



Società Chimica Italiana

La Chimica nella Scuola



Formazione di complessi di inclusione della β -ciclodestrina. Una dimostrazione colorimetrica

Marco Russo, Paolo Lo Meo, Michele A. Floriano

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche,
Università degli Studi di Palermo

marco.russo07@unipa.it; paolo.lomeo@unipa.it; michele.floriano@unipa.it

Riassunto

La chimica supramolecolare è uno dei settori della ricerca scientifica più attivi e fruttuosi, come testimoniato dal recente premio Nobel assegnato nel 2016 per gli studi su tale tematica. Tuttavia, non è sempre facile tradurre in termini didattici i concetti della chimica supramolecolare o, ancora di più, dare una prova evidente dell'instaurarsi di interazioni supramolecolari. Nel presente lavoro è proposta una procedura sperimentale che consente, in maniera semplice e diretta, di osservare la formazione e la successiva dissociazione di un complesso di inclusione supramolecolare tra la β -ciclodestrina, un'oligosaccaride ciclico con una struttura troncoconica che gli consente di includere al suo interno numerose molecole organiche, e la fenolftaleina, un indicatore acido base caratterizzato da una marcata variazione cromatica. In particolare, si propone una procedura sperimentale suddivisa in due fasi che prevede: i) la formazione del complesso di inclusione tra β -ciclodestrina e fenolftaleina che, sfruttando la caratteristica variazione di colore della fenolftaleina libera e complessata evidenzia la formazione del complesso; ii) il processo inverso, ovvero lo spiazzamento della fenolftaleina ad opera di un'altra molecola organica, l'adamantato di potassio, che compete con la fenolftaleina per la cavità della ciclodestrina.

Parole chiave: chimica supramolecolare, complesso di inclusione, β -ciclodestrina, fenolftaleina, adamantato di potassio.

Abstract

Supramolecular chemistry is one of the most exploited and fruitful research areas as demonstrated by the recent Nobel Prize awarded in 2016 for studies on this topic. However, it is not easy to translate supramolecular chemistry concepts into educational material or to provide clear evidence of supramolecular interactions. In this work an experimental procedure allowing, in a straightforward way, to observe the formation and subsequent dissociation of a supramolecular inclusion complex is proposed.

In particular, the complex between β -cyclodextrin, a cyclic oligosaccharide with a conical structure, and phenolphthalein, an acid-base indicator characterized by a marked chromatic change is considered. The experimental procedure consists of two phases: i) the formation of the inclusion complex is clearly shown by the characteristic colour variation of the free and complexed phenolphthalein; ii) the opposite process, i.e. the displacement of phenolphthalein from the cyclodextrin cavity by potassium adamantane-1-carboxylate is demonstrated by similar colour changes.

Key words: supramolecular chemistry, inclusion complex, β -cyclodextrin, phenolphthalein, potassium adamantane-1-carboxylate.

Introduzione

“La chimica delle interazioni deboli”, “la chimica delle interazioni non covalenti” o ancora “la chimica oltre la molecola” sono i modi più comuni con cui viene definita la chimica supramolecolare, il cui obiettivo è lo studio della formazione, delle proprietà e delle applicazioni degli aggregati plurimolecolari. La teorizzazione di uno dei primi concetti fondamentali della chimica supramolecolare risale a più di un secolo fa, quando nel 1894 Emil Fischer propose il principio “chiave-serratura” per spiegare l’interazione enzima substrato nella catalisi enzimatica [1]. Tuttavia soltanto negli ultimi decenni, ovvero da quando Cram, Lehn e Pedersen vinsero nel 1987 il premio Nobel per i loro studi sui carcerandi (molecole che per la loro struttura danno luogo ad interazioni altamente selettive) [2-4], la chimica supramolecolare ha avuto un’enorme diffusione nella ricerca scientifica. La chimica supramolecolare ha quindi conosciuto un enorme sviluppo considerando anche il fatto che la gran parte dei processi biochimici sono il frutto di interazioni deboli tra macromolecole; basti pensare al *fold*ing delle proteine o degli acidi nucleici, alle interazioni tra i domini costituenti gli enzimi, al *self-assembly* delle pareti cellulari, fino ad arrivare al complesso ATP sintasi che rappresenta a tutti gli effetti un esempio di “macchina molecolare”, che di fatto costituisce la massima espressione della chimica supramolecolare come testimoniato dal Nobel assegnato nel 2016 a Feringa, Sauvage e Stoddart proprio per i loro studi sulle macchine molecolari [5-7].

