/\text{SO}_4^{2-}$	$\text{pK}_1 = 4.0^*$; $\text{pK}_2 = 1.8^*$
$\text{Fe}^{3+}/\text{CH}_3\text{COO}^-$	3.2 (NaClO_4 1M)
$\text{Fe}^{3+}/\text{Cl}^-$	$\text{pK}_1 = 1.5$; $\text{pK}_2 = 0.6$; $\text{pK}_3 = -1.4$; $\text{pK}_4 = -1.9$;
$\text{Fe}^{3+}/\text{ClO}_4^-$	1.2
$\text{Fe}^{3+}/\text{NO}_3^-$	1.0

L'anione ideale ai nostri scopi deve formare, con Fe(III), complessi sufficientemente forti da prevenire la precipitazione per intervalli di pH fra 2 e 3 ma decisamente più deboli da non entrare in competizione con i leganti idrossipiridincarbossilici da esaminare. Inoltre è auspicabile che il potenziale redox del complesso sia il più vicino possibile all' $E^{0'}$ della coppia $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e comunque molto lontano dagli $E^{0'}$ dei complessi da studiare. A questi scopi sono stati presi in esame tre tipologie di anioni e cioè cloruri, nitrati e solfati. In figura 4.3 sono mostrate le voltammetrie idrodinamiche per la riduzione di Fe(III) nei tre casi.

³⁴ A.F.Gil, *Talanta*, **1995**, 45, 407

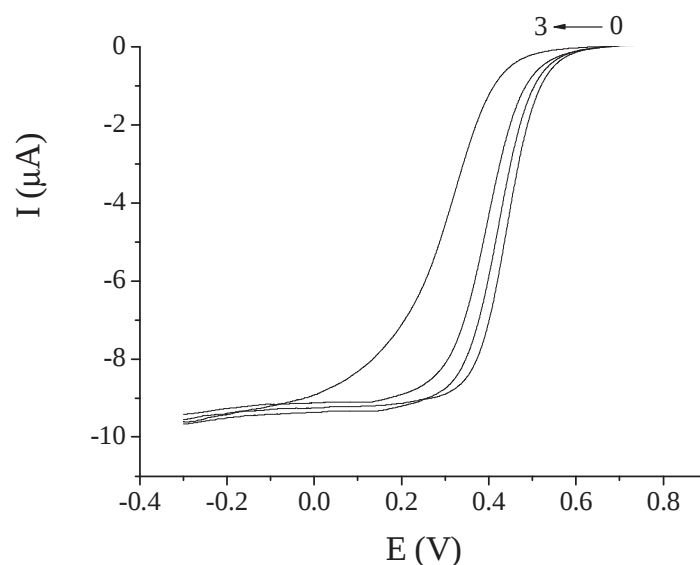


Figura 4.3: Voltammetrie idrodinamiche di Fe(III) 0.3 mM al variare del tipo elettrolita di supporto a $\text{pH}=2.30$, curva 0: concentrazione cloruri inferiore a 2 mM, curve da 1 a 3 di concentrazione 50 mM rispettivamente di Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} ; $v = 10 \text{ mV/s}$ da 0.8 V a -0.3 V, dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, controelettrodo Pt, riferimento SCE, velocità di rotazione 1000rpm.

Come si può notare dalla figura 4.3 i cloruri e i nitrati spostano poco il potenziale di riduzione e la forma della curva e le variazioni sono imputabili alla pulizia dell'elettrodo che fa cambiare di volta in volta la posizione della curva. Ciò perchè questi anioni formano complessi così deboli con il Fe(III) che a questa concentrazione di legante (50 mM) si può considerare il Fe(III) come quasi tutto "libero" cosicchè la forma delle curve è simile alla curva in assenza di essi. Diversamente, i solfati provocano una forma d'onda di riduzione diversa perchè si formano dei complessi i quali hanno caratteristiche elettrochimiche significativamente diverse da Fe(III) libero. Infatti la curva ha una pendenza minore delle altre a causa di un trasferimento elettronico più lento (k^0 minore) oltre a un E^0 spostato a valori di potenziale più negativi.

Tuttavia sia i cloruri che i nitrati non evitano la formazione degli idrati ferrici già accennati sopra. Difatti le loro voltammetrie cicliche in diffusione (figura 4.4) mostrano questo effetto già a partire da $\text{pH} = 2.3$.

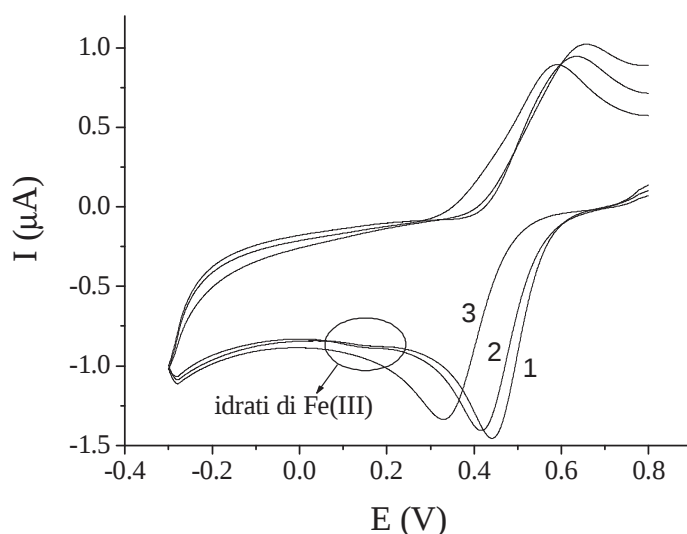


Figura 4.4: CV di Fe(III) 0.3 mM al variare dell'elettrolita a pH=2.30, curve da 1 a 3 di concentrazione 50mM rispettivamente di Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , $v = 10\text{mV/s}$ da 0.8 V a -0.3V, dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, controelettrodo Pt, riferimento SCE.

A valori di $3.30 < \text{pH} < 2.30$, perciò, si assiste alla precipitazione dell'idrossido ferrico (visibile dall'intorbimento della soluzione) ad eccezione del caso dei solfati.

Questi solfato-complessi alle condizioni da noi solitamente usate sono $\text{Fe}(\text{SO}_4)^+$ e $[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]^-$ e la loro predominanza dipende sia dal pH che dalla concentrazione di ione solfato in soluzione. Approcci, anche elettrochimici, su di essi sono noti in letteratura^{34,35}. Dal punto di vista elettrochimico, per esempio, risulta interessante comprendere e analizzare il comportamento voltammetrico di questi complessi per valutare in che modo possano influenzare il sistema redox Fe(III)/Fe(II). A tale scopo si sono eseguite delle prove a pH = 2.30 a tre differenti concentrazioni di ioni solfato in soluzione e cioè minore (o uguale) di 1 mM (cioè con la quantità minima di H_2SO_4 sufficiente a portare al pH voluto la soluzione, variabile di prova in prova, ma stimata attorno a un massimo di 1 mM) e 1 M, che corrispondono a condizioni di predominanza rispettivamente di $\text{Fe}(\text{SO}_4)^+$ e $[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]^-$ mentre la terza prova a 50 mM è in una condizione in cui si ha circa la metà dell'uno e dell'altro. La figura 4.5 mostra le voltammetrie eseguite nella maniera suddetta.

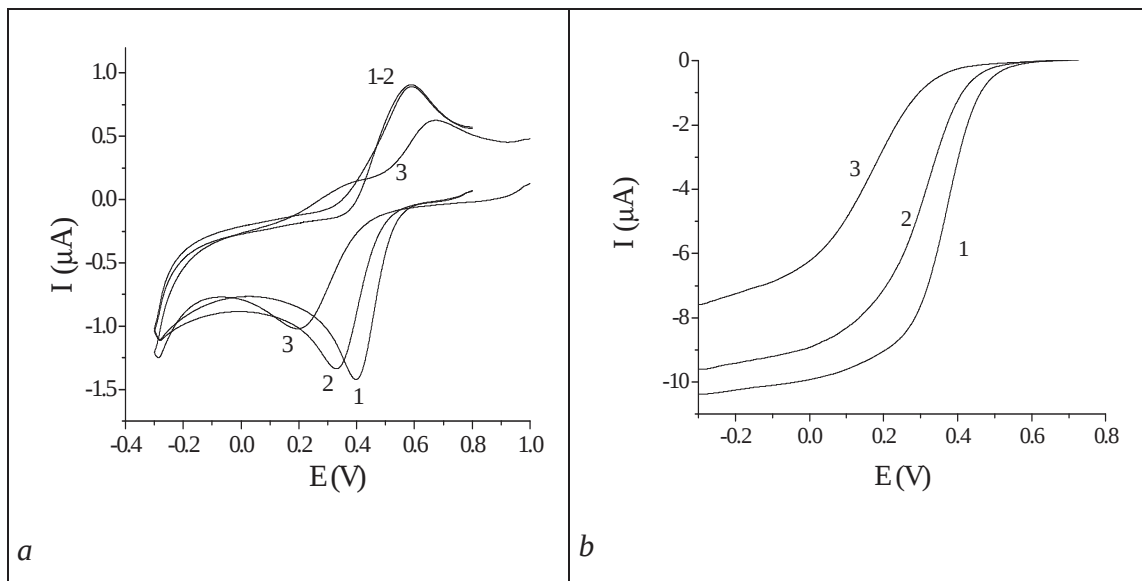


Figura 4.5: Voltammetrie cicliche (CV) (a) e idrodinamiche (b) di Fe(III) 0.3 mM al variare della concentrazione di solfati; curve da 1 a 3 rispettivamente di concentrazione di solfati minore di 1mM, 50 mM e 1M; pH=2.30 , $v = 10$ mV/s da 0.8 V a -0.3V, dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, contro elettrodo Pt, riferimento SCE, velocità di rotazione 1000rpm.

Dalle CV risulta evidente come all'aumentare della concentrazione di solfati aumenti l'irreversibilità elettrochimica del processo redox dato che si sposta il potenziale di riduzione a valori più negativi e si abbassa l'intensità di corrente di picco in accordo con la teoria delle cinetiche di trasferimento elettronico.

4.4 Determinazione del coefficiente di diffusione

Il coefficiente di diffusione (D) di una specie chimica in soluzione permette di avere informazioni sulla mobilità e sulle dimensioni della sfera di coordinazione della ione ed è un parametro fondamentale per il successivo calcolo di altri parametri elettrochimici (come il k^0).

La misura sperimentale del coefficiente di diffusione di Fe(III) è stata eseguita attraverso voltammetrie idrodinamiche di una soluzione di Fe(III) 0.3 mM a pH = 2.30 a varie velocità angolari di rotazione (ω). E' da notare che, in realtà, si ottiene un D medio delle varie specie derivanti dall'idrolisi di $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$ (vedi cap.4.1) nonostante sia

³⁵ A.F.Gil, *J.Electroanal.Chem.*, **417**, 129 -134, 1996

ipotizzabile che i D per queste specie siano simili tra loro (analogamente ai solfato-complessi di Fe(III), come riportato in letteratura³⁵). La soluzione di Fe(III) è stata portata a pH = 2.30 con acido cloridrico e non solforico per evitare la formazione dei solfato-complessi (e considerando trascurabili gli effetti di precipitazione visti nel cap. 4.3). Dall'equazione di Levich:

$$i_L = 0.620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C^* \quad (4.1)$$

è possibile risalire al D attraverso la misura della corrente limite in funzione della velocità angolare dell'elettrodo. Riportando in grafico i_L vs $\omega^{1/2}$ si ottiene una retta la cui pendenza viene determinata attraverso regressione lineare dei dati e il valore ottenuto può essere utilizzato nella seguente espressione:

$$D = \frac{(\partial i_L / \partial \omega^{1/2})^{3/2} \nu^{1/4}}{(0.62nFAC^*)^{3/2}} \quad (4.2)$$

dove:

- i_L è la corrente catodica limite in A;
- ω è la velocità angolare dell'elettrodo in rad/s;
- ν è la viscosità della soluzione in cm²/s (stimata al valore di 0.01);
- n numero elettroni scambiati nella reazione;
- F è la costante di Faraday, cioè 96485 C/mol;
- C^* è la concentrazione espressa in mol/cm³;
- A è l'area dell'elettrodo, cioè 0.07 cm².

