



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
In Chimica e Tecnologie Sostenibili
LM-54

Tesi di Laurea

**Studi teorici e sperimentali su ficocianobilina e suoi
derivati metallici**

Relatore

Ch. Prof. Marco Bortoluzzi

Correlatori

Ch. Prof. Matteo Gigli

Ch. Prof. Massimo Sgarzi

Laureando

Matteo Donati

Matricola 873903

Anno Accademico

2022/2023

“Non è la conoscenza, ma l'atto di imparare; non il possesso ma l'atto di arrivarci, che dà la gioia maggiore.”

Carl Friedrich Gauss, lettera a Wolfgang Bolyai, Gottinga 2 settembre 1808

Indice

1	INTRODUZIONE	1
1.1	FLUORESCENZA NELLE MOLECOLE ORGANICHE	1
1.2	FLUORESCENZA NELLE BIOMOLECOLE	4
1.3	FLUORESCENZA IN PORFIRINE E MACROCICLI CORRELATI	5
1.4	FICOCIANOBILINA	11
1.5	ULTERIORI RUOLI BIOLOGICI DELLA PCB	16
1.5.1	<i>Antiossidante</i>	16
1.5.2	<i>Antiinfiammatorio</i>	16
1.5.3	<i>Fattore anticancro</i>	17
1.6	DERIVATI METALLICI DELLA FICOCIANOBILINA	17
2	SCOPO DELLA TESI	18
3	PARTE SPERIMENTALE	19
3.1	MATERIALI E METODI	19
3.2	STRUMENTAZIONE	19
3.3	PURIFICAZIONE DELLA FICOCIANOBILINA (PCB)	20
3.3.1	<i>Caratterizzazione della PCB</i>	21
3.4	REAZIONI TRA PCB E PRECURSORI METALLICI	21
3.4.1	<i>Caratterizzazione di PCB:Zn</i>	22
3.4.2	<i>Caratterizzazione di PCB:Yb</i>	22
4	PARTE COMPUTAZIONALE	23
4.1	MODELLI MOLECOLARI	23
4.2	SUPERFICI DI ENERGIA POTENZIALE E OTTIMIZZAZIONE GEOMETRICA	23
4.3	METODI COMPUTAZIONALI	24
4.3.1	<i>Teoria DFT</i>	24
4.3.2	<i>Basis sets</i>	30
4.3.3	<i>Metodi e basis sets impiegati</i>	34
4.3.4	<i>Simulazione IR e termodinamica</i>	38
4.3.5	<i>Modelli di solvatazione</i>	42
4.3.6	<i>Time-Dependent DFT</i>	46
4.3.7	<i>Spostamento chimico NMR</i>	48
5	RISULTATI E DISCUSSIONE	50
5.1	ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE SPERIMENTALE DELLA PCB	50
5.2	MODELLO MOLECOLARE DI PARTENZA	53

5.3	CALCOLI SEMIEMPIRICI GFN2-XTB SULLA PCB	55
5.4	CALCOLI DFT SULLA PCB.....	59
5.4.1	<i>Ottimizzazione geometrica e simulazioni IR ed NMR.....</i>	59
5.4.2	<i>Strutture elettroniche fondamentali di singoletto e tripletto</i>	63
5.4.3	<i>Simulazioni TD-DFT.....</i>	67
5.5	STIMA DEI VALORI DI pK_a	70
5.6	RELAXED SURFACE SCAN E STUDIO DEL CONFORMERO ELICOIDALE.....	73
5.7	COMPLESSI METALLICI DELLA PCB	80
5.8	INDAGINE COMPUTAZIONALE SU POSSIBILI COMPLESSI DELLA PCB.....	84
6	CONCLUSIONI	92
7	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	93

1 Introduzione

1.1 Fluorescenza nelle molecole organiche

L'interazione ambientale degli organismi viventi si attua principalmente attraverso l'approvvigionamento dei nutrienti, la comunicazione tra individui di una popolazione o l'interazione tra specie diverse che condividono un habitat. Tutte queste forme di interazione si riconducono a necessità fisiologiche indotte da processi biochimici indispensabili per la vita, reazioni chimiche il cui obiettivo è generare un bilancio energetico complessivo positivo. Di vitale importanza risulta quindi la termodinamica di questi processi e, indirettamente, le proprietà fisico-chimiche delle biomolecole coinvolte. Tra le tante, alcune delle più interessanti sono le proprietà ottiche delle biomolecole, associate all'interazione con la radiazione elettromagnetica e in particolar modo con la luce. Queste proprietà si manifestano sotto forma di fenomeni di assorbimento ed emissione di radiazione elettromagnetica, questi ultimi indicati genericamente come luminescenza. Le proprietà di assorbimento sono legate all'eccitabilità delle molecole, mentre la luminescenza è in relazione con la capacità di liberare l'energia acquisita per via radiativa.

Alla base dell'interazione tra radiazione e materia vi è il trasferimento di energia sotto forma di fotoni a sistemi generalmente polielettronici, i quali modificano la propria geometria ed il proprio stato energetico con occupazione di stati quantici eccitati. I fenomeni luminescenti sono dovuti all'emissione di fotoni a causa del decadimento radiativo a partire da stati eccitati¹. La natura degli stati eccitati influenza il tempo di vita degli stessi e determina la tipologia di fenomeno luminescente². Ipotizzando uno stato fondamentale di singoletto, si parla di fluorescenza quando il decadimento radiativo è originato da uno stato eccitato di singoletto ed il tempo di vita rientra nell'ordine dei nanosecondi, diversamente dalla fosforescenza dove lo stato emittente è uno stato di tripletto (popolatosi ad esempio a seguito di *intersystem crossing*) ed il tempo di vita è dell'ordine dei microsecondi o superiore, arrivando in certi casi a raggiungere o superare l'ordine dei secondi¹. Questa differenza nei tempi di vita è dovuta al fatto che una transizione con cambio di molteplicità è proibita dalle regole di selezione.

Il decadimento radiativo non è l'unico meccanismo con cui l'energia accumulata in uno stato eccitato possa essere liberata. Gli stati energetici elettronici sono discreti, ma ogni stato elettronico possiede dei sottolivelli vibrazionali da cui avvengono fenomeni di rilassamento vibrazionale anche molto veloci (tempi tipici dell'ordine di 10^{-12} s)². Il rilassamento vibrazionale ha come conseguenza comune (anche se non assoluta) che una eventuale emissione avvenga dallo stato eccitato a minore energia (S1) indipendentemente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Questo comportamento, anche noto come regola di Kasha, è dovuto alla veloce dissipazione di parte dell'energia per decadimento vibrazionale, che porta la popolazione dai livelli superiori allo stato eccitato a più bassa energia¹. La regola di Kasha ha una buona validità in campo biologico¹ e ha come conseguenza la presenza di una singola banda di emissione per molecola^{1,2}.

A seguito dei fenomeni radiativi e non radiativi competitivi viene definita la resa quantica (Q), una grandezza adimensionale che rende conto del rapporto fra fotoni emessi ed assorbiti ed è in relazione con le costanti cinetiche dei processi di decadimento.

$$(1.1) \quad Q = \frac{\text{fotoni}_{emessi}}{\text{fotoni}_{assorbiti}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Nell'equazione (1.1) k_r e k_{nr} sono rispettivamente le costanti di velocità dei processi di decadimento radiativo e non radiativo¹. Considerando una cinetica del primo ordine le costanti avranno dimensioni di una frequenza e sono pertanto collegate al tempo di vita. Il tempo di vita τ dello stato eccitato ed il tempo di vita radiativo τ_r del fluoroforo sono legati alle costanti cinetiche secondo le equazioni (1.2) ed (1.3).

$$(1.2) \quad \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.3) \quad \tau_r = \frac{1}{k_r}$$

Il tempo di vita si misura nel dominio del tempo attraverso un breve impulso luminoso a cui segue il decadimento del segnale luminescente³. Riportando l'intensità della radiazione (F) contro il tempo si ottiene una curva di decadimento esponenziale, in accordo con l'equazione (1.4):

$$(1.4) \quad F(t) = F_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$F(t)$ è l'intensità di luce emessa in funzione del tempo, F_0 è l'intensità all'istante $t=0$, t è il tempo misurato e τ è il tempo di vita. Noti il tempo di vita e la resa quantica si può calcolare il tempo di vita radiativo τ_r tramite l'equazione (1.5)^{1,3}:

$$(1.5) \tau_r = \frac{\tau}{Q}$$

Nel caso in cui il sistema in esame presenti più stati o centri emettenti, è possibile rappresentare il decadimento come somma di esponenziali, ottenendo così più tempi di vita associabili a specie o meccanismi differenti^{4,5}.