Storicamente, gli aggregati macromolecolari più rappresentativi e studiati sono stati i complessi di inclusione, o “cavitati”: questi sono il prodotto dell’interazione tra una molecola definita *host*, in cui è presente un sito recettoriale, e una molecola definita *guest* in grado di adattarsi a tale sito. Indipendentemente dalla natura delle interazioni coinvolte, come le interazioni elettrostatiche, legami a idrogeno, interazioni π - π e così via, l’*host* viene generalmente identificato come una molecola fornita di una ca-

vità o sito recettoriale con siti di legame convergenti mentre il *guest* è una molecola caratterizzata da siti leganti divergenti.

Le Ciclodestrine

Tra le numerose molecole di *host* fino ad oggi studiate, le *ciclodestrine* sono probabilmente le più rappresentative. Queste sono oligosaccaridi ciclici idrosolubili ottenuti dalla degradazione enzimatica dell'amido, costituiti da unità di glucopiranosio legate da ponti α -1,4 glicosidici e caratterizzate da una complessiva struttura tridimensionale a tronco di cono cavo [8,9]. Tra le ciclodestrine più comuni si annoverano la α -, la β - e la γ -ciclodestrina, che differiscono per il numero di unità glucosidiche che le costituiscono, rispettivamente 6, 7 o 8 (Figura 1). I bordi del tronco di cono sono caratterizzati dalla presenza di gruppi ossidrilici secondari legati ai C(2) e C(3) presenti sul bordo di diametro maggiore e primari legati ai C(6) presenti sul bordo di diametro minore. Le ciclodestrine presentano un certo grado di flessibilità (dinamismo conformazionale) da attribuire alla possibilità di una parziale rotazione intorno ai legami semplici che costituiscono i ponti α -1,4-glicosidici [10].

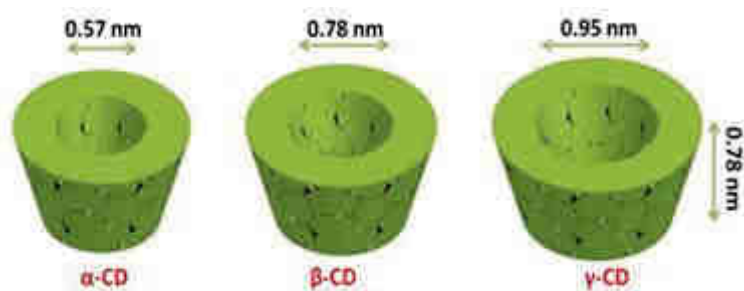


Figura 1. Strutture tridimensionali delle ciclodestrine più comuni.

La cavità interna (le cui dimensioni dipendono dal numero di unità glucosidiche che la costituiscono) ha un carattere idrofobico, in quanto sulla sua superficie sono presenti gli atomi di ossigeno dei ponti glicosidici oltre agli atomi di idrogeno legati ai C(3) e ai C(5). Inoltre il confinamento degli elettroni di non legame degli ossigeni glicosidi, all'interno della cavità, causa l'instaurarsi di un campo elettrico permanente che conferisce alla ciclodestrina un caratteristico momento dipolare avente il polo negativo diretto verso il bordo secondario (largo) e quello positivo diretto verso il bordo primario (stretto) [11].