I valori di ω utilizzati sono stati 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 rotazioni per minuto. L'intervallo scelto è dovuto al fatto che a bassi ω lo strato idrodinamico sarebbe non più trascurabile rispetto al diametro dell'elettrodo mentre alti ω non garantirebbero il moto laminare. Il valore di velocità di scansione è 10 mV/s sufficientemente basso da garantire la stazionarietà della concentrazione.

Il relativo grafico i_L vs $\omega^{1/2}$ è mostrato in figura 4.6 assieme al fitting lineare effettuato con il programma Origin.

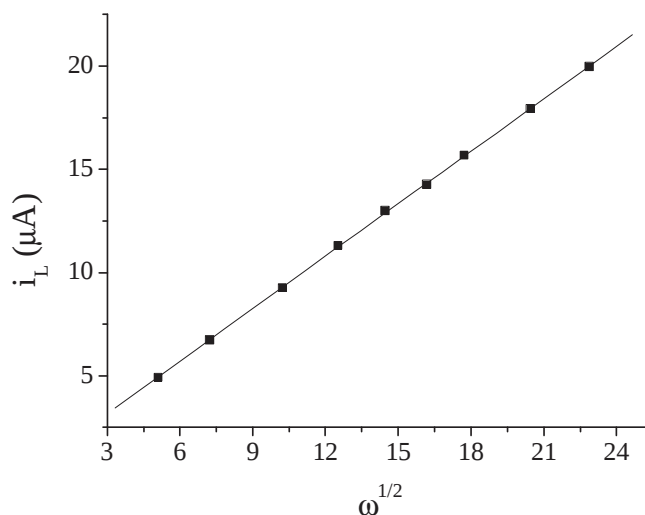


Figura 4.6: Grafico i_L vs $\omega^{1/2}$: i punti sono fittati molto bene da una retta, dalla cui pendenza è possibile ricavare D : equazione retta $i_L = A + B \cdot \omega^{1/2}$ con $A = (6.11 \pm 0.56) \cdot 10^{-7}$, $B = (8.48 \pm 0.04) \cdot 10^{-7}$, $R = 0.999$.

Il valore determinato in questo modo è $5.48 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, molto vicino a quello trovato in letteratura³⁵ a pH = 0 di $5.89 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

E' stata eseguita una prova simile anche per la specie $[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]^-$, utilizzando una soluzione di partenza con concentrazione di solfati pari a 1 M: le voltammetrie mostrano che per ogni ω la corrente non raggiunge un "plateau" cosicché si è solo potuto stimare una corrente limite. Il grafico i_L vs $\omega^{1/2}$ è comunque ben fittato da una retta e il valore di D ricavabile è $3.37 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, valore più basso rispetto a Fe(III) in assenza di solfati. Ciò suggerisce che lo ione $[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]^-$ ha una sfera di coordinazione di dimensione più grande rispetto al Fe(III) libero (ipotizzato nel caso si utilizzi cloruri o nitrati come elettroliti) e quindi diffonde più lentamente.

4.5 Determinazione di k^0 da voltammetria ciclica

Un importante parametro che influenza il responso voltammetrico è la costante di trasferimento eterogeneo di carica che dà un'informazione cinetica della coppia redox, cioè la velocità con cui la reazione raggiunge l'equilibrio. Nei sistemi quasi-reversibili come il nostro (in genere si classificano quelle redox con $10^{-1} \text{ cm/s} < k^0 < 10^{-5} \text{ cm/s}$)³⁶ il processo è cineticamente controllato sia dal trasferimento elettronico che dal trasporto di massa e in generale è un sistema più complicato da esaminare rispetto ai casi reversibile e irreversibile. Tuttavia la separazione dei picchi delle voltammetrie cicliche dipende fortemente dalla velocità del trasferimento elettronico. Difatti si può dimostrare che diminuendo il valore di k^0 la differenza tra E_{pc} e E_{pa} aumenta fino al caso limite di scomparsa del picco di ritorno (irreversibilità). In maniera analoga, anche la velocità di scansione (v) influenza la voltammetria di questi sistemi dato che all'aumentare della v aumenta l'irreversibilità elettrochimica del processo (ma a differenza dei sistemi reversibili e irreversibili non esistono equazioni che relazionino i_p e E_p con v). Il parametro cinetico ψ descrive quanto detto:

$$\psi = \frac{(D_O / D_R)^{\alpha/2} k^0}{[(nF / RT) \cdot \pi \cdot D_O v]^{1/2}} \quad (4.3)$$

Alcuni valori di ΔE_p in funzione di ψ sono stati ottenuti mediante un modello teorico di sistema quasi-reversibile³⁷. Il valore k^0 può essere determinato dal confronto dei dati sperimentali di ΔE_p ottenuti a vari v , con il modello teorico. Per far ciò, abbiamo fittato i dati teorici con un polinomio di quinto grado della forma seguente:

$$y = ax^5 + bx^4 + cx^3 + dx^2 + ex + f \quad (4.4)$$

per ottenere i valori di a, b, c, d, e, f (figura 4.7).

³⁶ Wang J., *Analytical Electrochemistry*, pagina 33, **II° edition**, 2000

³⁷ A.J.Bard, L.R.Faulkner, *Electrochemical Methods, principles and applications*, **2001**, Wiley, New York

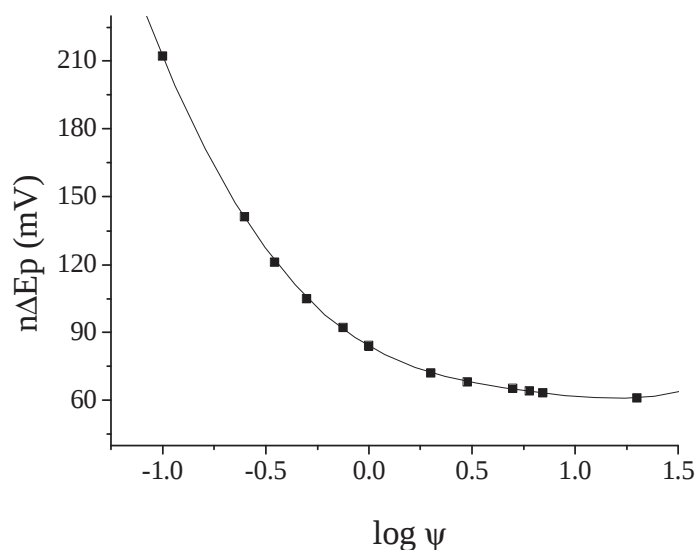


Figura 4.7: Dipendenza della separazione dei picchi catodico e anodico per un trasferimento elettronico quasi-reversibile dal parametro cinetico ψ . I quadretti rappresentano dati teorici mentre la curva continua è la loro regressione con un polinomio di quinto grado. Valori dei parametri calcolati con Origin: $a = 4.11 \pm 1.95$, $b = -0.86 \pm 1.60$, $c = -26.49 \pm 2.91$, $d = 53.87 \pm 1.63$, $e = -52.74 \pm 0.89$, $f = 83.91 \pm 0.26$ e $R = 0.999$

Con l'equazione polinomiale così ottenuta è possibile fare la regressione dei dati sperimentali allo scopo di determinare k^0 . Per questo scopo, si deve assumere, ragionevolmente, che $D_O = D_R$ cosicché l'espressione (4.3) si semplifica, dato che non è più necessario conoscere il parametro α . Calcolando per ogni valore di v il parametro

$$\log \psi' = \log \left\{ \frac{1}{[(nF / RT)\pi Dv]^{1/2}} \right\} \quad (4.5)$$

e fittando con il polinomio di quinto grado ponendo $y = \Delta E_p$ e $x = \log \psi' + \log k^0$, in cui, $\log k^0$ è l'unico parametro aggiustabile che viene ottimizzato nel processo di fitting (figura 4.8).

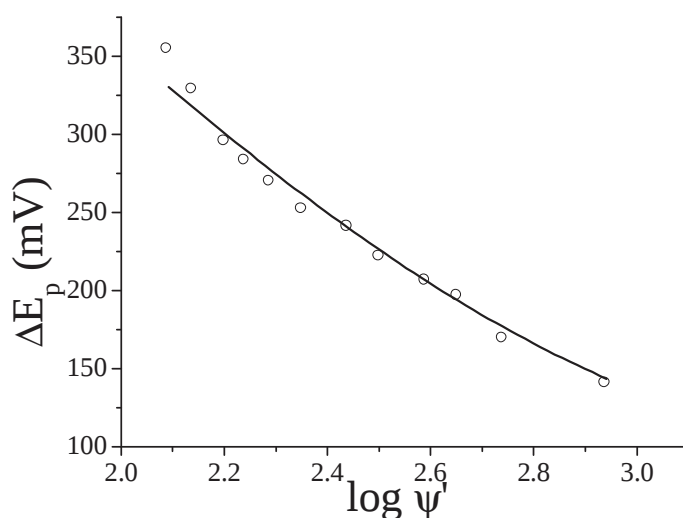


Figura 4.8: ΔE_p vs $\log \psi'$ fittato con l'equazione polinomiale di quinto grado dei dati sperimentali di una soluzione di Fe(III) 0.3mM a pH = 2.30 e velocità di scansione di 2, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 mV/s; equazione utilizzata per il fitting : $\Delta E_p = \log \psi' + \log k^0$, valore di $\log k^0 = -3.56 \pm 0.01$; soluzione degasata con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, controelettrodo Pt, riferimento SCE.

Il valore determinato con questo metodo è $k^0 = 2.73 \cdot 10^{-4}$ cm/s. Il valore è relativo sempre allo ione Fe(III) non complessato, quindi riferito a una soluzione priva di solfati.

4.6 Determinazione di α ed $E^{0'}$ mediante voltammetria idrodinamica

Il parametro cinetico α (coefficiente di trasferimento elettronico) è una misura della simmetria della barriera energetica del processo redox. L'intervallo dei valori di α va da 0 a 1 con la barriera energetica simmetrica al valore di 0.5. α dipende dal potenziale, ma si può considerare costante per intervalli di potenziale abbastanza stretti (350-400 mV)³⁸. La sua determinazione sperimentale è piuttosto semplice nel caso di sistemi irreversibili mentre risulta più difficile nel caso dei quasi reversibili. Tuttavia dall'esecuzione di voltammetrie idrodinamiche (*rde*) a varie velocità di rotazione (ω) è possibile ottenere $k_f(E)$, costante di velocità di andata (forward) della reazione di riduzione³⁷, utilizzando la relazione seguente:

³⁸ J.-M. Savéant & D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.*, **65**, 57, 1975

$$i = \frac{FAk_f C^*}{1 + k_f / (0.62\nu^{-1/6} D^{2/3} \omega^{1/2})} = \frac{FAk_f C^*}{1 + k_f^* \delta / D} \quad \text{con } \delta = 1.61 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2} \quad (4.6)$$

ottenuta dalla derivazione (con le opportune condizioni di contorno) dell'equazione più generale:

$$i = nFA[k_f C_O(0,t) - k_b C_R(0,t)] \quad (4.7)$$

e trascurando la reazione inversa (anodica). L'equazione (4.6) può essere rielaborata in maniera da linealizzarla:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{FAk_f C^*} + \frac{\delta}{DFAC^*} \quad (4.8)$$

cosicché i valori dell'intercetta del grafico $1/i$ vs δ permettono di ricavare k_f .

Questo valore, a sua volta, dipende dal potenziale secondo la seguente espressione:

$$k_f = k^0 \cdot \exp[-\alpha \cdot f \cdot (E - E^{0'})] \quad \text{con } f = F / RT = 38.92 \text{ V}^{-1} \quad (4.9)$$

Da ciò raccogliendo i valori di k_f per vari potenziali e fittando il grafico k_f vs E con l'equazione (4.9) è possibile determinare i valori di α e $E^{0'}$. Il risultato ottenuto da questa procedura è in figura 4.9, assumendo per k^0 il valore determinato nel paragrafo 4.5.