Di vitale importanza risulta l'influenza della struttura vibrazionale del sistema e dell'intorno chimico. Ad esempio, i composti alifatici non presentano in genere fluorescenza a causa dei numerosi gradi di libertà vibrazionale della struttura molecolare, mentre le specie aromatiche, dotate di una caratteristica struttura ciclica e planare, non godono della stessa libertà vibrazionale e possono presentare fluorescenza. Un ruolo di grande rilevanza è giocato dal solvente, la cui interazione con la molecola in esame può stabilizzarne lo stato fondamentale o eccitato causando uno spostamento nella lunghezza d'onda di emissione². Una possibile interazione è la formazione di legami a idrogeno, che può favorire o spegnere (*quenching*) la fluorescenza a seconda della natura dello stato eccitato². Ad esempio, la chinolina dà fluorescenza in acqua ma non in cicloesano². Scelta del solvente e concentrazione possono inoltre rendere non trascurabile l'interazione dei fluorofori, i quali possono formare degli aggregati di molecole in stato eccitato e fondamentale detti eccimeri, con conseguente alterazione o spegnimento della luminescenza (*concentration quenching*)². La formazione di eccimeri può essere dimostrata studiando le variazioni spettrali degli spettri di emissione, mentre gli spettri di assorbimento non riflettono la presenza di aggregati di molecole in stato eccitato, dato che questi ultimi non si formano allo stato fondamentale².

Un'altra variabile, particolarmente importante nel caso di fluorofori di origine biologica investigati in soluzione acquosa, è il pH, dato che lo stato di protonazione o dissociazione di gruppi funzionali acidi o basici direttamente legati al sistema influenza la densità elettronica, variando così l'energia degli stati elettronici e alterando la lunghezza d'onda di emissione².

1.2 Fluorescenza nelle biomolecole

Tra i biopolimeri noti, solo le proteine presentano intrinseca fluorescenza. Il DNA ha una luminescenza talmente debole da essere trascurabile, mentre membrane lipidiche e polisaccaridi sono essenzialmente non fluorescenti¹. La maggior parte delle tecniche di indagine basate sulla luminescenza in campo biochimico sono pertanto focalizzate sull'intrinseca fluorescenza delle proteine, fenomeno legato alla luminescenza di alcuni amminoacidi.

La fluorescenza negli amminoacidi è in linea con quella dei comuni composti organici fluorescenti, ma dei venti amminoacidi proteinogenici standard solo tre manifestano fluorescenza e sono triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr)^{1,6}. È immediato notare dalla *Figura 1* che i tre amminoacidi presentano tre diversi gruppi sostituenti aromatici.

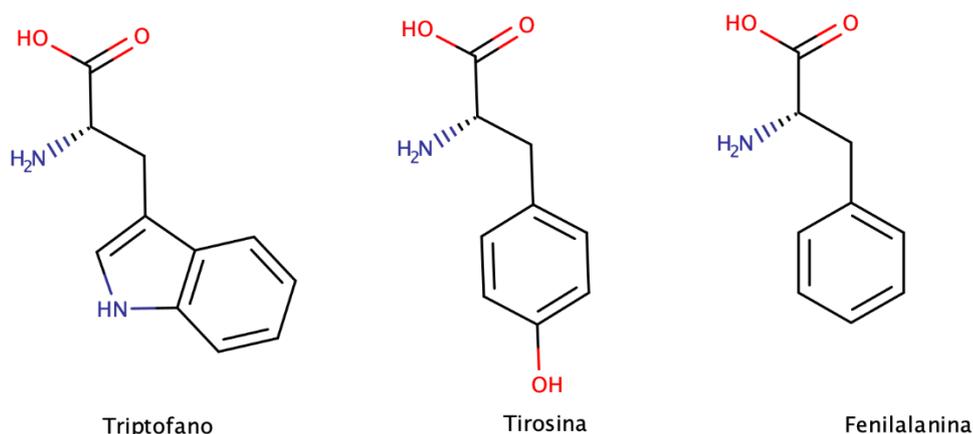


Figura 1 Amminoacidi naturalmente fluorescenti.

Trp, Phe e Tyr non sono particolarmente diffusi nelle proteine, tanto che il più abbondante dei tre, Trp, è generalmente presente in quantità 1%_{mol} nelle catene amminoacidiche¹. Questo aspetto non è necessariamente un difetto da un punto di vista analitico, in quanto la presenza di un maggior numero di frammenti fluorescenti unita alla sensibilità dei fluorofori all'intorno locale incrementerebbe la complessità del segnale. Lo spettro di emissione di una proteina è comunque influenzato da fattori come temperatura, solvente, transizioni conformazionali, associazione di subunità, legami con substrati e denaturazione^{1,6}. Le proprietà fluorescenti dei tre amminoacidi citati sono riportate in *Tabella 1*.

Tabella 1 Proprietà fluorescenti degli amminoacidi Trp, Tyr e Phe⁶.

		Amminoacido		
		Trp	Tyr	Phe
Picco 1	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	220/360	220-230/303-305	220/285
Picco 2	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	280-305/348-360	260-290/303-305	257-260/282-287
Coefficiente assorbimento ($L mol^{-1} cm^{-1}$)	di	5600	1400	200
Tempo di vita (t) (ns)		0.5/3.1	3.6	6.4
Resa quantica		0.1-0.2	0.1	<0.1

*F: intensità di fluorescenza; valori riferiti alle stesse condizioni sperimentali

1.3 Fluorescenza in porfirine e macrocicli correlati

I macrocicli derivati dalla porfirina rappresentano una famiglia di molecole di fondamentale importanza in biochimica, in quanto svolgono delle funzioni essenziali per gli organismi viventi. Sono dei composti macrociclici, tetradentati e sostanzialmente planari, che vedono il pirrolo come eterociclo ricorrente. In funzione del grado di insaturazione e del numero di frammenti metinici a ponte sono distinguibili tre dei principali macrocicli: porfirina, clorina e corrina (Figura 2)⁷.

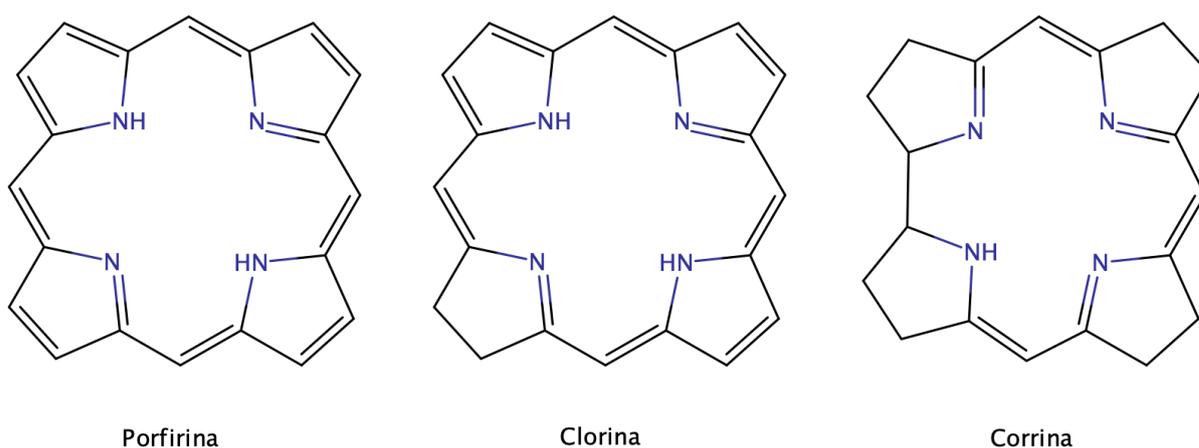


Figura 2 Macrocicli derivanti dal pirrolo.