Grazie alle loro caratteristiche strutturali, le ciclodestrine possono formare complessi di inclusione con molecole organiche di dimensioni e struttura

opportune [12,13]. Il processo di inclusione può essere considerato come una reazione di sostituzione delle molecole d'acqua (il tipico solvente per la formazione di complessi di inclusione ciclo-destrina-*guest*) incluse nella cavità della ciclodestrina da parte della molecola di *guest* che, a sua volta, si trasferisce dal mezzo acquoso in un ambiente idrofobico [14]. Tale trasferimento ha fondamentale importanza nella termodinamica del processo, tuttavia le forze che guidano la formazione del complesso sono date anche dalle interazioni non-covalenti tra la ciclodestrina e il *guest* quali interazioni di van der Waals, interazioni elettrostatiche o legami ad idrogeno [15]. La formazione di un complesso di inclusione con la ciclodestrina consente di veicolare agevolmente la molecola idrofobica nel mezzo acquoso. Tale caratteristica, insieme alla loro biocompatibilità e atossicità, rende le ciclodestrine dei composti estremamente interessanti da un punto di vista tecnologico/applicativo in svariati settori [16].

La formazione di un complesso di inclusione è normalmente accompagnata dalla variazione di una proprietà chimico-fisica specifica che consente di rilevarne e studiarne la formazione. Tra le proprietà comunemente rilevate si possono citare: variazioni calorimetriche, spostamento o variazione di intensità di segnali NMR, cambiamenti del potere ottico rotatorio e variazione degli spettri di fluorescenza o UV-vis. In quest'ultimo caso, se la variazione rientra nell'intervallo dello spettro visibile e quindi in una variazione cromatica, è possibile rilevare la formazione di un complesso ciclodestrina-*guest* anche ad occhio nudo. Di conseguenza, la realizzazione di un semplice esperimento che consenta di evidenziare la formazione di un complesso di inclusione, in seguito ad una evidente variazione di colore, assume un'indubbia valenza didattica.

Nel presente lavoro viene proposto un semplice esperimento che consente di verificare qualitativamente la formazione di un complesso di inclusione tra la β -ciclodestrina (β CD) e la fenoltaleina (PHP), sfruttando la variazione di colore della PHP libera che in soluzioni basiche è di colore rosso-violetto e la PHP complessata nella β CD che è incolore. Inoltre sfruttando un *guest* in grado di competere con la PHP per la cavità della β CD, nel caso specifico l'adamantato di potassio (Ada), è anche possibile mettere in evidenza l'equilibrio competitivo collegato alla differente affinità dei *guest* per la cavità della β CD in funzione della loro struttura e delle interazioni che entrano in gioco.

Complessi della β -ciclodestrina con la fenoltaleina e sostituzione con adamantato di potassio

Come è noto la PHP (3,3-*bis*(4-idrossifenil)-2-benzofuran-1(3*H*)-one) è un classico indicatore acido base con un intervallo di viraggio compreso tra 8.2 e 9.8. La sua forma acida (Figura 2) è incolore mentre in soluzione basi-

ca si forma un dianione (Figura 2) dal caratteristico colore rosso-violetto. La caratteristica colorazione è dovuta al fatto che gli ossidrili fenolici deprotonati in ambiente basico promuovono l'apertura dell'anello lattonico formando un sistema π -coniugato con una maggiore estensione che assorbe nel visibile.

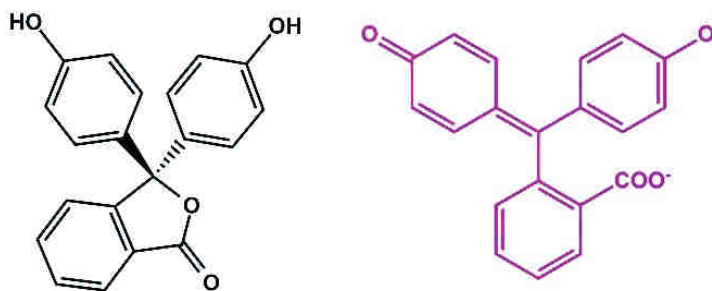


Figura 2. Struttura della PHP; a sinistra la forma incolore, a destra la forma colorata

La PHP forma un complesso di inclusione di stechiometria 1:1 con la β CD secondo la reazione:



Per la costante di complessazione sono stati riportati valori compresi nell'intervallo $(2.1 \sim 3.1) \cdot 10^4$ a 25°C [17,18]. Una costante di complessazione così alta implica che all'equilibrio la quantità di PHP libera sia trascurabile rispetto a quella complessata per sufficiente aggiunta di ciclodestrina. Inoltre il complesso in soluzione basica è incolore in quanto l'inclusione della PHP nella cavità della β CD blocca l'apertura dell'anello lattonico conseguente alla deprotonazione degli ossidrili fenolici, interrompendo la coniugazione del sistema- π che è presente nella forma anionica libera dell'indicatore. Quindi, se viene aggiunta una quantità crescente di β CD ad una soluzione basica ($\text{pH} \sim 11$) contenente PHP, si osserverà un progressivo sbiadimento della caratteristica colorazione rosso-violetto fino alla sua quasi totale scomparsa.