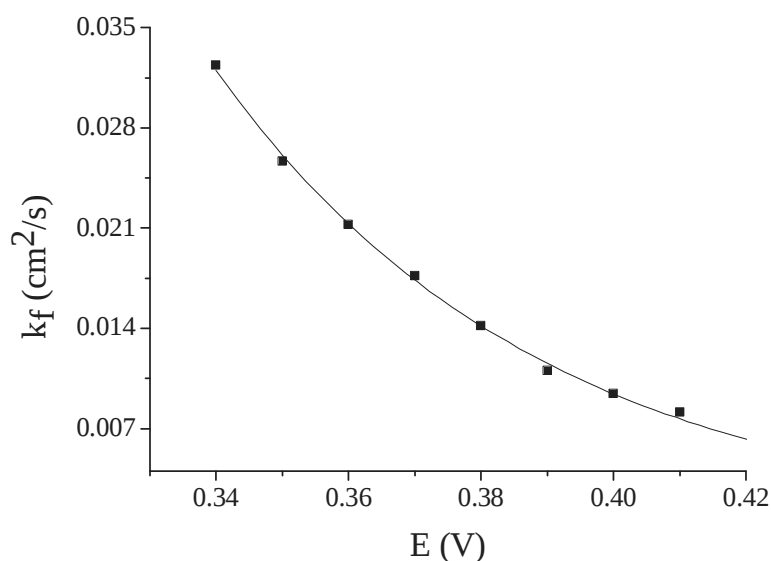


Figura 4.9: Grafico k_f vs E di un soluzione di Fe(III) 0.3mM a $\text{pH} = 2.30$ per la determinazione di α e E^0 ; equazione utilizzata per il fitting $k_f = [2.73 \cdot 10^{-4}] \cdot \exp(-\alpha 38.92 \cdot (E - E^0))$ e $R = 0.998$; valori determinati con Origin: $\alpha = (0.573 \pm 0.004)$, $E^0 = (0.525 \pm 0.010)$.

Il valore di $E^{0'} = 0.525$ V, così determinato, è vicino a quello tabulato ($E^{0'} = 0.530$ V). E' importante sottolineare che l'intervallo di potenziale (0.34 – 0.41 V) è stato scelto in maniera tale che il trasferimento elettronico non sia ne troppo lento ne troppo rapido (figura 4.10) cosicché nell'espressione (4.8) abbia ugual peso tanto il termine cinetico (con k_f) quanto il termine diffusivo (rappresentato dal termine con δD).

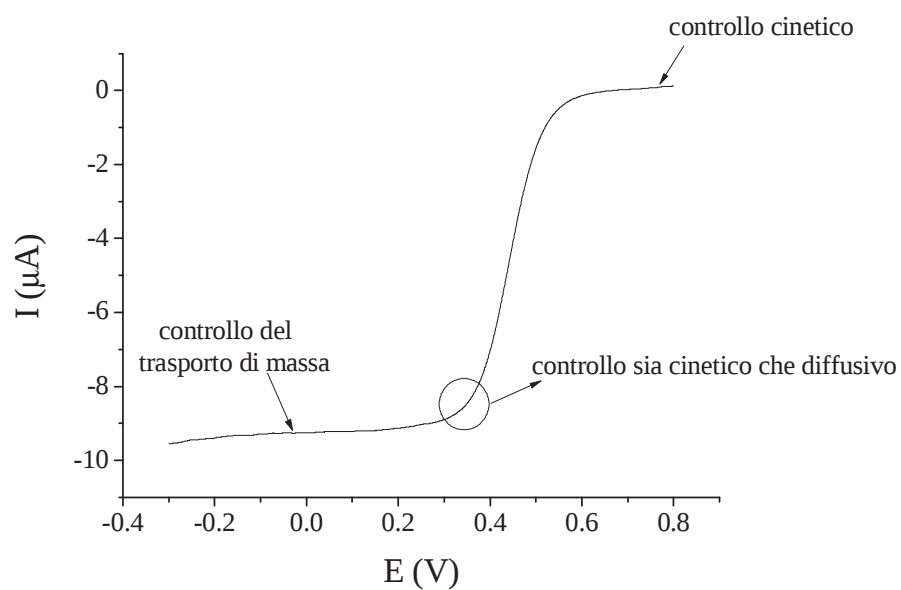


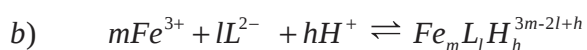
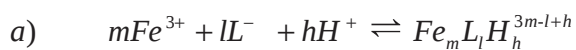
Figura 4.10 : Voltammetria idrodinamica di Fe(III) 0.3 mM a $\text{pH}=2.30$: l'intervallo di potenziali cerchiato è quello scelto per la determinazione dei k_f ; Condizioni sperimentali: $v = 10 \text{ mV/s}$ da 0.8 V a -0.3 V , dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC, controelettrodo Pt, riferimento SCE, velocità di rotazione 1000 rpm .

CAPITOLO 5

STUDIO VOLTAMMETRICO DEI COMPLESSI DEL Fe(III) CON 16M4H3P E 2M4H3P

5.1 Forza dei leganti

Le reazioni di complessamento tra Fe(III) e il legante (L) di tipo 4H3P sono :



La reazione *a*) è relativa ai leganti con l'azoto metilato mentre la *b*) a quelli con l'azoto protonato. La forza dei leganti può essere valutata dalla quantità di Fe(III) libero rimasto dopo la reazione di complessamento con la molecola d'interesse. Nella figura 5.1 sono riportati i valori di pFe (= -log[Fe(III)]) in funzione del pH : più pendente è la curva e più forti saranno i complessi che il relativo legante formerà con Fe(III).

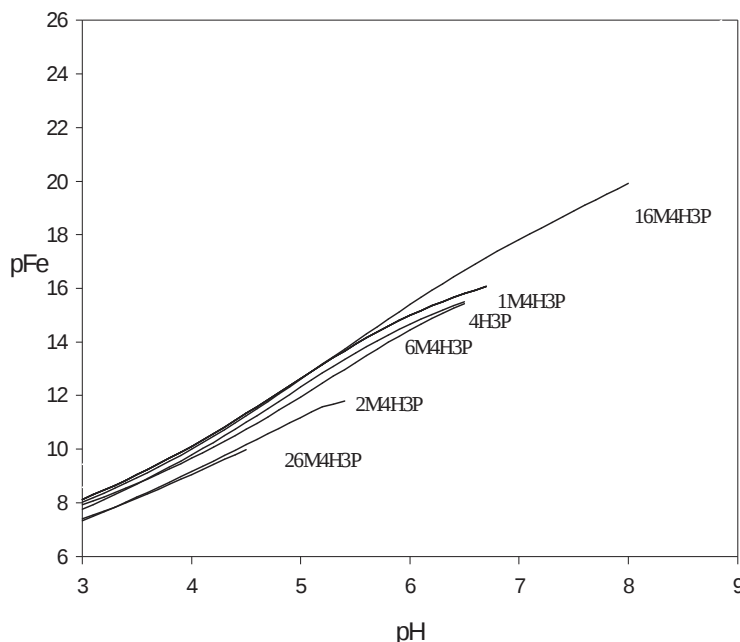


Figura 5.1 : Andamento di pFe per vari leganti ($[Fe]_0 = 10^{-6} m$, $[L]_0 = 5 \cdot 10^{-6} m$) in funzione del pH

Come si può osservare dall'andamento di pFe i derivati con l'azoto metilato sono quelli che presentano una capacità complessante migliore, a seguito dell'effetto induttivo della carica positiva sull'azoto nel legante N-metilato, che favorisce la dissociazione dell'idrogeno nell'ossidrile in posizione 4, e al fatto che la deprotonazione avviene in una molecola neutra. La metilazione delle posizioni 2 e/o 6 ha portato ad una notevole diminuzione della forza chelante rispetto al derivato non sostituito. Tali effetti possono essere spiegati considerando che la molecola di legante coordinata al centro metallico mantiene un certo carattere chinoide (vedi cap. 1.2 e 1.3), che ha un'affinità minore nei confronti di ioni metallici rispetto alla forma aromatica (l'ossigeno chetonico presenta una minor carica parziale negativa rispetto all'ossigeno ossidrilico). La forma chetonica è favorita quando sull'anello sono presenti sostituenti elettron-donatori. Per il nostro studio abbiamo preso in esame due leganti di opposta forza (tra quelli disponibili) e cioè 16M4H3P e 2M4H3P.

5.2 Scelta delle condizioni

La scelta del pH ottimale può essere motivata dall'osservazione dei diagrammi di distribuzione dei complessi Fe(III)-16M4H3P e Fe(III)-2M4H3P. Le figure 5.2a e 5.2b riportano i diagrammi di distribuzione di questi complessi per una soluzione di Fe(III) 0.3 mM e 1.21 mM di legante.

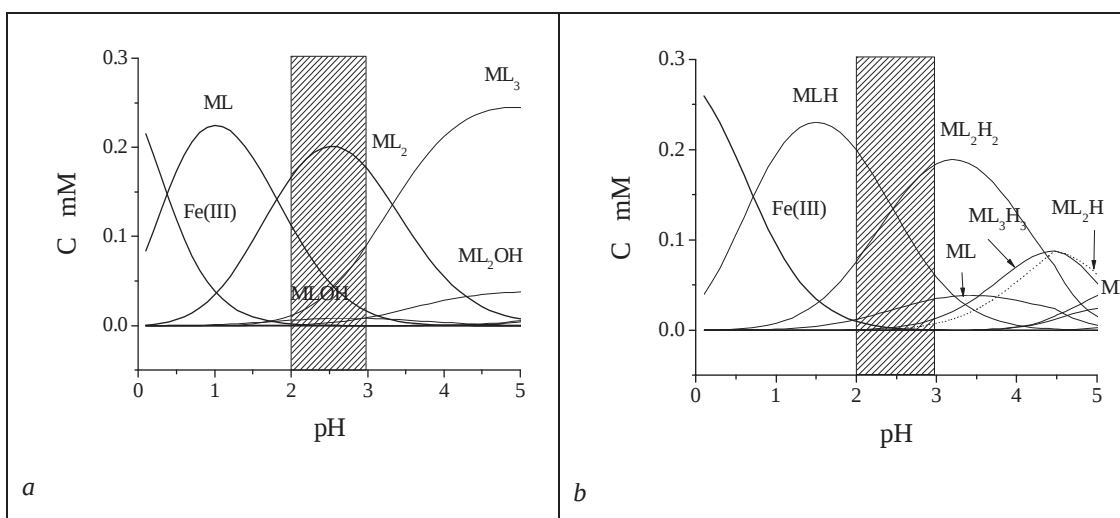


Figura 5.2 Diagrammi di distribuzione del sistema Fe(III)/L con 0.3 mM Fe(III) e 1.21 mM L. (a) L=16M4H3P; (b) L=2M4H3P.

Le aree ombreggiate dei diagrammi indicano gli intervalli di pH più idonei ai nostri scopi. Per $\text{pH} > 3$, la formazione delle specie idrate del Fe(III) e, al limite, la precipitazione di $\text{Fe}(\text{OH})_3$ diventano fenomeni non più trascurabili, mentre a $\text{pH} < 2$ la concentrazione del solo Fe(III) è prevalente su quella dei complessi Fe(III)/L. Nell'intervallo di pH tra 2 e 3 le specie chimiche che si presentano stabili a concentrazioni percentualmente rilevanti ($> 5\%$) sono quelle indicate in tabella 5.1.

Tabella 5.1 : Specie rilevanti nell'intervallo di pH tra 2 e 3 per il sistema Fe(III)/16M4H3P

$M=\text{Fe(III)},$ L	maggiori del 5%				minori del 5%		
16M4H3P	M	ML	ML ₂	ML ₃	MLOH	ML ₂ OH	
2M4H3P	M	ML	MLH	ML ₂ H ₂	ML ₂ H	ML ₃ H ₃	ML ₂

Specie in concentrazione inferiori al 5% non sono state considerate perché inferiori al limite massimo scelto per l'errore sperimentale e perciò nelle discussioni che seguiranno solo le specie con concentrazioni maggiori del 5% sono ritenute sufficienti a spiegare il comportamento complessivo dei dati sperimentali. 16M4H3P ha un'affinità maggiore del 2M4H3P con il Fe(III), e complessi di pari rapporto stechiometrico M : L si formano a più bassi pH. Un buon valore di pH per l'16M4H3P può essere facilmente dedotto dalla figura 5.3 che mostra le voltammetrie idrodinamiche del sistema di figura 5.2a al variare del pH. La curva a pH = 2.30 coglie l'informazione relativa ai complessi ML e ML₂. Valori di pH più bassi fanno emergere le specie M e ML mentre a pH più elevati le specie complesse ML₂ e ML₃. Quest'ultima condizione è la meno informativa dal punto di vista elettrochimica poiché un elevato numero di L nel complesso porta il potenziale di riduzione della specie al di fuori dell'intervallo dove la misura è ritenuta "pulita". Si noti come già a potenziali minori di -0.20V la corrente di fondo (background) inizia a scendere in maniera rilevante e lavorando con concentrazioni basse di analita emergono più facilmente eventuali tracce di ossigeno presenti in soluzione addizionati a fenomeni di superficie evidenti sotto i -0.30V soprattutto ai pH più alti.