Le specie riportate in Figura 2 svolgono prevalentemente funzioni da leganti in forma deprotonata per centri metallici aventi numero atomico relativamente basso, come magnesio, ferro, cobalto o nichel, mentre la clorina libera è coinvolta nella catena di trasporto elettronico della fotosintesi. Non sono noti molti altri ruoli di questi macrocicli non coordinati ad elementi

metallici. Nel ruolo di leganti sono invece presenti sotto forma di gruppo eme in complessi proteici quali l'emoglobina, la mioglobina, le perossidasi ed i citocromi, nella cobalamina (vitamina B12), in coenzimi come l'F430 e negli organismi fotosintetici in forma di clorofilla all'interno dei cloroplasti⁷.

Il gruppo eme è costituito da un atomo centrale di ferro, bi- o trivalente, legato ad un anello porfirinico sostituito e a volte direttamente legato ad un'unità proteica.

La cobalamina contiene invece un macrociclo sostituito il cui scheletro è analogo alla corrina che coordina un atomo di cobalto⁸.

Le clorofille sono al contrario strutturalmente riconducibili alla clorina. Il macrociclo è in forma doppiamente deprotonata e lega un atomo di magnesio. Vengono distinte varie tipologie di clorofilla: le clorofille *a*, *b*, *c*, le batterioclorofille *a* e *b* ed altre ancora, ma il pigmento probabilmente di maggior interesse è la clorofilla *a* (Chl *a*, *Figura 3*), composto la cui presenza è riscontrabile in tutti quegli organismi fotosintetici dove l'evoluzione di O₂ accompagna il processo fotosintetico⁹.

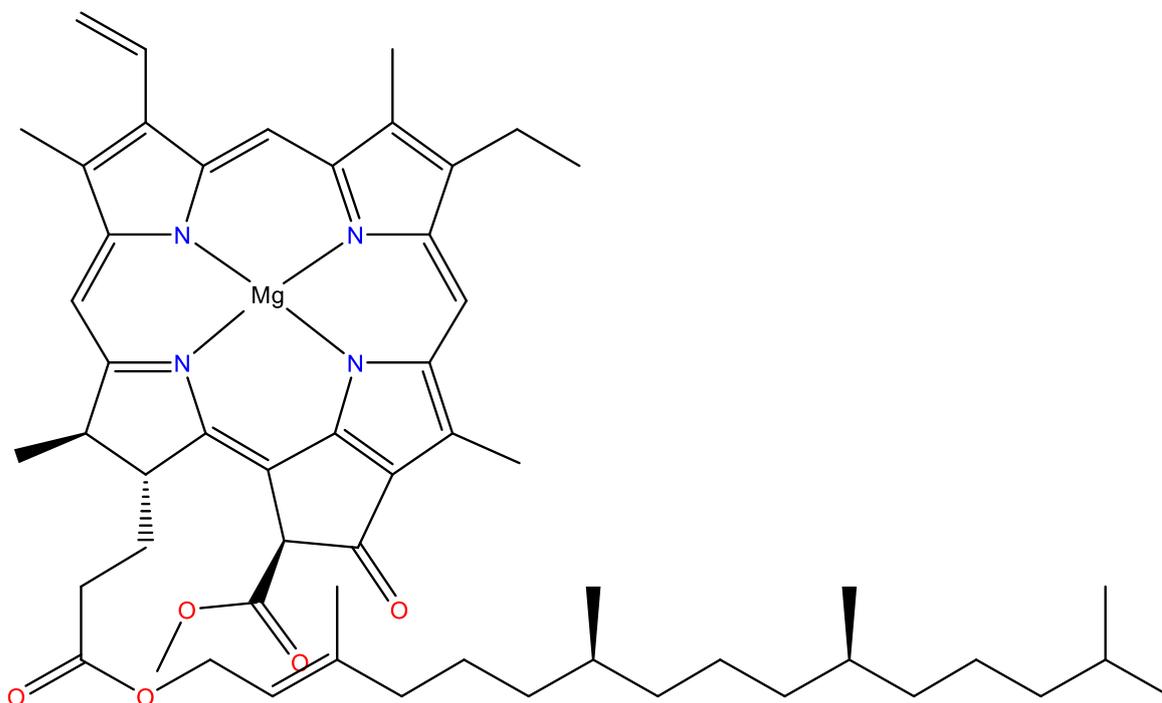


Figura 3 Struttura molecolare della Chl *a*.

Alla luce del campo di ricerca di questa tesi in questo capitolo verrà approfondita la fluorescenza della clorofilla, fenomeno la cui comprensione richiede una prima analisi della

dinamica della fotosintesi, dal momento che quest'ultima coinvolge fenomeni correlati all'emissione di radiazione.

Il processo fotosintetico avviene all'interno dei cloroplasti ed è costituito da una serie di stadi, nei quali l'energia solare è impiegata da reazioni ossidoriduttive che convertono acqua e diossido di carbonio in glucosio e ossigeno per mezzo di una catena di trasferimenti elettronici^{5,9}. L'assorbimento della radiazione luminosa avviene per mezzo di un pigmento antenna, sia esso una clorofilla o un pigmento accessorio come un carotenoide o una bilina, e l'energia viene trasferita ai centri di reazione, detti fotosistemi^{5,9}. Le reazioni fotochimiche tipiche degli organismi autotrofi avvengono esclusivamente in due tipi di complessi supramolecolari: i fotosistemi I e II⁹. All'interno di questi ultimi sono presenti dei dimeri di clorofilla *a* detti anche *traps* o donatori primari (il **P700** nel primo fotosistema e il **P680** nel secondo) i quali, passando al primo stato eccitato di singoletto, entrano nella catena di trasporto elettronico trasferendo un elettrone ad un accettore quale ad esempio la feofitina (pheo, di cui si riporta la struttura in *Figura 4*) ed acquistandone successivamente uno da un donatore. Il loro nome è dovuto alla lunghezza d'onda di assorbimento del dimero espressa in nanometri⁹.

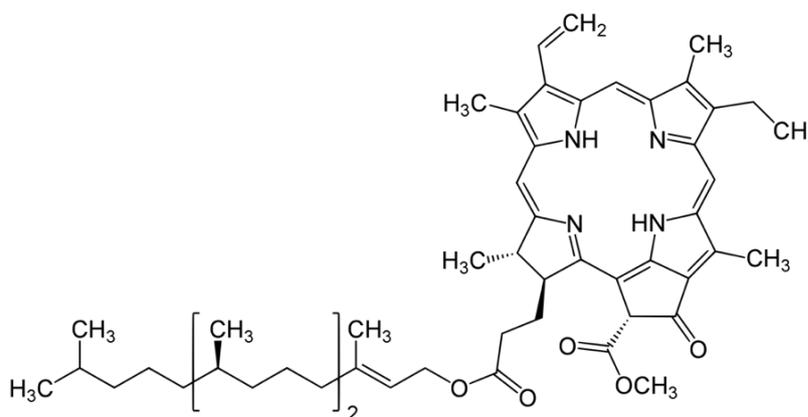


Figura 4 Feofitina a.

Questi dimeri risultano essere quindi dei fotocatalizzatori redox che costituiscono il *core* dell'intero processo di fotosintesi, poiché è la catena di trasporto elettronico a rendere possibile l'ossidazione di acqua, la quale viene ossidata ad ossigeno, e di diossido di carbonio, che riducendosi forma i carboidrati come il glucosio^{5,9}.

P680 e P700 sono presenti in quantità inferiori all'1% rispetto ai pigmenti antenna, ovvero clorofille, biline e carotenoidi, che invece svolgono funzioni di assorbimento e trasferimento dell'energia radiativa⁹. Le biline verranno approfondite nel capitolo successivo, mentre gli

ultimi sono dei noti pigmenti lineari costituiti da unità isopreniche ripetute che presentano fluorescenza trascurabile a causa delle bassissime rese quantiche e dei veloci tempi di rilassamento non radiativo. Gillbro e Cogdell (1989) hanno riportato delle rese quantiche pari a $3 \cdot 10^{-5}$ e $6 \cdot 10^{-5}$ per lo sferoidenone ed il β -carotene (*Figura 5*) in disolfuro di carbonio e tempi di vita radiativi dell'ordine del nanosecondo¹⁰. Il rilassamento non radiativo è veloce e competitivo considerando il tempo di vita del processo (30-300 fs), pertanto le funzioni e proprietà di questi pigmenti non verranno approfonditi ulteriormente in questa tesi.