Se a questo punto nel processo interviene un altro *guest*, anch'esso in grado di formare un complesso di inclusione con la β CD, secondo il principio di Le Châtelier l'equilibrio si sposterà nel verso che consente di minimizzare la perturbazione.

Anche l'Ada (adamantato di potassio, Figura 3) è in grado di formare un

complesso di inclusione stabile con la β CD secondo l'equilibrio:



Per la costante di complessazione sono stati riportati valori compresi nell'intervallo $(1.0 \sim 4.0) \cdot 10^4$ a 25°C [13]. In questo caso tutte le specie presenti in soluzione sono incolori. Aggiungendo quindi una soluzione di Ada ad una contenente il complesso PHP- β CD, si osserverà un aumento della colorazione rosso-violetto della soluzione risultante, dovuto all'aumento della PHP libera che deriva dalla dissociazione del complesso PHP- β CD a causa della competizione dell'Ada con la PHP per la cavità della ciclodestrina.

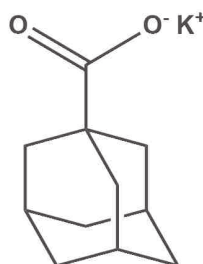


Figura 3. Struttura dell'adamantato di potassio.

Di seguito viene descritta un'attività sperimentale in cui, tramite l'osservazione di cambiamenti di colore della soluzione, che sono il risultato della variazione di concentrazione della PHP libera, è possibile illustrare sia il processo di complessazione della PHP da parte della β CD sia la sua sostituzione da parte dell'Ada. Come già citato nell'introduzione i processi appena descritti possono simulare tra l'altro il rilascio controllato di farmaci.

Parte Sperimentale

La procedura sperimentale per dimostrare quanto esposto sopra può essere suddivisa in due parti. Nella prima parte dell'esperimento vengono preparate soluzioni a concentrazione costante di PHP a ciascuna delle quali viene aggiunta una quantità crescente di β CD. Nella seconda parte vengono preparate soluzioni con la stessa composizione della soluzione della serie precedente in cui è stata aggiunta la massima concentrazione di β CD, a ciascuna delle quali viene aggiunta una quantità crescente di Ada. Per effettuare tale procedura occorrono:

Reattivi

- Carbonato di sodio (Na_2CO_3 ; PM: 105.99);
- Bicarbonato di Sodio (NaHCO_3 ; PM: 84.01);
- soluzione 0.1 M di NaOH;
- β -ciclodestrina ($\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$; PM: 1134.98);
- Fenoltaleina ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$; PM: 318.32 - N.B. questa sostanza ha destato nel passato preoccupazioni riguardo i suoi potenziali effetti mutageni e cancerogeni se ingerita. Tuttavia, le minime quantità utilizzate e l'uso delle normali precauzioni di sicurezza in laboratorio minimizzano i potenziali rischi);
- Adamantato di potassio ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{KO}_2$; PM: 218.33). Questo può essere sintetizzato in anticipo a partire da ~1g di acido adamantilico ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$; PM: 180.24) solubilizzato nella minima quantità di etanolo e trattato con 60 mg di KOH (PM: 56.11), anch'esso solubilizzato nella minima quantità di etanolo. Il precipitato bianco ottenuto viene quindi filtrato e lasciato asciugare inizialmente all'aria, fino a completa secchezza, e poi in stufa per una notte.