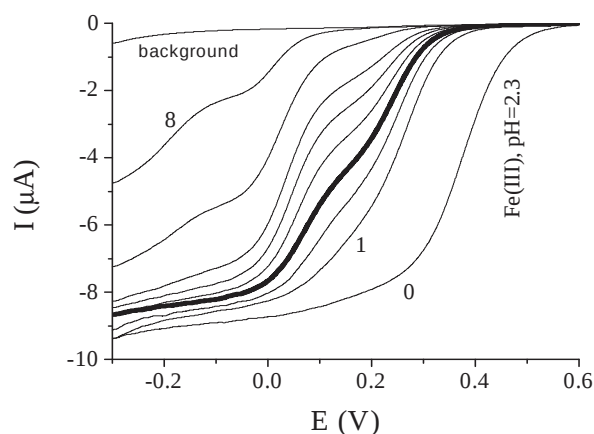


Figura 5.3 : Voltammetrie idrodinamiche di una soluzione di Fe(III) 0.3 mM e 16M4H3P 1.21 mM al variare del pH; curva n°0 è solo Fe(III), curve n° da 1 a 8: pH = 1.60, 2.00, 2.30, 2.50, 2.75, 3.00, 3.50, 4.00 rispettivamente. Condizioni sperimentali : $v=10$ mV/s, da 0.6V a -0.3V ottenute con un elettrodo rotante di GC (3 mm), riferimento SCE in condizioni idrodinamiche (rpm=1000) e fondo solfato;

Nel caso del 2M4H3P è necessario tenere valori di pH più alti per poter caratterizzare il maggior numero di specie elettroattive (pH = 3). Purtroppo gli svantaggi di lavorare a un pH al limite della solubilità del Fe(III) (vedi cap. 4.2) ha dato problemi di riproducibilità.

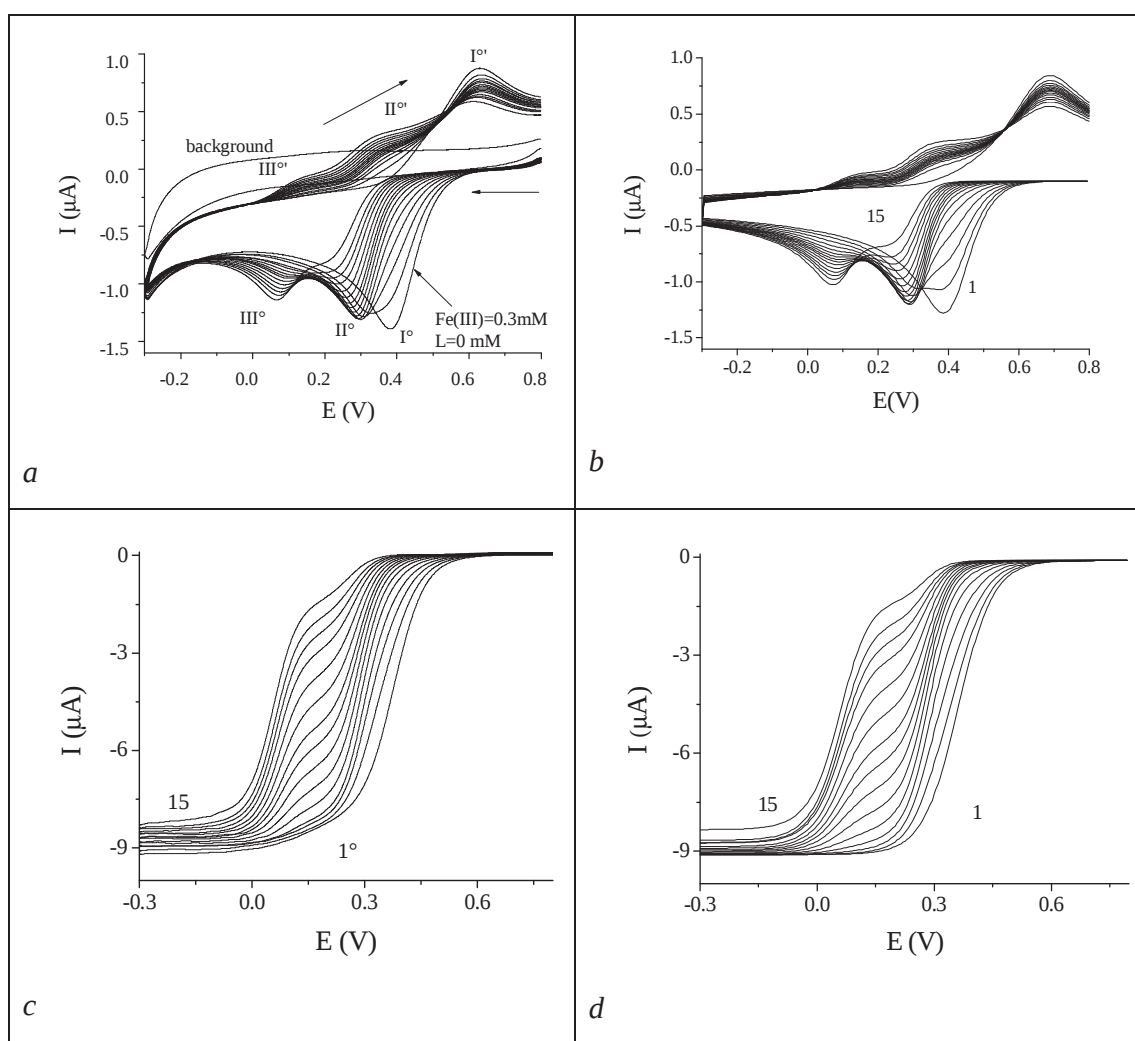
5.3 Determinazione di parametri termodinamici e cinetici del sistema Fe(III)/ 16M4H3P

5.3.1 Effetto della concentrazione di legante sulle voltammetrie

Lo studio amperometrico dei complessi Fe(III) con i vari leganti è stato effettuato mediante voltammetrie cicliche diffusive (CV) e voltammetrie lineari (LV) idrodinamiche di una soluzione di Fe(III) alla quale venivano aggiunti volumi graduati di una soluzione “madre” del legante e osservando il responso voltammetrico per ogni soluzione a vari rapporti stechiometrici Fe(III) : L. I dati sperimentali ottenuti per CV diffusiva (figura 5.4a) mostrano il graduale consumo di Fe(III) visibile dall’abbassamento di I_{p_c} a circa 0.4 V mentre compaiono dei picchi imputabili alla riduzione dei complessi formati da Fe(III) e 16M4H3P. In particolare, i picchi (I), (II) e (III) della CV di figura 5.4a rappresentano le curve di riduzione nelle condizioni in cui predominano, rispettivamente, le reazioni 1, 2 e 3 di tabella 5.2 mentre i picchi (I’), (II’) e (III’) rappresentano i corrispondenti picchi di ossidazione. Le forme dei picchi di ritorno hanno un importante contributo di natura cinetica. I complessi del Fe(II) infatti non sono termodinamicamente molto stabili e all’equilibrio la loro concentrazione è molto bassa. Al potenziale in cui compaiono le onde (II’) e (III’) i complessi del Fe(II) che vengono ossidati sono rigenerati cineticamente dalla consistente presenza di Fe(II) e legante accumulati all’elettrodo ai potenziali di riduzione. Analogamente, nella LV idrodinamica (figura 5.4c) al diminuire del potenziale si osserva chiaramente la riduzione delle specie Fe(III), Fe(III)L, Fe(III)L₂ oltre a quella parziale di Fe(III)L₃.

Queste curve sperimentali sono state simulate con il meccanismo proposto nella tabella 5.2 attraverso il programma DIGISIM ottimizzando i valori di $E^{0'}$, α , k^0 , k_f e k_b (figure 5.4b e 5.4d) e confrontando ogni curva ottenuta con quella empirica per sovrapposizione con il programma Origin. Il potenziale formale $E^{0'}$ per la coppia redox Fe(III)L₃/Fe(II)L₃ non è conoscibile ma stimabile come inferiore a -0.29V. Così come l’ $E^{0'}$ anche k^0 è un valore non noto per questa coppia redox. La presenza di questa specie redox può essere facilmente dedotta dall’abbassamento della corrente limite osservata nella fig. 5.4c all’aumentare della concentrazione di legante. La sua quantificazione è comunque

incerta alle più basse concentrazioni di legante a causa della sua bassa concentrazione (inferiore al 5%) competitiva con quella di FeLOH e influenzata dalla presenza di un errore sperimentale. Le figure 5.4e and 5.4f rappresentano invece le derivate delle curve 5.4c e 5.4d, rispettivamente. Esse evidenziano due “punti di valle”(in prossimità di $E = 0.34$ V ed $E = 0.17$ V) tipici di equilibri tra due specie, e che indicano punti di flesso delle scansione idrodinamiche. L’informazione aggiuntiva delle derivate sarà chiara al cap. 5.3.2.



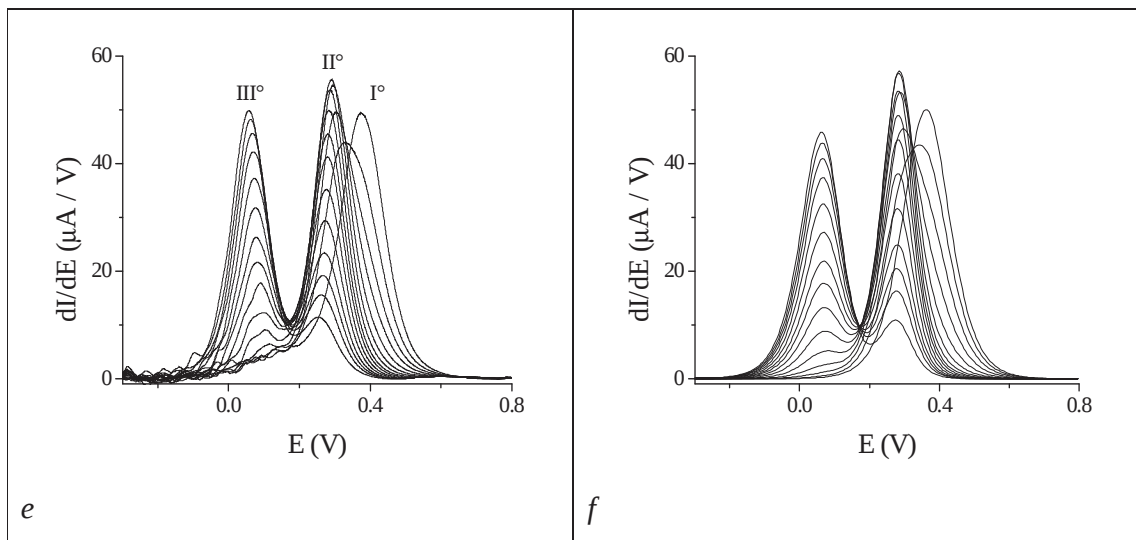


Figura 5.4 : (a) CV diffusive di soluzioni 0.3 mM di Fe(III) a pH 2.3 in fondo solfato in presenza di diversi valori di legante, mentre (b) rappresentano le corrispondenti curve simulate con il meccanismo di tabella 5.2; (c) e (d) sono le corrispondenti LV idrodinamiche e (e) e (f) sono le derivate prime di (a) e (b), rispettivamente. Le curve, da 1 a 15, si riferiscono alle concentrazioni di legante rispettivamente di 0, 0.07, 0.14, 0.21, 0.28, 0.35, 0.42, 0.49, 0.56, 0.67, 0.80, 1.00, 1.20, 1.47, 2.02 mM. Condizioni sperimentali: da 0.80 V a -0.30 V a 10mV/s dopo degasam. con N_2 per 5-7 min., w.e. GC; elettrodo di riferimento SCE; contro elettrodo di Pt, velocità di rotazione 1000 rpm.