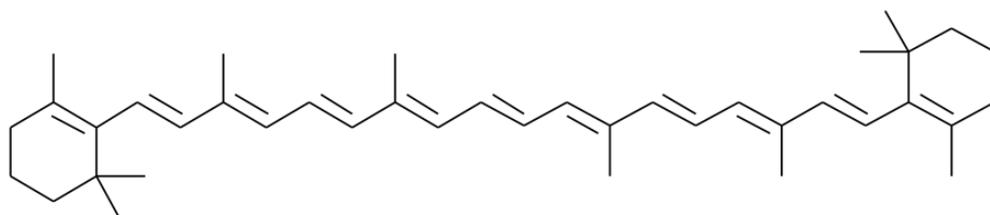


Figura 5 β -carotene.

Si riportano in *Figura 6* gli spettri di assorbimento ed emissione della clorofilla *a*, che permettono di evidenziare lo scarso spostamento di Stokes. In accordo con il diagramma di Jablonski in *Figura 7*, la presenza di una banda più debole a lunghezza d'onda superiore rispetto alla banda di emissione più intensa è dovuta alla struttura vibrazionale della molecola.

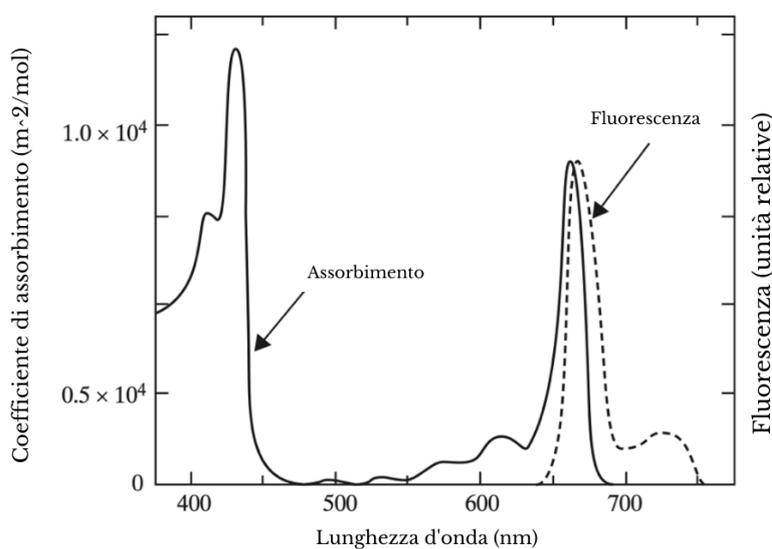


Figura 6 Spettri di assorbimento e fluorescenza della Chl a in etere.

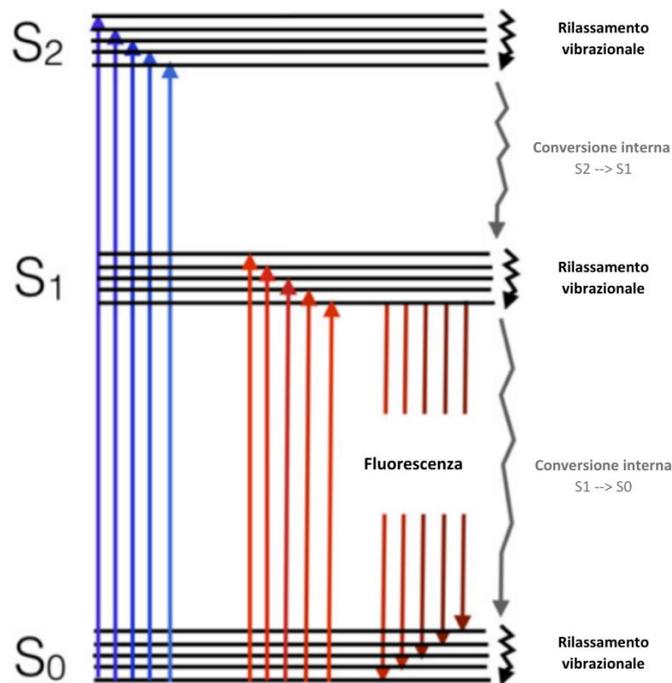


Figura 7 Diagramma di Jablonski riportante le transizioni assegnate agli spettri di assorbimento ed emissione della Chl *a*.

Esistono dei processi esoergonici competitivi che riducono l'efficienza del processo fotosintetico, efficienza intesa come quantità di fotoni assorbiti complessivamente contro i fotoni effettivamente impiegati nel processo^{5,9}. L'efficienza del processo di fotosintesi è stata calcolata da Bjorkman e Demmig ed ammonterebbe al 90%¹¹.

Dal momento che aver portato la clorofilla e i suoi aggregati in stato eccitato rappresenta lo stadio iniziale del processo fotosintetico, qualunque fenomeno di decadimento risulterà competitivo e diminuirà l'efficienza energetica dell'intero processo, in quanto parte dell'energia verrebbe dispersa nell'ambiente circostante invece di essere impiegata nella catena di trasporto degli elettroni. La fluorescenza costituisce quindi in questo caso un fenomeno competitivo e il decadimento radiativo misurato è un indicatore dell'efficienza di conversione energetica, dato che la resa fluorescente diminuisce all'aumento del trasferimento energetico ai centri di reazione⁵. L'origine effettiva della fluorescenza nei sistemi fotosintetici è tuttora oggetto di discussione, ma si suppone sia dovuta in larga parte ad emissione luminescente da parte delle molecole di clorofilla *a* e alla ricombinazione di coppie radicaliche in centri di reazione chiusi (e.g. P⁺₆₈₀ Pheo⁻)⁵. In ogni caso l'emissione è il risultato di più contributi, i quali possono essere in parte distinti tramite l'analisi dei profili di decadimento fluorescente. In termini quantitativi la resa fluorescente ΦF è data dall'equazione 1.6:

$$(1.6) \Phi F = \frac{k_f}{k_f + k_t + k_p + k_d}$$

k_f è la costante cinetica di fluorescenza, k_t è la costante cinetica riferita ai trasferimenti energetici a pigmenti non fluorescenti, k_d è riferita al decadimento termico (*thermal deactivation*) e k_p è la costante cinetica della reazione fotochimica. Dall'equazione si osserva che quando $k_p \gg k_f, k_d, k_t$, ovvero quando l'efficienza del processo fotosintetico è elevata, ΦF assume valori piccoli^{12,13}.

Il tempo di vita della transizione risulta fondamentale e l'analisi del profilo di decadimento del segnale viene effettuata considerando una somma di esponenziali, ognuna delle quali porta un tempo di vita associato ad un determinato fenomeno di decadimento. L'analisi risolta nel tempo della luminescenza è una delle chiavi per la comprensione della complessa cinetica della fotosintesi, poiché singoli contributi alla fluorescenza quali decadimento di antenne e reazioni redox di coppie radicaliche possono essere separati. La fluorescenza *in vivo*, in particolare il tempo di vita, è quindi complessa e sensibile all'intorno chimico ed alle condizioni sperimentali³⁻⁵; va distinto quindi il tempo di vita di un fenomeno di decadimento *in vivo* ed in soluzione. In quest'ultimo caso i tempi di vita della clorofilla *a* variano a seconda del solvente utilizzato, della presenza di ossigeno disciolto e della concentrazione ma sono generalmente contenuti in un intervallo compreso tra 5 e 8 ns¹⁴. Connolly e colleghi (1982) hanno riportato che il tempo di vita fluorescente di una soluzione 0.15 μM di Chl *a* in etere è pari a 6 ns. L'eccitazione è stata effettuata a 428 nm e la misura è stata effettuata registrando il profilo di decadimento della radiazione emessa a 666 nm¹⁴.

1.4 Ficocianobilina

La ficocianobilina (da qui in avanti PCB), molecola oggetto di questo lavoro di tesi, è un pigmento antenna presente in cianobatteri come *Arthrospira Platensis* o *Synechococcus Elongatus* e in alcune alghe rosse (Figura 8).