Vetreteria

- cilindro graduato da 500 mL
- 3 matracci tarati da 20 mL
- matraccio tarato da 50 mL
- 10 beute da 25 mL
- pipetta tarata o graduata da 1 mL
- pipetta graduata da 10 mL

Preparazione delle soluzioni

- tampone carbonato 0.05 M pH ~11: trasferire 2.210g di Na_2CO_3 e 350 mg di NaHCO_3 in un cilindro graduato da 500 mL e portare a volume con acqua distillata. Verificare il pH della soluzione con un pH-metro o con cartina al tornasole e, se necessario, correggere fino al valore voluto per aggiunta di NaOH o HCl.
- soluzione madre di PHP $1.25 \cdot 10^{-3}$ M: trasferire 8 mg di PHP in un matraccio tarato da 20 mL e solubilizzare con 1.5 mL di NaOH 0.1 M, quindi portare a volume con acqua distillata.
- soluzione madre di β CD $2.5 \cdot 10^{-3}$ M: trasferire 142 mg di β CD in un matraccio tarato da 50 mL e portare a volume con il tampone carbonato.
- soluzione madre 1 Ada $1.26 \cdot 10^{-2}$ M: trasferire 55 mg di Ada in un matraccio tarato da 20 mL e portare a volume con il tampone carbonato.

e) soluzione madre 2 Ada $6.3 \cdot 10^{-4}$ M: diluire 1 mL della soluzione madre 1 Ada in un matraccio tarato da 20 mL con il tampone carbonato.

Esperimento 1

Aggiungere in cinque beute, contrassegnate con le lettere da A ad E, 1 mL di soluzione madre di PHP e i volumi delle altre soluzioni riportati in tabella 1. Le ultime due colonne della tabella riportano le concentrazioni totali di PHP e β CD.

Tabella 1. Volumi delle soluzioni da usare per l'esperimento 1 e concentrazioni risultanti.

Beute	β CD (mL)	Tampone (mL)	[PHP] (10^{-5} M)	[β CD] (10^{-4} M)
A	0	24	5.0	0
B	1	23	5.0	1
C	2	22	5.0	2
D	4	20	5.0	4
E	6	18	5.0	6

Come è possibile osservare nella figura 4, si ha una progressiva riduzione della colorazione rosso-violetto al crescere della concentrazione totale di β CD presente che indica la progressiva complessazione della PHP e quindi la diminuzione di quella libera.¹



Figura 4. Progressiva complessazione della PHP da parte della β CD.

N.B.: le soluzioni preparate nelle beute devono essere chiuse con del parafilm perché, anche se tamponate, l'assorbimento di anidride carbonica potrebbe diminuirne il pH causandone lo schiarimento.

Esperimento 2

Aggiungere in cinque beute, contrassegnate con le lettere da A' ad E', 1 mL di soluzione madre di PHP, 6 mL di soluzione madre di β CD e i volumi

delle altre soluzioni riportati in tabella 2. Le ultime tre colonne della tabella riportano le concentrazioni totali di PHP, β CD e Ada.

Tabella 2. Volumi delle soluzioni da usare per l'esperienza 2 e concentrazioni risultanti.

Beute	Ada (mL)	Tampone (mL)	[PHP] (10^{-5} M)	[β CD] (10^{-4} M)	[Ada] (10^{-3} M)
A'	10 ¹	8	5.0	6	5
B'	1 ¹	17	5.0	6	0.5
C'	10 ²	8	5.0	6	0.25
D'	1 ²	17	5.0	6	0.025
E'	0	18	5.0	6	0

1: Soluzione madre 1Ada

2: Soluzione madre 2Ada

Come mostrato in figura 5, al crescere della concentrazione di Ada si osserva un progressivo aumento di intensità della colorazione rosso-violetto che indica il progressivo aumento della concentrazione di PHP libera spiazzata dal complesso PHP- β CD. Si può osservare che il cambiamento di colore segue un andamento inverso rispetto alle soluzioni ottenute nel primo esperimento come è possibile verificare mettendo a confronto le coppie di soluzioni con la stessa denominazione di base che presentano circa la stessa intensità di colore.¹



Figura 5. Progressiva sostituzione della PHP, nel complesso con la β CD, da parte di Ada.