Tabella 5.2 : Reazioni in fase eterogenea e omogenea con i parametri termodinamici e cinetici ottimizzati con il software di simulazione DIGISIM . Parametri della simulazione : $E_{start} = 0.8$ V, $E_{end} = -0.3$ V; $D = 6 \cdot 10^{-6}$ cm²/s; $C_{dl} = 1 \cdot 10^{-5}$ F; $R = 79$ Ohm; $r = 0.15$ cm ; $\omega = 104.67$ rad/s ; $v = 0.01$ V/s; $\nu = 0.01$ cm²/s ; $T = 298.2$ K

N	Reazioni in fase eterogenea	$E^{0'}$ (V) v. SCE	α	k^0 (cm ² ·s ⁻¹)
1	Fe(III) + e = Fe(II)	0.524*	0.57*	0.00012*
2	Fe(III)L + e = Fe(II)L	0.22*	0.57*	0.04*
3	Fe(III)L ₂ + e = Fe(II)L ₂	0.098*	0.57*	0.005*
4	Fe(III)L ₃ + e = Fe(II)L ₃	≤ -0.29***	0.57***	0.001***
	Reazioni in fase omogenea	K_{eq} (M⁻¹)	k_f (M⁻¹s⁻¹)	k_b (s⁻¹)
5	Fe(III) + L = Fe(III)L	$1.56 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^7$ *	0.032**
6	Fe(III)L + L = Fe(III)L ₂	$4.10 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^6$ *	0.22**
7	Fe(III)L ₂ + L = Fe(III)L ₃	$1.9 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$ ***	157.9**
8	Fe(II) + L = Fe(II)L	$1.14 \cdot 10^4$ **	$1 \cdot 10^7$ *	880**
9	Fe(II)L + L = Fe(II)L ₂	$3.36 \cdot 10^5$ ***	$8 \cdot 10^5$ *	2.25**
10	Fe(II)L ₂ + L = Fe(II)L ₃	0.7188**	$1 \cdot 10^6$ *	$1.39 \cdot 10^6$ ***
	Equilibri acido-base	K (M⁻¹)	k_f (M⁻¹s⁻¹)	k_b (s⁻¹)
11	L + H = LH	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^9$ *	$2.9412 \cdot 10^{-3}$ ***

* parametri sensibili;

** parametri bloccati dalle correlazioni;

*** parametri che non influenzano la simulazione ma necessari a far girare il programma;

Tutti gli altri valori sono noti da letteratura.

La tabella 5.3 mette a confronto la reazione di riduzione del solo Fe(III) ottenuto dalla simulazione con quello ottenuto sperimentalmente (cap. 4.5 - 4.6).

Tabella 5.3 : Confronto tra dato sperimentale e simulato per la reazione di riduzione del Fe(III).

Fe(III) + e = Fe(II)	$E^{0'}$ (V) v. SCE	α	k^0 (cm ² ·s ⁻¹)
<i>sperimentale</i>	0.530	0.57	$2.73 \cdot 10^{-4}$
<i>simulato</i>	0.524	0.57	$1.20 \cdot 10^{-4}$

Si può notare come questi parametri abbiano valori molto vicini tra loro. Le differenze sono imputabili, invece, sia al fatto che usiamo un'elettrolita diverso (solfati invece che cloruri, vedi cap. 4.3) sia ai lavaggi della superficie dell'elettrodo che fanno lievemente variare la velocità di trasferimento elettronico cosicché anche k^0 varia (comunque il valore è dello stesso ordine di grandezza).

5.3.2 Caratterizzazione delle curve sperimentali : risoluzione di un sistema di equazioni

L'uso della simulazione digitale richiede tempi molto lunghi per determinare i parametri caratterizzanti il sistema. Dunque, sono stati elaborati e sperimentati altri metodi di approccio per ottenere le stesse informazioni o in modo da ricavarne altre. Il primo di questi si basa sull'impostazione e risoluzione di un sistema di equazioni che permette di determinare le concentrazioni delle varie specie all'equilibrio direttamente dalle curve sperimentali idrodinamiche. Per far ciò, è necessario stimare gli intervalli di potenziale nei quali avviene il processo redox per ogni specie e questo può esser effettuato per due vie. La prima mediante l'uso del programma DIGISIM, seguendo i profili di concentrazione in funzione della distanza dall'interfase (l) per ogni specie (relative alle voltammetrie simulate) e annotando, per $l \rightarrow 0$, il potenziale di inizio del depauperamento e quello in cui la concentrazione è prossima a zero. Nel caso non si abbiano a disposizione le simulazioni, si può, più comodamente, ottenere le medesime informazioni dal grafico della derivata prima (figura 5.4e), individuando i potenziali tra un picco e l'altro ("punti di valle") dove la sovrapposizione della variazione di corrente dovuta alle differenti specie chimiche redox è minima. In queste zone di potenziale, il raggiungimento della corrente limite di una specie precede l'inizio della riduzione dell'altra. Lo schema di figura 5.5 rappresenta gli intervalli di potenziale redox determinati nei due modi suddetti e permette la scelta dei potenziali ottimali (E_i) da utilizzare nel successivo sistema di equazioni.

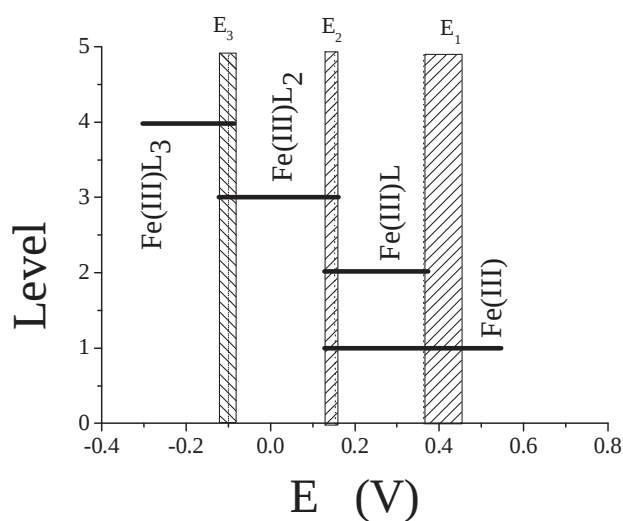


Figura 5.5 : Intervalli di potenziale in cui avvengono le riduzioni delle specie presenti in soluzione : i limiti destro e sinistro della linea continua indicano, rispettivamente, i potenziali a corrente zero e corrente limite, mentre gli intervalli tratteggiati individuano le zone ottimali per gli E_i .

Gli intervalli tratteggiati della figura 5.5 individuano le zone ottimali per gli E_i che possono essere così spiegati:

a) $0.37 < E_1 < 0.45 \text{ V}$

Condizione nella quale avviene solo la riduzione del Fe(III), cioè $I(E_1) = I(\text{Fe(III)})$. La scelta di questo potenziale deve essere minore di 0.45 V per evitare che il valore di corrente si avvicini al limite di rivelabilità;

b) $0.14 < E_2 < 0.18 \text{ V}$

Intervallo di potenziali in cui si ipotizza la completa riduzione di Fe(III) e di Fe(III)L, cosicché si può scrivere $I(E_2) \cong I_l(\text{Fe(III)}) + I_l(\text{Fe(III)L})$;

c) $-0.12 < E_3 < -0.08 \text{ V}$

Zona di plateau per la corrente di riduzione delle prime tre specie redox; perciò $I(E_3) \cong I_l(\text{Fe(III)}) + I_l(\text{Fe(III)L}) + I_l(\text{Fe(III)L}_2)$.

A potenziali inferiori a -0.12 V occorre considerare anche la riduzione della specie Fe(III)L_3 ma a $E < -0.3 \text{ V}$ non è possibile andare per i motivi già accennati (cap. 5.2) e perciò non si arriva a condizioni di corrente limite per Fe(III)L_3 .

Facendo l'ipotesi che i contributi cinetici siano trascurabili e disponendo dei potenziali opportuni (E_i) per i quali la corrente totale possa essere considerata come somma di correnti limite proporzionali alle concentrazioni all'equilibrio, allora è possibile costruire un sistema di equazioni per ricavare la concentrazione delle specie elettroattive all'equilibrio. Quando la sovrapposizione dei picchi è notevole come nel caso della coppia Fe(III) e Fe(III)L il problema può essere risolto impostando il sistema come segue:

$$\begin{cases} \frac{I(E_1)}{I^0(E_1)} \cdot I_l^0 = I_l(\text{Fe(III)}) \\ I(E_2) \cong I_l(\text{Fe(III)}) + I_l(\text{Fe(III)L}) \\ I(E_3) \cong I_l(\text{Fe(III)}) + I_l(\text{Fe(III)L}) + I_l(\text{Fe(III)L}_2) \\ I_l^0 = I_l(\text{Fe(III)}) + I_l(\text{Fe(III)L}) + I_l(\text{Fe(III)L}_2) + I_l(\text{Fe(III)L}_3) \end{cases} \quad (5.1)$$

In assenza di equilibri multipli, $I_l(\text{Fe}_j) = c[\text{Fe}_j]$ (con $[\text{Fe}_j]$ concentrazione della j -esima specie contenente Fe(III)) cosicché c (unità di misura $\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$) può essere ottenuto dalla misura di una concentrazione di Fe(III) nota. Il valore di c è unico per tutte le specie perché la corrente limite di una soluzione di Fe(III) ottenuto senza e con legante in soluzione è la stessa, indicante un singolo coefficiente di diffusione. Noto c il sistema può essere espresso in termini di concentrazioni:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{I(E_1)}{I^0(E_1)} \cdot I_l \cdot \frac{1}{c} \cong [\text{Fe(III)}] \\ I(E_2) \cdot \frac{1}{c} \cong [\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(III)L}] \\ I(E_3) \cdot \frac{1}{c} \cong [\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(III)L}] + [\text{Fe(III)L}_2] \\ I_l \cdot \frac{1}{c} = [\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(III)L}] + [\text{Fe(III)L}_2] + [\text{Fe(III)L}_3] = C_0 \end{array} \right. \quad (5.2)$$

E poi:

$$\left\{ \begin{array}{l} [\text{Fe(III)}] \cong \frac{I(E_1)}{I(E_1, L=0)} \cdot C_0 \\ [\text{Fe(III)L}] \cong \left(\frac{I(E_2)}{I_l} - \frac{I(E_1)}{I(E_1, L=0)} \right) \cdot C_0 \\ [\text{Fe(III)L}_2] \cong \left(\frac{I(E_3) - I(E_2)}{I_l} \right) \cdot C_0 \\ [\text{Fe(III)L}_3] \cong C_0 - ([\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(III)L}] + [\text{Fe(III)L}_2]) = \left(1 - \frac{I(E_3)}{I_l} \right) \cdot C_0 \end{array} \right. \quad (5.3)$$

che permette, in definitiva, la determinazione delle concentrazioni all'equilibrio delle varie specie a partire da ogni curva sperimentale. La figura 5.6 riporta le concentrazioni delle specie rilevanti ottenuti da dati termodinamici (linea continua), e dai valori ottenuti dal sistema risolto (5.3) usando come potenziali $E_1 = 0.37$ V, $E_2 = 0.15$ V, $E_3 = -0.10$ V (simboli).

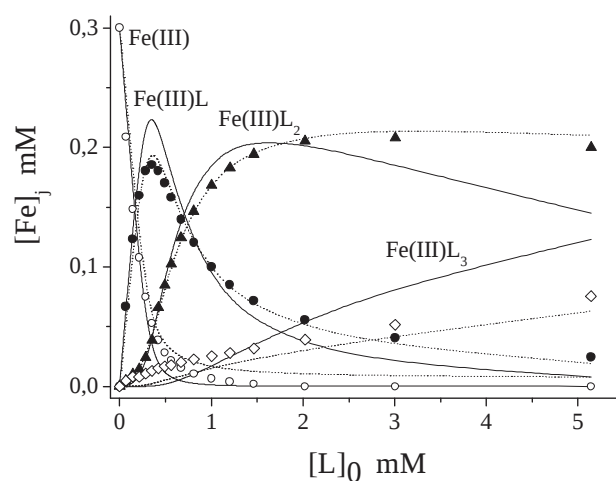


Figura 5.6 : Profilo della concentrazione delle specie rilevanti ottenute da dati termodinamici (linea continua) e dal sistema (5.3) usando $E_1 = 0.37$ V, $E_2 = 0.15$ V, $E_3 = -0.1$. Simboli: $\circ = \text{Fe(III)}$, $\bullet = \text{Fe(III)L}$, $\blacktriangle = \text{Fe(III)L}_2$ and $\diamond = \text{Fe(III)L}_3$; linea tratteggiata = ottenute con il sistema (5.3) dalle correnti dai profili di simulazione.