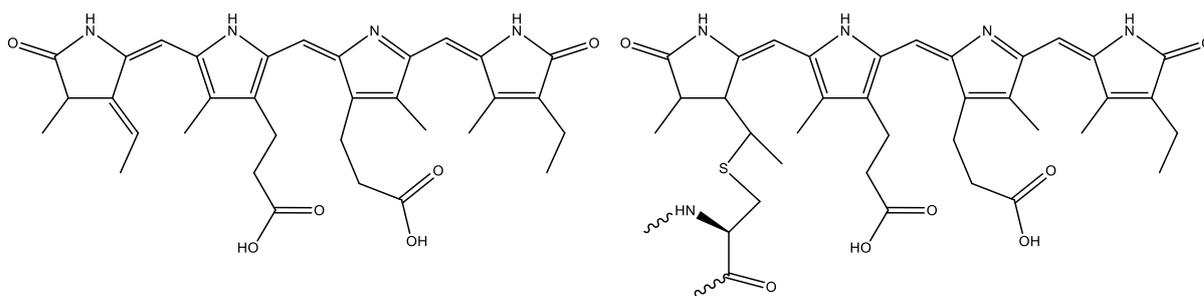


Figura 8 Ficocianobilina, pigmento blu nelle due forme libera e legata al frammento cisteinico.

Strutturalmente si presenta come un tetrapirrolo lineare dotato di due gruppi carbossilici ed alcuni gruppi sostituenti idrocarburici. I frammenti pirrolici terminali sono in realtà eterocicli pirrolonici, data la presenza di una funzione carbonilica in posizione *alfa* rispetto all'atomo di azoto¹⁵⁻¹⁷. La PCB fa parte della famiglia delle *biline*, ovvero pigmenti come la ficoeritrobilina (PEB, un pigmento rosso, Figura 10) o la biliverdina (verde, Figura 10), quest'ultimo precursore della PCB e della PEB¹⁸. In natura la PCB si trova legata covalentemente via legame tioetereo con la cisteina, risultando così gruppo prostetico di alcune proteine come la **ficocianina-C** (da qui in avanti C-PC, si veda in Figura 9), la **alloficocianina** o la **ficoeritrina**. L'interazione con lo zolfo coinvolge il doppio legame esociclico presente in uno dei pirroloni terminali della PCB libera. In generale le ficobiline sono legate a proteine aventi masse comprese tra 30 e 35 kDa. Queste proteine sono poi organizzate in strutture superiori dette ficobilisomi localizzate nelle membrane lamellari di cianobatteri ed alghe rosse⁹.

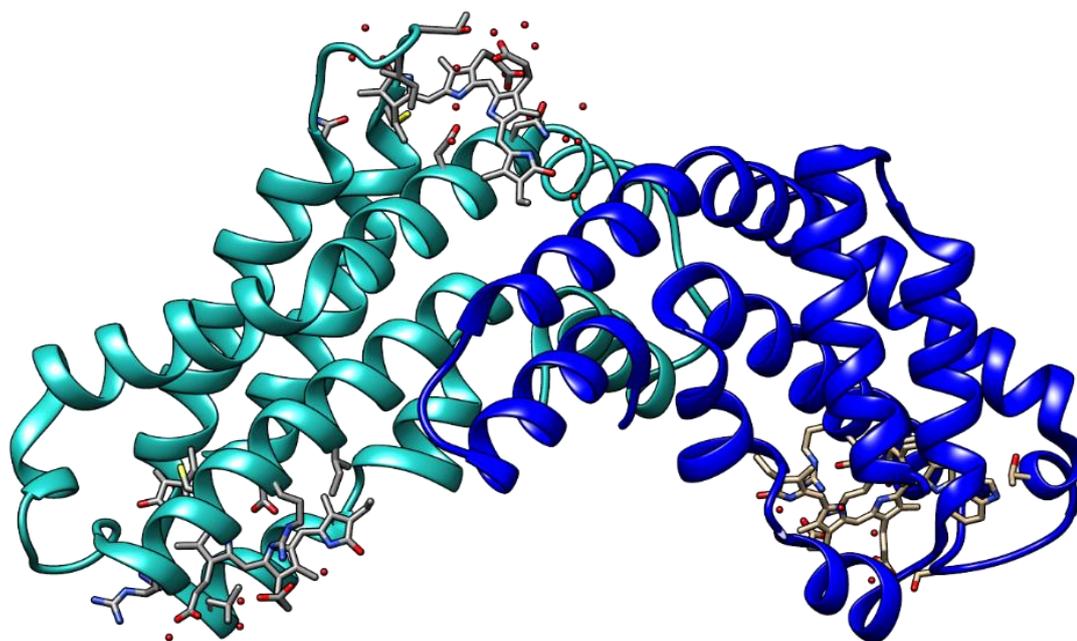


Figura 9 Monomero costituente il complesso proteico della C-PC nel *Synechococcus Elongatus*.

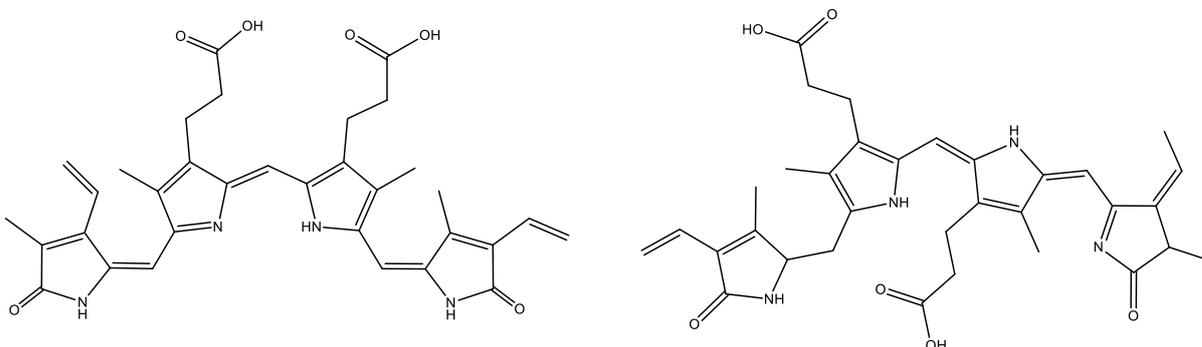


Figura 10 Da sinistra: i pigmenti biliverdina e ficoeritrobilina.

Come accennato nel capitolo precedente, il principale ruolo biologico di pigmenti come PCB e PEB è quello di coadiuvare il processo fotosintetico fungendo da “antenna”, ovvero raccogliendo efficacemente l’energia radiante proveniente dal sole e trasferirla ai centri di reazione della cellula. Questo ruolo è evidenziato sperimentalmente in prima istanza dalla banda di assorbimento nel visibile, che per la PCB è localizzata tra 580 e 625 nm in dipendenza del pH¹⁹. L’intervallo di assorbimento della radiazione visibile è giustificato dall’ampiezza di coniugazione del sistema π . La concentrazione di PCB è superiore alla clorofilla stessa nei cianobatteri, spiegando così il colore inusuale di questi organismi fotosintetici^{9,20}. La luminescenza della PCB viene dimostrata dallo spettro di emissione della C-PC riportato in

Figura 11, dove si osserva una banda principale a circa 650 nm poco distante dalla banda principale di assorbimento. La presenza di una spalla è dovuta alla struttura vibrazionale della molecola. La possibilità di emettere radiazione visibile influenza i trasferimenti energetici e conseguentemente il processo fotosintetico.