Appendice

Una versione quantitativa dell'esperimento [19] appena descritto può essere realizzata nel caso in cui si abbia a disposizione uno spettrofotometro UV-vis che consenta di misurare l'assorbanza A della soluzione che, come è noto, è legata alla concentrazione della specie cromofora (in questo caso la PHP) dalla relazione di Lambert-Beer: $A = \epsilon[\text{PHP}]l$. La lunghezza d'onda del

massimo di assorbimento della PHP è $\sim 550 \pm 2$ nm.

Come si può osservare in figura 6, la variazione di assorbanza in funzione della concentrazione di Ada, di una soluzione contenente il complesso PHP- β CD, è lineare almeno nelle seguenti condizioni:

[PHP] $\sim (4-5) \cdot 10^{-5}$ M; [β CD] $\sim (3-4) \cdot 10^{-4}$ M; [Ada] $\sim (2-5) \cdot 10^{-4}$ M

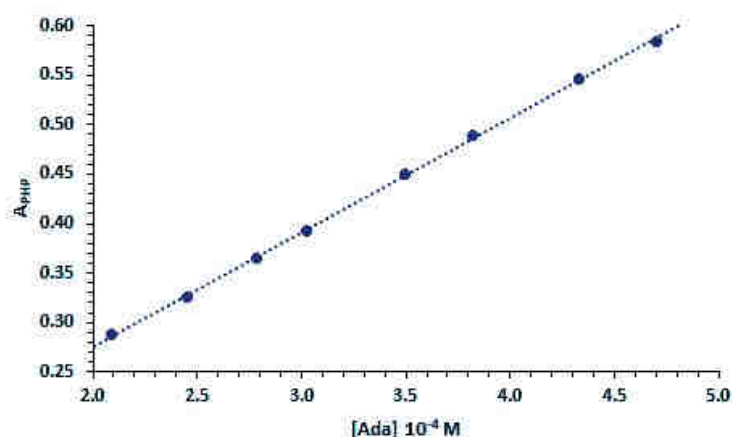


Figura 6. Assorbanza A_{PHP} di soluzioni a concentrazione fissa di [PHP]: $4.3 \cdot 10^{-5}$ M e [β CD]: $3.4 \cdot 10^{-4}$ M a concentrazione variabile di Ada.

In queste condizioni infatti la concentrazione della PHP spiazzata dal complesso è direttamente proporzionale a quella di Ada aggiunto. Dalla retta ottenuta riportando i valori di assorbanza di soluzioni a concentrazioni note di Ada aggiunto, è possibile ricavare la concentrazione incognita di Ada di una ulteriore soluzione (purché questa ricada all'interno dell'intervallo predetto) misurandone l'assorbanza e ricavandone la concentrazione dalla retta.

Bibliografia

- [1] Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1894**, 27, 2985.
- [2] Cram, D.J., The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1988**, 27, 1009.
- [3] Lehn, J.-M., Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supramolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1988**, 27, 89.

- [4] Pedersen, C.J., The Discovery of Crown Ethers (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1988**, 27, 1021.
- [5] Feringa, B.L., The Art of Building Small: From Molecular Switches to Motors (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, **2017**, 56, 11060.
- [6] Sauvage, J.-P., From Chemical Topology to Molecular Machines (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, **2017**, 56, 11080.
- [7] Stoddart, J.F., Mechanically Interlocked Molecules (MIMs)—Molecular Shuttles, Switches, and Machines (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, **2017**, 56, 11094.
- [8] Szejtli, J., Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, **1998**, 98, 1743.
- [9] Saenger, W., et al., Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. *Chemical Reviews*, **1998**, 98, 1787.
- [10] Rees, D.A., Thom, D., Polysaccharide conformation. Part 10. Solvent and temperature effects on the optical rotation and conformation of model carbohydrates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1977**, 191.
- [11] Lichtenthaler, F.W., Immel, S., Molecular Modelling of Saccharides, 9!! On the Hydrophobic Characteristics of Cyclodextrins: Computer-Aided Visualization of Molecular Lipophilicity Patterns. *Liebigs Annalen*, **1996**, 1996, 27.
- [12] Connors, K.A., The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews*, **1997**, 97, 1325.