Le curve tratteggiate di figura 5.6 rappresentano la soluzione del sistema proposto utilizzando le correnti teoriche ottenute dalla simulazione, mentre i simboli rappresentano l'equivalente con i dati sperimentali. La buona sovrapposizione dei dati sperimentali con le linee tratteggiate comprova l'ottimo accordo della simulazione nell'interpretazione del dato sperimentale. I risultati ottenuti attraverso il sistema (simulato o sperimentale) non sono perfettamente identici a quelli termodinamici. Questa situazione è causata dal fatto che non esistono sempre dei valori di potenziale che risolvono il sistema proposto in modo che la corrente letta sia somma di contributi di corrente limite proporzionali alle concentrazioni di equilibrio. Tale condizioni nel caso dei complessi con 16M4H3P è abbastanza verosimile come dimostrato dalla figura 5.5. Il sistema è quindi ben posto quando è supportato da una sufficiente stabilità dei complessi in modo che le cinetiche delle loro dissociazioni siano abbastanza lente da non incorrere nell'errore associato al contributo cinetico. Per esempio si noti come ad alte concentrazioni di legante la specie Fe(III)L_2 mostri una concentrazione calcolata più alta di quella attesa dal valore termodinamico a causa del depauperamento in prossimità dell'interfase di questo complesso che influenza la dissociazione all'equilibrio del complesso Fe(III)L_3 ($k_{b7} = 157.9 \text{ s}^{-1}$, reazione 7 di tabella 5.2) producendo una corrente

limite non più proporzionale alla sola concentrazione di equilibrio di Fe(III)L₂. A basse concentrazioni di legante i dati sperimentali riescono ad interpretare bene quelli termodinamici grazie a una cinetica di dissociazione lenta della reazione 6 ($k_{b6} = 0.22 \text{ s}^{-1}$ in tabella 5.2). Questa tecnica può essere quindi utile poiché è un metodo veloce per stimare le costanti di complessamento delle specie elettroattive stabili e fornire una indicazione riguardo la forza relativa di specie omologhe differenti.

5.3.3 Caratterizzazione delle curve sperimentali : approccio matematico-empirico

Un altro metodo per determinare informazioni sul nostro sistema è stato quello di razionalizzare matematicamente le curve sperimentali di figura 5.4e con l'equazione di Koutecký-Levich:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{FAk_f C^*} + \frac{\delta}{DFAC^*} \quad (5.4)$$

Dove con $\delta = 1.61D^{1/3}\nu^{1/6}\omega^{-1/2}$ si intende lo strato di diffusione di Nernst mentre $k_f = k^0 \cdot \exp[-\alpha \cdot f \cdot (E - E^0)]$, con $f = F/RT = 38.92V^{-1}$ e C^* concentrazione di “bulk” all'equilibrio della specie elettroattiva. Le voltammetrie in condizioni idrodinamiche possono essere fittate conoscendo le concentrazioni di equilibrio delle specie redox j -esime dalla seguente equazione :

$$\Phi = \frac{i}{i_l} \approx \sum_{j=1} \frac{\frac{[Fe]_j/C_0}{0.62 \cdot D_j^{2/3} \cdot \omega^{1/2} \cdot \nu^{-1/6}}}{\frac{k_j^0}{k_j^0} \cdot e^{\alpha_j \cdot f \cdot (E - E_j^0)} + 1} \quad (5.5)$$

Il senso del circa è che si trascurano i contributi della cinetica sulla corrente totale. Ponendo $D_j = 5.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, $\nu = 0.01 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e $\omega = 104.67 \text{ rad/s}$ otteniamo:

$$\log(0.62 \cdot D_j^{2/3} \cdot \omega^{1/2} \cdot \nu^{-1/6}) = -2.37 \text{ e riarrangiando}$$

$$\Phi = \sum_{j=1} \frac{[Fe]_j / C_0}{10^{\alpha_j(E-E_j^{0'})/0.059-2.37-\log k_j^0} + 1} = \sum_{j=1} \frac{[Fe]_j / C_0}{10^{\alpha_j E / 0.059 - P_j} + 1} \quad (5.6)$$

Dove si è posto P_j :

$$P_j = \alpha_j \cdot E_j^{0'} / 0.059 + 2.37 + \log k_j^0 \quad (5.7)$$

Se sono note le concentrazione di equilibrio è possibile utilizzare l'eq. 5.6 per ricavare α_j e P_j sfruttando tutte le curve ottenute sperimentalmente variando [L]. Per esempio nel caso di L=16M4H3P abbiamo:

$$\Phi = \frac{1}{C_0} \left(\frac{[Fe(III)]}{10^{\alpha_1(E-E_1^{0'})/0.059-P_1} + 1} + \frac{[Fe(III)L]}{10^{\alpha_2(E-E_2^{0'})/0.059-P_2} + 1} + \frac{[Fe(III)L_2]}{10^{\alpha_3(E-E_3^{0'})/0.059-P_3} + 1} + \frac{[Fe(III)L_3]}{10^{\alpha_4(E-E_4^{0'})/0.059-P_4} + 1} \right) \quad (5.8)$$

Con l'utilizzo di algoritmi di tipo “simplex” si raggiunge lo scopo di ottenere α_j e P_j . Quest'ultimo parametro però non può essere scorporato nei termini $E_j^{0'}$ e k_j^0 , poiché sono correlati. Questa informazione ci dice che il “fitting” ottenuto con il simulatore non può essere sufficiente per definire univocamente questi parametri a meno che anche le curve degli esperimenti CV non vengano fittate con gli stessi dati in maniera corretta. Le forme CV sono infatti caratterizzate da una differente dipendenza da questi due parametri.

5.3.4 Costanti termodinamiche da stimare

Se vogliamo utilizzare l'espressione approssimata eq. 5.8 per ottenere le concentrazioni di equilibrio è necessario ottenere una stima dei valori di α_j e P_j per via empirica. Possiamo cercare una soluzione approssimata sfruttando il valore della posizione e dell'intensità dei massimi assunti dalla funzione derivata (figura 5.4e). Il potenziale E_j^M ,

dove la derivata prima della corrente è massima, è un punto caratteristico che può essere correlato al potenziale standard della coppia redox, $E_j^{0'}$, α_j e k_j^0 . Quando una specie redox prevale sulle altre (condizioni ideali sono L per il quale è massima la derivata prima) è possibile ricavare una relazione approssimata per E_j^M ponendo a zero la derivata seconda della funzione corrente eq. 5.6 contro il potenziale, la cui espressione è di seguito riportata:

$$E_j^M = E_j^{0'} + \frac{0.059}{\alpha} \cdot \log \left(\frac{k_j^0}{0.62nD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}} \right) \quad (5.9)$$

Si noti come la posizione del potenziale standard non è facilmente individuato dal potenziale massimo ricavato dal dato sperimentale ma è influenzato dalla velocità standard del trasferimento elettronico (e quindi da k_j^0), dal coefficiente di simmetria della barriera (α_j), dal coefficiente di diffusione D , dalla velocità di rotazione [ω (rad s⁻¹)] e dalla viscosità cinematica ($\nu \cong 0.01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, in acqua). Gli $E^{0'}$ calcolati con questa equazione sono molto vicini a quelli utilizzati nella simulazione per “fittare” i dati sperimentali (tabella. 5.4) (con α e k^0 utilizzati nella simulazione) a dimostrazione della robustezza dell’eq. 5.9 nel correlare questi parametri chimico-fisici.

Tabella 5.4 : Confronto degli $E^{0'}$ determinati con l’eq.5.9 rispetto a quelli di simulazione

n° picco	E_j^M	$E_j^{0'}$ simulato	$E_j^{0'}$ dall’eq.5.9 con k^0 della simulazione
I°	0.36	0.52	0.52
II°	0.29	0.22	0.20
III°	0.06	0.10	0.09

E’ ora possibile utilizzare questa equazione per ottenere una espressione per P_j priva dei parametri incogniti $E_j^{0'}$ e k_j^0 :

$$P_j = \alpha_j \cdot E_j^M / 0.059 \quad (5.10)$$

L'intensità del massimo della derivata prima permette di ottenere α_j . Il valore del massimo della derivata prima è legato alla concentrazione della specie all'equilibrio secondo la relazione approssimata seguente:

$$\left(\frac{d\Phi}{dE}\right)_j^M = \frac{D_j \cdot f^2 \cdot \ln 10 \cdot A \cdot \alpha_j \cdot [Fe]_j}{4 \cdot \delta \cdot i_l} \propto \alpha_j \cdot [Fe]_j \quad (5.11)$$

I valori più alti ottenuti sono quelli che corrispondono alle concentrazioni di legante che rendono massima la percentuale relativa associata alle singole specie, cioè $L = 0.0$ mM [Fe(III)=100%], $L = 0.28$ mM [Fe(III)L=75.4%] e $L = 2.0$ mM [Fe(III)L₂=92%] le percentuali sono ottenute dall'area dei picchi deconvoluti (figura 5.7). Il II° picco risulta più alto del III° a causa della sovrapposizione con il I° picco del Fe(III). Per conoscere quindi l'intensità effettiva dovuta alla j -esima specie è necessario “deconvolvere” i picchi in due o tre a seconda della situazione (concentrazione di L). Come si vede dalla figura 5.7, a causa della sovrapposizione evidente il II° picco è stato deconvoluto con tre picchi mentre il III° è stato deconvoluto in due picchi poiché la concentrazione di Fe(III) all'equilibrio è ormai nulla ed il suo E^M è sufficientemente lontano. (L'operazione di deconvoluzione è robusta solo in queste circostanze altrimenti sarebbe applicata a tutte le curve per ottenere le concentrazioni all'equilibrio). I risultati ottenuti con questo procedimento sono raccolti in tabella 5.5 .

Tabella 5.5 : Risultati di α_j e P_j ottenuti dopo deconvoluzione

n° picco	$[L]$ (mM)	$\frac{[Fe]_j}{C_0} \cdot 100$	E_j^M (V)	$i_l \cdot \left(\frac{d\Phi}{dE}\right)_j^M$ ($\mu A \cdot V^{-1}$)	α_j	P_j
I	0.00	100.0	0.36	49.2	0.58	3.54
II	0.28	75.4	0.29	34.5	0.54	2.65
III	2.02	92.0	0.06	46.5	0.59	0.64

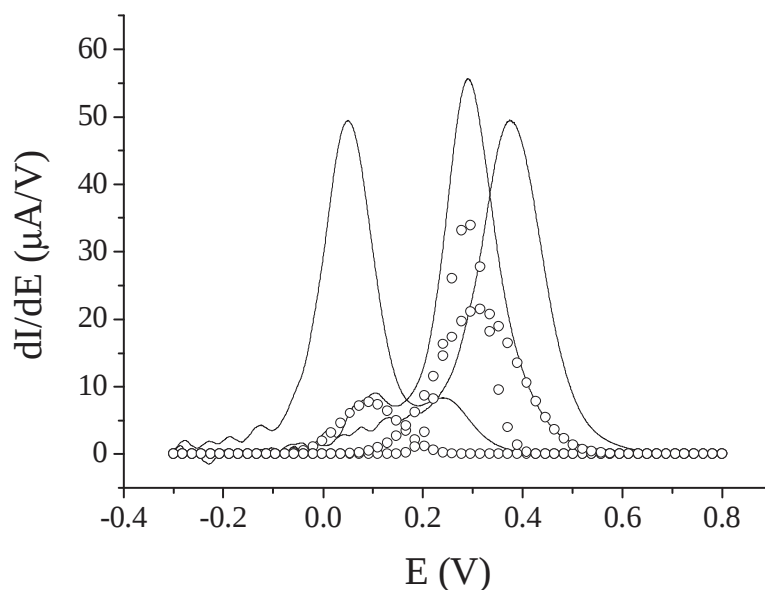


Figura 5.7 : Grafico della derivata prima nelle tre condizioni descritte nella tabella 5.5 con l'esempio di deconvoluzione del secondo picco in tre curve (simboli);