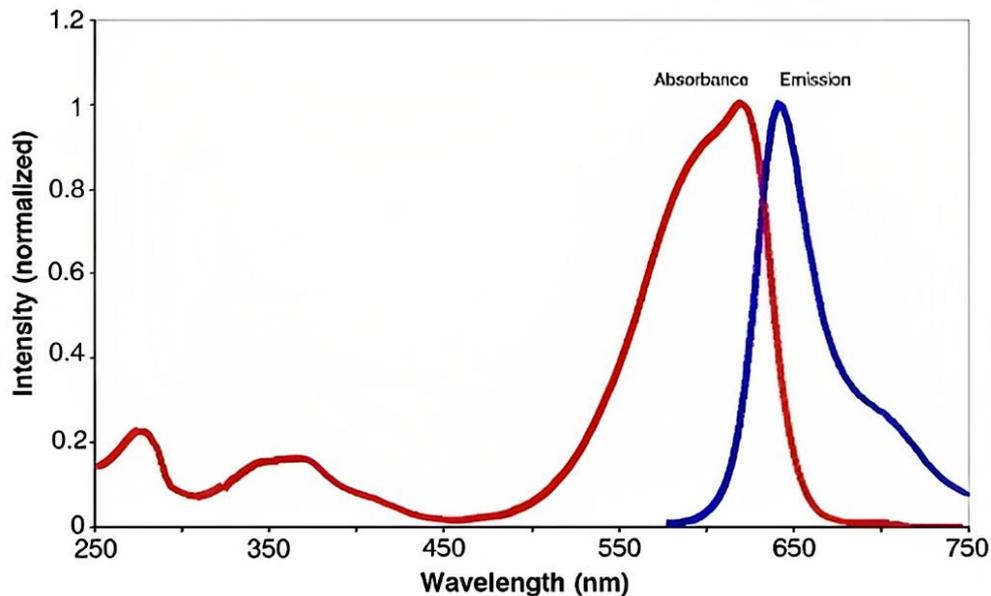
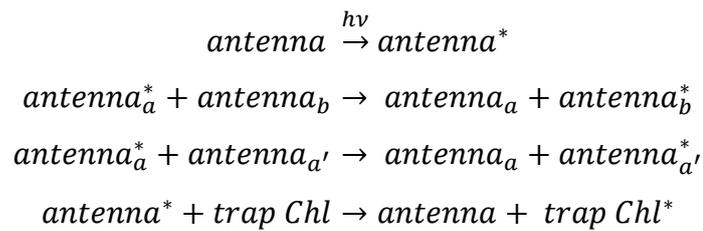


Figura 11 Spettri di assorbimento e fluorescenza della C-PC²¹.

La necessità di questo pigmento o dei pigmenti affini da parte degli organismi può essere giustificata ed apprezzata considerando l'habitat acquatico degli stessi. Come è noto, la capacità di penetrazione in un mezzo della luce è dipendente della capacità di diffusione dello stesso. In particolare, le lunghezze d'onda nella regione visibile maggiormente penetranti, ovvero meno diffuse, sono quelle appartenenti alla regione spettrale del rosso. La profondità a cui vivono queste specie influenza quindi la quantità ed i tipi di pigmenti antenna presenti negli organismi^{20,22}.

Come accennato in precedenza, il ruolo dei pigmenti antenna (o accessori) consiste nel trasferire l'energia luminosa ai fotosistemi, i quali sostengono la catena di trasporto degli elettroni. La dinamica di trasferimento energetico è analoga a quanto avviene per la clorofilla *a*, con trasferimento di energia ai fotosistemi da parte di stati eccitati a seguito dell'assorbimento della radiazione. Questi fenomeni possono avvenire tra specie identiche, ed esempio due molecole di PCB, o differenti, come PCB e clorofilla. Le equazioni relative ai processi di assorbimento e trasferimento sono di seguito rappresentate. *trap Chl* indica i dimeri di clorofilla che costituiscono i fotosistemi I e II.



A seguito del trasferimento energetico sopra riportato la *trap Chl* trasferisce un elettrone ad un opportuno accettore, iniziando così la catena di reazioni che permettono l'ossidazione di acqua e diossido di carbonio.

Il meccanismo di trasferimento dell'energia comunemente accettato è detto *resonance energy transfer (RET)*²³ o più semplicemente meccanismo di Förster (*Figura 12*) e spiega come possa avvenire un trasferimento di energia tra due molecole in prossimità. Lo stato elettronico eccitato può essere considerato come un dipolo oscillante, le cui oscillazioni portano alla generazione di un campo elettrico variabile che può risuonare con gli elettroni della seconda molecola, i quali acquistano energia. Questo meccanismo è concettualmente analogo all'iniziale assorbimento di radiazione elettromagnetica, la cui componente elettrica oscillante causa l'oscillazione degli elettroni⁹.

Le condizioni perché il *resonance energy transfer* sia probabile sono^{9,23}:

1. Le molecole sono in prossimità tra loro, diversamente sarà sempre più improbabile. Il meccanismo di Förster decade con la sesta potenza della distanza;
2. i dipoli sono allineati similmente;
3. L'energia del primo dipolo corrisponde all'energia necessaria per eccitare la seconda molecola (condizione di risonanza).

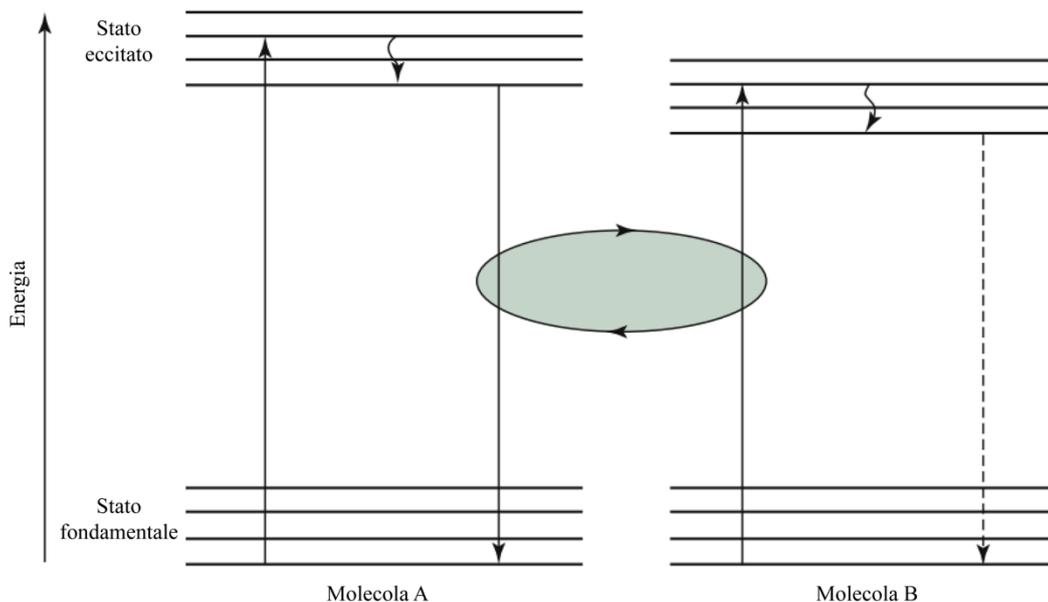


Figura 12 Diagrammi di Jablonski riportanti il fenomeno di RET.

Lo spettro di fluorescenza della prima molecola rende conto delle energie accessibili dal sistema donatore nello stato di singoletto, mentre lo spettro di assorbimento della seconda molecola suggerisce quali intervalli di lunghezze d'onda possano indurre un'oscillazione. Tanto è maggiore la sovrapposizione delle bande, tanto più probabile sarà il trasferimento energetico. Si deve tenere conto però che spettri di assorbimento ed emissione sono caratterizzati da un più o meno marcato *Stokes shift*, che sposta a lunghezze d'onda superiori la banda di emissione. La sovrapposizione tra bande è inoltre influenzata dalle strutture vibrazionali delle molecole coinvolte. In generale, nei sistemi fotosintetici le molecole coinvolte scambiano energia per risonanza in modo molto efficace. Ad esempio, l'efficienza del processo RET sale fino al 100% tra molecole di clorofilla in virtù dello scarso *Stokes shift* tra la banda di emissione e assorbimento. Il fattore che limita l'efficienza dei trasferimenti è la dissipazione dell'energia roto-vibrazionale in eccesso degli stati eccitati sotto forma di energia termica, fenomeno generalmente molto rapido (10^{-12} s) e comparabile con il trasferimento RET, che nella *Chl a in vivo* avviene tipicamente nell'intervallo temporale $1 \cdot 10^{-12} - 2 \cdot 10^{-12}$ s.^{3,9}

1.5 Ulteriori ruoli biologici della PCB

La ricerca medica ha evidenziato nel corso degli anni come la PCB sia in grado di interagire positivamente con l'organismo dei mammiferi. Queste evidenze potrebbero far emergere delle applicazioni future di questa molecola, la quale potrebbe entrare a far parte di formulazioni farmaceutiche o essere utilizzata direttamente come farmaco. Alcune funzioni biologiche di rilievo sono riportate in seguito.

1.5.1 Antiossidante

Nel corpo umano i principali responsabili dello stress ossidativo sono radicali liberi generalmente indicati come ROS (*reactive oxygen species*), naturalmente prodotti dal metabolismo e aventi ruoli come la regolazione del sistema immunitario, la difesa dell'ospite o l'intervento nella differenziazione e proliferazione cellulare. In basse concentrazioni sono fisiologicamente benefici, diversamente si innescano dei fenomeni di stress ossidativo in quanto questi radicali ossigenati sono in grado di reagire con lipidi, membrane e DNA. Il surplus di ROS è usualmente controllato dall'organismo stesso, che risponde con la sintesi di composti antiossidanti, risposta che però può essere indebolita in presenza di determinate patologie. In questi casi è necessaria un'integrazione di antiossidanti e la PCB risulta essere particolarmente efficace, persino più dell'acido ascorbico, in quanto dotata di una elevata capacità assorbente di radicali ossigenati²⁴⁻²⁶. La principale sorgente di ROS è la NADPH ossidasi, la cui iperattivazione porta ad un accumulo degli stessi. La PCB è in grado di degradare l'enzima e normalizzare i markers renali ed urinari dello stress ossidativo²⁶. La capacità antiossidante della PCB porta a delle applicazioni piuttosto promettenti, in particolare per quelle patologie in cui il carico di stress ossidativo aggrava o causa patologie anche piuttosto severe, quali il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer²⁴⁻³⁰.

1.5.2 Antiinfiammatorio

L'azione proinfiammatoria dei radicali liberi e dei ROS può essere anch'essa controllata dall'inibizione della NADPH ossidasi unitamente all'abbattimento dei livelli di radicali liberi, funzioni che possono essere entrambe svolte dalla PCB. Alcuni ricercatori suggeriscono che la PCB sia in grado di ridurre i livelli di espressione di fattori genici pro-infiammatori,

contribuendo alla riduzione dei livelli di infiammazione non solo abbattendo ROS e radicali liberi, ma anche agendo con meccanismi differenti. Sono state evidenziate altre possibili vie di azione a livello di espressione genica ed è stata evidenziata la possibilità da parte della PCB di mimare la biliverdina ed attivare l'enzima biliverdina-reduttasi. La cui azione contribuisce a ridurre lo stress ossidativo^{24,26,28,31,32}.

1.5.3 Fattore anticancro

La ricerca oncologica ha indagato di recente le proprietà antiproliferative della PCB su colture *in vitro*. In forma proteica (associata quindi alla C-PC) è in grado di indurre apoptosi, arresto del ciclo cellulare, prevenire la migrazione cellulare e la formazione di colonie. In particolare, sembra presentare degli effetti positivi sul cancro al seno e al polmone.

Unitamente alle sue proprietà antiproliferative, le sue note capacità antiossidanti contribuiscono a ridurre il rischio di contrarre carcinomi abbassando lo stress ossidativo. Quest'ultimo è uno dei fattori di rischio principali nell'insorgenza di carcinoma poiché può indurre danneggiamento nel genoma e nel DNA mitocondriale causando mutazioni e modificazioni nella catena di segnali³³⁻³⁵.

1.6 Derivati metallici della ficocianobilina

Diversamente da porfirine e sistemi ciclici correlati, la struttura tetrapirrolica aperta della PCB non è stata trovata associata a centri metallici nei derivati biologici soggetti ad indagine strutturale. La preparazione di complessi metallici della PCB è stata oggetto di studi limitati, senza che venissero isolati e caratterizzati strutturalmente i composti ottenuti. In particolare, uno studio del 1962 riporta le variazioni spettrali che subiscono cromofori derivati dalla C-PC in presenza di Zn(II)³⁶, ma l'estrazione dei pigmenti è stata condotta impiegando condizioni sperimentali aggressive. PCB ricavata con un approccio solvolitico ha mostrato uno spegnimento progressivo della luminescenza per aggiunta di Hg(II), ma anche in questo caso l'indagine è stata limitata alla registrazione di spettri di assorbimento ed emissione³⁷.

2 Scopo della tesi

La letteratura citata nei paragrafi precedenti indica che le metodiche di purificazione ed estrazione della PCB, le quali sono in relazione con la natura del materiale di partenza, comportano variazioni non trascurabili negli spettri di assorbimento ed emissione del cromoforo isolato. Il primo obiettivo della tesi è l'ottimizzazione di una metodica in grado di permettere l'isolamento della ficocianobilina da campioni biologici commerciali, costituiti nello specifico da alga spirulina. Lo studio delle proprietà spettrali della ficocianobilina così ottenuta è un secondo obiettivo della tesi, da condurre sia da un punto di vista sperimentale che computazionale. Il secondo approccio sarà sviluppato tenendo conto di stato di protonazione della molecola e della presenza di possibili conformeri. Verrà prestata particolare attenzione alla modellazione della struttura e delle transizioni elettroniche attraverso l'uso di diversi metodi di simulazione.

Data la natura polipirrolica della ficocianobilina e la limitatissima presenza di studi in letteratura, sarà infine investigato il possibile impiego della PCB come legante nei confronti di selezionati centri metallici, cercando di evidenziare possibili influenze sulle transizioni elettroniche anche attraverso calcoli computazionali.

3 Parte sperimentale

3.1 Materiali e metodi

Campioni di spirulina blu (*Arthrospira Platensis*) dichiarati senza additivi e con una percentuale proteica pari a 61% sono stati acquistati da Fluxias GmbH (Germania). Gli altri reagenti e solventi impiegati sono prodotti Merck e Strem Chemicals, usati senza ulteriori purificazioni, con l'eccezione di $[\text{Yb}(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$, preparato in resa quantitativa a partire da Yb_2O_3 . In una tipica reazione, 2.00 g di ossido vengono sospesi in 3 mL di acqua e viene aggiunto HNO_3 concentrato in rapporto molare 6:1. La miscela di reazione viene riscaldata a 80 °C fino a completa dissoluzione del solido, successivamente viene evaporata a secchezza a pressione ridotta e vengono aggiunti 30 mL di etanolo. La soluzione risultante viene purificata per filtrazione ed evaporata a pressione ridotta. Il solido risultante viene parzialmente disidratato mantenendolo sotto vuoto a 110 °C per una notte in presenza di anidride fosforica.

3.2 Strumentazione

Tutte le operazioni sono state condotte sotto cappa aspirante. Il mantenimento dell'atmosfera inerte (N_2) è stato controllato impiegando un pressostato automatico MTI modello KJT-2V, equipaggiato con sensore di pressione ed elettrovalvole e collegato ad una linea di Schlenk.

Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati a 300 K impiegando uno spettrometro Bruker Avance operante alla frequenza protonica di 400.13 MHz. I valori di spostamento chimico ^1H NMR sono stati riferiti alla frazione parzialmente non deuterata del solvente utilizzato, a sua volta calibrata rispetto al tetrametilsilano.

Gli spettri FTIR ($4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$) sono stati registrati a temperatura ambiente impiegando uno spettrofotometro Perkin-Elmer SpectrumOne. In campioni sono stati dispersi in KBr o depositati per evaporazione su finestre dello stesso materiale.

Gli spettri UV-Vis sono stati registrati in soluzione impiegando uno spettrofotometro YOKE 6000S, operante in un intervallo compreso tra 190 e 1100 nm.

Gli spettri di emissione (PL) ed eccitazione (PLE) e i tempi di vita (τ) sono stati registrati in soluzione a temperatura ambiente impiegando uno spettrofluorimetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 equipaggiato con una lampada allo xenon come sorgente di eccitazione continua. Le lunghezze d'onda di eccitazione sono state selezionate grazie a un monocromatore di tipo Czerny-Turner. Opportuni filtri passa-basso sono stati posizionati di fronte al sistema di acquisizione per evitare fenomeni di secondo ordine. Il sistema di rivelazione è composto da un monocromatore a singolo reticolo iHR320 accoppiato ad un tubo fotomoltiplicatore Hamamatsu R928. Per la registrazione dei tempi di vita è stata impiegata la tecnica *time-correlated single photon counting* (TCSPC) in combinazione con una sorgente LED pulsata (Horiba NanoLED) centrata a 373 nm. Tra sorgente e campione è stato interposto un filtro passa-alto con lunghezza d'onda di taglio pari a 400 nm.