I valori di α_j sono prossimi a quelli determinati empiricamente e per simulazione [$\alpha_j = 0.57$]. Possiamo ora ottenere le concentrazioni all'equilibrio delle principali specie complesse (figura 5.8a) attraverso l'uso della seguente equazione dove viene trascurato il contributo di $Fe(III)L_3$ alla corrente totale a causa del suo basso potenziale di riduzione:

$$\Phi \approx \frac{1}{C_0} \cdot \left(\frac{[Fe(III)]}{10^{\alpha_1 \cdot E / 0.059 - P_1} + 1} + \frac{[Fe(III)L]}{10^{\alpha_2 \cdot E / 0.059 - P_2} + 1} + \frac{[Fe(III)L_2]}{10^{\alpha_3 \cdot E / 0.059 - P_3} + 1} \right) \quad (5.12)$$

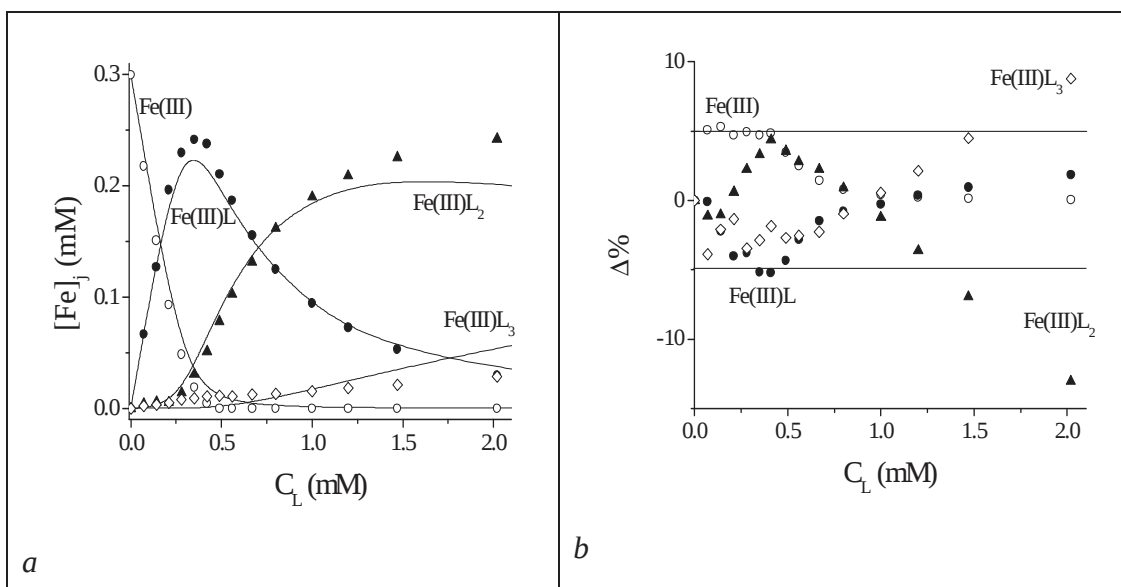
La concentrazione del complesso a stechiometria 1:3 può comunque essere ottenuto per differenza

$$[Fe(III)L_3] = C_0 - [Fe(III)] - [Fe(III)L] - [Fe(III)L_2] \quad (5.13)$$

E' possibile stimare (vedi figura 5.8c) le costanti di formazione dai dati sperimentali al variare della concentrazione di legante con:

$$K_j = \frac{[Fe]_j \cdot (C_L - [Fe(III)L] - 2 \cdot [Fe(III)L_2] - 3 \cdot [Fe(III)L_3])}{[Fe]_{j+1} \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{HL}}\right)} \quad (5.14)$$

Come è evidente dalla figura 5.8c, un dato buono è possibile solo per la seconda costante di formazione K_2 poiché coinvolge due specie $Fe(III)L$ e $Fe(III)L_2$ percentualmente concentrate. E' possibile quindi stimare pK_2 nell'intervallo di L tra 0.5-1.5 mM che è di 7.63(0.07) statisticamente uguale a 7.61 ricavato per via potenziometrica. E' possibile ricavare con più precisione anche pK_2 ripetendo gli esperimenti ad un valore di pH e per concentrazione di L in cui le specie $Fe(III)L_2$ e $Fe(III)L_3$ sono dominanti.



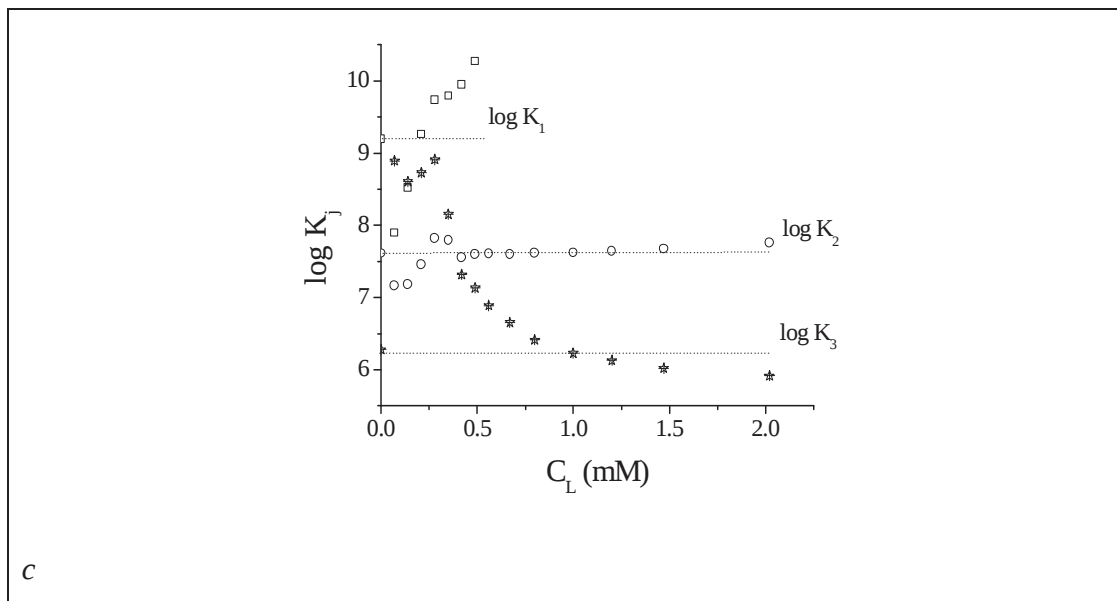


Figura 5.8 (a) Confronto della speciazione in funzione della concentrazione di legante (C_L), ottenuta da dati termodinamici (linea continua) e dalle curve di fitting di figura 5.4c usando le equazioni 5.12 e 5.13 (simboli); **(b)** differenza percentuale fra i dati termodinamici e calcolati in funzione di C_L ; Simboli : $\circ = \text{Fe(III)}$, $\bullet = \text{Fe(III)L}$, $\blacktriangle = \text{Fe(III)L}_2$ and $\diamond = \text{Fe(III)L}_3$; **(c)** valori di $\log K_j$ calcolati in funzione di C_L . Le linee tratteggiate sono valori ottenuti con titolazione potenziometrica;

La fig. 5.8b mette in evidenza l'effetto del contributo cinetico che causa l'errore sulla valutazione della concentrazione di equilibrio. La zona all'interno delle due linee continue è l'intervallo dell'errore del $\pm 5\%$ dovuto alla procedura di fitting. Quando la concentrazione di legante è maggiore di 1.2 mM il contributo cinetico diventa significativo (come già notato nel cap. 5.3.2). La maggiore concentrazione di Fe(III)L_2 ottenuta è spiegata dalla dissociazione di Fe(III)L_3 in favore di Fe(III)L_2 ; infatti tale specie è la meno stabile cineticamente avendo una k_b di 157.9 s^{-1} (vedi reazione n°7 tabella 5.2). I complessi si mostrano stabili cineticamente quando la concentrazione di legante è inferiore a 1.2 mM. La figura 5.8b ci permette quindi di affermare che le cinetiche di dissociazione dei complessi FeL_n con $n \leq 2$ sono lente rispetto ai tempi dell'esperimento.

5.4 Determinazione di parametri termodinamici e cinetici del sistema Fe(III)/ 2M4H3P

Gli approcci proposti nel cap. 5.3 sono stati applicati anche per lo studio del sistema Fe(III)/2M4H3P. Questo legante forma dei complessi con il Fe(III) più deboli (v. cap. 5.1) e quindi i rapporti stechiometrici Fe(III) : L risultano diversi al variare del pH.

In figura 5.9 sono raccolti i dati ottenuti dalle voltammetrie idrodinamiche e il confronto con i dati simulati.

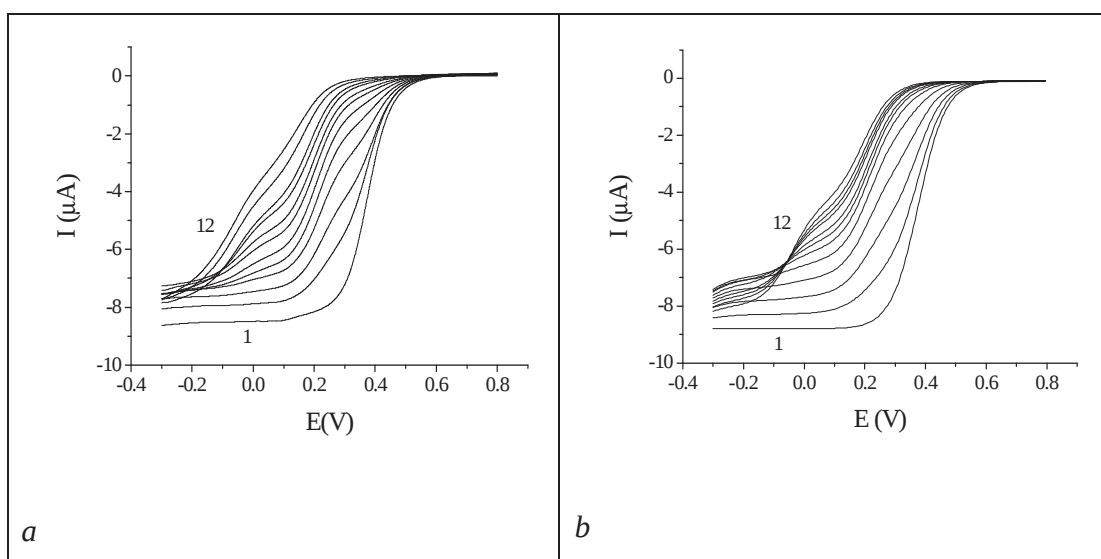


Figura 5.9. (a) Voltammetrie idrodinamiche di soluzioni 0.3 mM di Fe(III) a pH 3 in fondo solfato in presenza di diversi valori di legante, mentre la (b) rappresenta le corrispondenti curve simulate con il meccanismo di tabella 5.6. Le curve numerate da 1 a 12 si riferiscono alle concentrazioni di legante rispettivamente di 0, 0.07, 0.14, 0.21, 0.28, 0.35, 0.41, 0.48, 0.62, 0.70, 0.80, 1.00 mM. Condizioni sperimentali: da 0.80 V a -0.30 V a 10mV/s dopo degasam. con N₂ per 5-7 min., w.e. GC; elettrodo di riferimento SCE; contro elettrodo di Pt, velocità di rotazione 1000 rpm.

A differenza delle misure con 16M4H3P, in questo caso si osserva un abbassamento della corrente limite già a piccole aggiunte di legante e non si arriva a un plateau di corrente a -0.3 V dovuto alla somma di contributi delle specie in soluzione. Questo fenomeno può essere spiegato, principalmente ammettendo che si forma una specie che si riduce a un potenziale minore di -0.3 V. Secondo tale ipotesi è ragionevole ritenere questa specie Fe(III)L perchè ha una carica positiva in meno rispetto agli altri complessi predominanti e cioè Fe(III)LH e Fe(III)L₂H₂ (tutti protonati) e perciò è più “difficile” da

ridurre; di conseguenza formandosi a concentrazioni di legante basse e in quantità paragonabili a Fe(III)LH è giustificato l'abbassamento della corrente limite suddetta. Le simulazioni al DIGISIM (figura 5.9b) con il relativo meccanismo (tabella 5.6) approssimano bene i dati sperimentali anche se solo fino alla concentrazione di legante di 0.62mM.

Tabella 5.6 : Meccanismo proposto e parametri termodinamici e cinetici ottimizzati dalla simulazione : $E_{start} = 0.8$ V, $E_{end} = -0.3$ V; $D = 5.7 \cdot 10^{-6}$ cm²/s; $C_{dl} = 1 \cdot 10^{-5}$ F; $R = 79$ Ohm; $r = 0.15$ cm; $\omega = 104.67$ rad/s; $v = 0.01$ V/s; $V = 0.01$ cm²/s; $T = 298.2$ K.

n	Reazioni in fase eterogenea	$E^{0'}$ (V) v. SCE	α	k^0 (cm·s ⁻¹)
1	Fe(III) + e = Fe(II)	0.524*	0.57*	0.00016*
2	Fe(III)L + e = Fe(II)L	-0.18*	0.56*	0.0001*
3	Fe(III)LH + e = Fe(II)LH	0.35*	0.56*	0.00027*
4	Fe(III)L ₂ H ₂ + e = Fe(II)L ₂ H ₂	0.226**	0.56*	2·10 ⁻⁵ *
	Reazioni in fase omogenea	K_{eq} (M⁻¹)	k_f (M⁻¹s⁻¹)	k_b (s⁻¹)
5	Fe(III) + LH = Fe(III)LH	2·10 ⁷	1·10 ⁷ *	0.5**
6	Fe(III) + L = Fe(III)L	2.3·10 ¹⁵	3·10 ⁷ ***	1.304·10 ⁻⁸ **
7	Fe(III)LH + LH = Fe(III)L ₂ H ₂	3.7·10 ⁵	3·10 ⁶ *	8.1081**
8	Fe(II) + L = Fe(II)L	2909.7**	1·10 ⁹ ***	3.437·10 ⁵ **
9	Fe(II) + LH = Fe(II)LH	2.298·10 ⁴ **	1·10 ⁹ *	4.362·10 ⁴ **
10	Fe(II)LH + LH = Fe(II)L ₂ H ₂	3·10 ³ **	1·10 ⁶ *	3.333·10 ⁵ **
	Equilibri acido-base	K (M⁻¹)	k_f (M⁻¹s⁻¹)	k_b (s⁻¹)
11	L + H = LH	3.4·10 ¹¹	1·10 ⁹ *	2.941·10 ⁻³ **
12	LH + H = LH ₂	8·10 ⁴	1·10 ⁹ ***	1.25·10 ⁴ **

* parametri sensibili;

** parametri bloccati dalle correlazioni;

*** parametri che non influenzano la simulazione ma necessari a far girare il programma;

Tutti gli altri valori sono noti da letteratura.

Le concentrazioni delle varie specie dai dati sperimentali sono stati calcolati con lo stesso metodo descritto in 5.3.2 e quindi per mezzo di un sistema di equazioni.. In figura 5.10 sono visualizzate le zone di potenziale coinvolte nel processo, determinate seguendo i profili di concentrazione da DIGISIM.

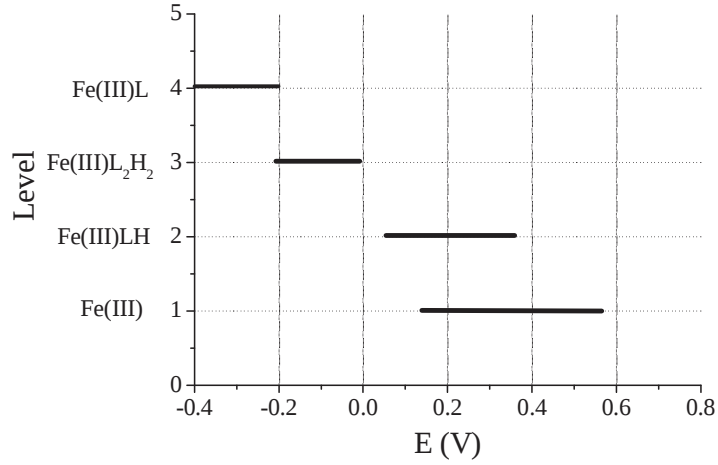


Figura 5.10: Intervalli di potenziale teorico relativi alle specie presenti in soluzione;

Il sistema di equazioni finale è del tutto simile a (5.3) :

$$\begin{cases} [\text{Fe(III)}] \cong \frac{I(E_1)}{I^0(E_1)} \cdot C_0 \\ [\text{Fe(III)LH}] \cong \left(\frac{I(E_2)}{I_l} - \frac{I(E_1)}{I^0(E_1)} \right) \cdot C_0 \\ [\text{Fe(III)L}_2\text{H}_2] \cong \left(\frac{I(E_3) - I(E_2)}{I_l} \right) \cdot C_0 \\ [\text{Fe(III)L}] \cong C_0 - ([\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(III)LH}] + [\text{Fe(III)L}_2\text{H}_2]) = \left(1 - \frac{I(E_3)}{I_l} \right) \cdot C_0 \end{cases} \quad (5.15)$$

Gli intervalli di potenziale scelti sono $E_1 = 0.35 \text{ V}$, $E_2 = 0 \text{ V}$, $E_3 = -0.2 \text{ V}$.

I profili di concentrazione dei dati sperimentali (simboli) e simulati (linea tratteggiata) calcolati secondo 5.15 e il confronto con il dato termodinamico (linea continua) sono visualizzabili in figura 5.11.

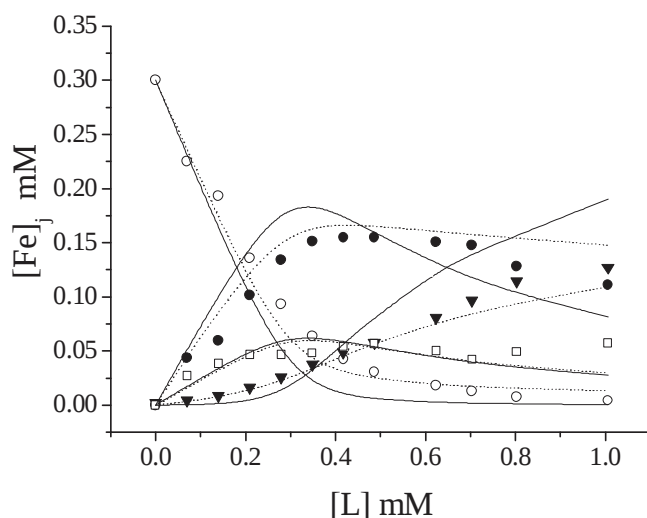


Figura 5.11 : Profilo della concentrazione delle specie ottenute da dati termodinamici (linea continua) e dal sistema (5.16) usando $E_1 = 0.37V$, $E_2 = 0.04V$, $E_3 = -0.20V$. Simboli: $\circ = Fe(III)$, $\bullet = Fe(III)LH$, $\blacktriangledown = Fe(III)L_2H_2$, $\square = Fe(III)L$, linea tratteggiata = ottenute con il sistema ricavando le correnti dai profili di simulazione.

I risultati dell'approccio matematico-empirico per questo legante sono raccolti nella tabella 5.7.

Tabella 5.7 : Risultati di α_j e P_j ottenuti dopo deconvoluzione per 2M4H3P

n° picco	$[L]$ (mM)	$\frac{[Fe]_j}{C_0} \cdot 100$	E_j^M (V)	$i_l \cdot \left(\frac{d\Phi}{dE} \right)_j^M (\mu A \cdot V^{-1})$	α_j	P_j
I	0.00	100.0	0.37	54.7	0.68	4.31
II	0.35	54.8	0.21	28.0	0.64	2.26
III	2.01	62.0	-0.08	22.4	0.45	-0.61

Si noti dalla tabella 5.7 come i valori di α siano sensibilmente diversi da quelli ottenuti sperimentalmente e dalla simulazioni (a differenza del caso di 16M4H3P). La causa di ciò sta principalmente per il fatto che: 1) non si è riuscito a determinare un valore di massimo della derivata per il terzo picco $[I(E_j^M)]$ cosicché i valori ottenuti a questo picco non sono attendibili; 2) si è utilizzato un valore di coefficiente di diffusione,

derivato dalla simulazione, più basso; 3) ci sono errori dovuti alle condizioni sperimentali.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi si è dimostrata la possibilità di ottenere rapidamente i valori di diversi parametri termodinamici e cinetici relative ai complessi di Fe(III) con due leganti 4-idrossi-3-piridin-carbossilici potenzialmente impiegabili nella terapia di chelazione (16M4H3P e 2M4H3P). In particolare, si è ottenuto preventivamente il valore del coefficiente di diffusione del Fe(III) ($D_{Fe}=5.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), quello della costante eterogenea di trasferimento elettronico ($k^0 = 2.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s}$), il coefficiente di simmetria ($\alpha=0.57$) e del potenziale standard ($E^{0'}=0.53 \text{ V vs. SCE}$). Da questi valori, con l'ausilio della simulazione digitale e di due metodi empirici elaborati "ad hoc" si sono determinati i potenziali standard e le costanti cinetiche relative alla formazione/dissociazione dei complessi sotto studio. I due approcci empirici sono stati basati: 1) sulla possibilità di "speciare" i composti di Fe(III) tramite la risoluzione di un sistema di equazioni; 2) sulla possibilità di trovare una equazione modello per le curve voltammetriche con la quale "fittare" le curve sperimentali (equazione di Koutecky-Levich). Per i complessi Fe(III)/L con L = 16M4H3P: $E^{0'} = 0.22 \text{ V vs. SCE}$, $k_b=0.032 \text{ s}^{-1}$, per il complesso Fe(III)L; $E^{0'}=0.098 \text{ V vs. SCE}$; $k_b=0.22 \text{ s}^{-1}$, per il complesso Fe(III)L₂; $E^{0'} \leq -0.29 \text{ V vs. SCE}$, $k_b=157.9 \text{ s}^{-1}$, per il complesso Fe(III)L₃. Per i complessi Fe(III)/L con L = 2M4H3P: $E^{0'} = 0.35 \text{ V vs. SCE}$, $k_b=0.5 \text{ s}^{-1}$, per il complesso Fe(III)LH; $E^{0'}=0.226 \text{ V vs. SCE}$; $k_b=8.11 \text{ s}^{-1}$, per il complesso Fe(III)L₂H₂; $E^{0'}=-0.18 \text{ V vs. SCE}$, $k_b=1.3 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, per il complesso Fe(III)L. I risultati ottenuti incoraggiano a estendere la sperimentazione ad altri derivati 4H3P. Per l'uso pratico di queste sostanze, dovranno esser fatti studi in soluzioni fisiologiche ed eventualmente, in vivo.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Pastore per la disponibilità sempre avuta nei miei confronti e per avermi offerto la possibilità di lavorare su un argomento di tesi interessante, e al dott. Denis Badocco, che è stata una guida fondamentale della mia ricerca in questi mesi e perché senza i suoi caffè offerti non so come avrei fatto.

Un doveroso ringraziamento va anche al dott. Di Marco perché ha risposto sempre esaurientemente ai miei dubbi e alla dott.ssa Annalisa Dean che ha sintetizzato i leganti.

Ringrazio la dott.ssa Laura Orian per i suoi buoni consigli.

Un grazie speciale a tutta la mia famiglia perché mi ha sempre sostenuto in tutti questi anni universitari, anche nei momenti più difficili.

Un pensiero va anche a tutti i ragazzi del quinto piano, Lucky Strike, Alberto e Andrea per la compagnia tenuta nel periodo di internato oltre a tutti gli altri compagni con cui ho condiviso l'avventura patavina in questi sei anni: Luca, Monica, Fede, Cate, Elena, Mara, Soly, Vale, Sandro, Nicola, Clau, Vane e tanti altri.

Ovviamente non posso dimenticarmi di tutti i miei amici trevisani : Ale, mio amico da una vita, Dave perché il suo spirito festaiolo è un sacro toccasana, le ragazze di Monte, il Pas e i Nigri per tutte le belle serate passate assieme, oltre a Sesto e il Cibo, che avanza non so quanti spritz.