Lo spettrofotometro YOKE 6000S e lo spettrofluorimetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 sono stati utilizzati per misure di resa quantica (Φ) in metanolo, impiegando rodamina 6G in metanolo come standard ($\Phi_{std} = 0.93$)³⁸, in accordo con l'equazione 3.1:

$$(3.1) \Phi_{campione} = \Phi_{std} \frac{F_{campione} A_{std}}{F_{std} A_{campione}}$$

Nell'equazione A_{std} e $A_{campione}$ sono i valori di assorbanza di standard e campione registrati alla lunghezza d'onda utilizzata per l'eccitazione, mentre F_{std} e $F_{campione}$ sono gli integrali delle curve di emissione ottenute. Nell'equazione 3.1 non compaiono indici di rifrazione perché lo stesso solvente è stato impiegato per disciogliere campione e standard.

3.3 Purificazione della ficocianobilina (PCB)

In una tipica preparazione, 10.0 g di spirulina blu commerciale sono stati riposti in un ditale per Soxhlet e lasciati a bagno in metanolo (25 mL) per un'ora a temperatura ambiente. La procedura è stata ripetuta due volte, dopo di che il ditale è stato trasferito in un estrattore Soxhlet riempito con 220 mL di metanolo. Dopo aver degassato e posto l'apparecchiatura sotto atmosfera di azoto, il solvente è stato riscaldato all'ebollizione in modo da iniziare la procedura di estrazione, proseguita per 16 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la soluzione è stata concentrata per evaporazione a pressione ridotta fino a circa

30 mL e filtrata. Il pallone contenente la soluzione è stato posto in bagno a ghiaccio e sono stati aggiunti 30 mL di etere dietilico. Il precipitato biancastro così ottenuto è stato rimosso per filtrazione. Ulteriore solido è stato precipitato e rimosso per aggiunta di una seconda aliquota da 30 mL di etere dietilico. I solventi sono stati rimossi per evaporazione a pressione ridotta e il solido residuo è stato sciolto nel minimo volume di metanolo (circa 3 mL). La soluzione è stata fatta assorbire su una colonna di gel di silice avente diametro pari a 3 cm, precedentemente condizionata con etanolo. L'eluizione è iniziata con etanolo puro (100 mL), mentre nelle fasi successive sono stati impiegati una miscela etanolo:metanolo 1:1 (100 mL) e infine metanolo puro (100 mL). Le frazioni presentanti il tipico colore blu della ficocianobilina sono state riunite ed evaporate a pressione ridotta. Il residuo è stato ripreso con tetraidrofurano (10 mL) e la soluzione ottenuta è stata filtrata su cotone. Il prodotto desiderato è stato ottenuto come solido blu scuro in quantità comprese tra 20 e 30 mg dopo evaporazione del solvente ed è stato conservato a -25 °C.

3.3.1 Caratterizzazione della PCB

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 300 K): δ 6.93 (s, 1H, =CH- metinico), 6.52 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, =CH-CH₃), 6.16 (s, 1H, =CH- metinico), 5.99 (s, 1H, =CH- metinico). Regione alifatica non assegnata.

IR (r.t., cm^{-1}): 3600-3020 (ν_{OH} , ν_{NH}), 2956, 2917, 2850 (ν_{CH}), 1595-1540 (ν_{CO}), 1465-1405 (ν_{CO}).

UV-VIS (MeOH, r.t., nm): 772, 623, 587, 364, <300.

PL (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{eccitazione}} = 336$ nm, nm): 690, 636.

PLE (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{emissione}} = 636$ nm, nm): 409, 336, 324.

τ (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{eccitazione}} = 373$ nm, $\lambda_{\text{emissione}} = 636$ nm, ns): 6.

Φ (MeOH, r.t.): 0.4%

3.4 Reazioni tra PCB e precursori metallici

Le reazioni sono state condotte in cuvetta di quarzo. Ad una soluzione $4 \cdot 10^{-4}$ M di PCB in metanolo (3 mL) sono stati aggiunti 120 μL di una soluzione $1 \cdot 10^{-2}$ M di $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o $[\text{Y}(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ in metanolo. Le miscele di reazione sono state indagate per via spettrofotometrica e spettrofluorimetrica. Ulteriori 120 μL di soluzione di precursore sono stati successivamente aggiunti e sono state ripetute le misure.

3.4.1 Caratterizzazione di PCB:Zn

UV-VIS (MeOH, r.t., nm): 773, 683 sh, 625, 581, 369, 337 <300 (rapporto 1:1).

UV-VIS (MeOH, r.t., nm): 773, 683 sh, 625, 581, 369, 337 <300 (rapporto 2:1).

PL (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{eccitazione}} = 336$ nm, nm): 694, 637 (rapporto 2:1).

PLE (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{emissione}} = 636$ nm, nm): 431 sh, 412, 336, 324 (rapporto 2:1).

τ MeOH, r.t., $\lambda_{\text{eccitazione}} = 373$ nm, $\lambda_{\text{emissione}} = 636$ nm, ns): 7 (rapporto 2:1).

Φ (MeOH, r.t.): 2.4%

3.4.2 Caratterizzazione di PCB:Yb

UV-VIS (MeOH, r.t., nm): 674 sh, 624, 575, 363, 331 sh, <300 (rapporto 1:1).

UV-VIS (MeOH, r.t., nm): 779 weak, 623, 576, 363, 331 sh, <300 (rapporto 2:1).

PL (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{excitation}} = 336$ nm, nm): 686, 629 (rapporto 2:1).

PLE (MeOH, r.t., $\lambda_{\text{emission}} = 630$ nm, nm): 427 sh, 404, 336, 322 (rapporto 2:1).

τ MeOH, r.t., $\lambda_{\text{excitation}} = 373$ nm, $\lambda_{\text{emission}} = 629$ nm, ns): 6. (rapporto 2:1).

Φ (MeOH, r.t.): 0.4%

4 Parte computazionale

4.1 Modelli molecolari

Come modelli molecolari per gli studi computazionali sono stati considerati la PCB libera in vari stati di dissociazione (neutra, monoanionica, dianionica e trianionica), i suoi conformeri SSS (forma aperta) ed ASA (forma elicoidale)³⁹ (dove gli anelli pirrolici si presentano in conformazione syn-syn-syn ed anti-syn-anti), l'enolo ciclico della PCB e i possibili isomeri strutturali dei complessi teorici con zinco ed ittrio. Quest'ultimo elemento è stato considerato per simulare una coordinazione simile a quella ottenibile con l'itterbio grazie al comparabile raggio ionico, senza dover ricorrere a calcoli con *basis sets* richiedenti correzioni relativistiche. L'impiego dell'ittrio trivalente al posto dell'itterbio permette inoltre di avere derivati della PCB con stati fondamentali elettronici di singoletto, con notevole semplificazione dei calcoli computazionali.

4.2 Superfici di energia potenziale e ottimizzazione geometrica

Nella chimica computazionale l'ottimizzazione geometrica è un algoritmo attraverso cui si può prevedere la struttura tridimensionale di un gruppo di atomi, siano essi parte di una molecola o di un sistema più complesso, minimizzando l'energia del sistema⁴⁰. L'algoritmo più semplice si compone di due passaggi⁴⁰:

1) Dati N atomi si definisce una funzione scalare $\Phi: \mathbb{R}^{3N} \rightarrow \mathbb{R} \cup \{+\infty\}$ che esprima l'energia del sistema in funzione del vettore $\vec{R} = (X_1, Y_1, Z_1, \dots, Z_N) \in \mathbb{R}^{3N}$ nelle posizioni $R_j \in \mathbb{R}^3$.

2) Si calcolano i punti di Φ rispetto ad \vec{R} per i quali il gradiente dell'energia è pari a zero. La definizione di Φ in termini quantomeccanici richiede l'invocazione dell'approssimazione di Born-Oppenheimer, la quale semplifica l'Hamiltoniano di un sistema composto da nuclei ed elettroni considerando trascurabile il moto nucleare rispetto a quello elettronico. Si considera pertanto nulla l'energia cinetica dei nuclei, mentre la repulsione nucleo-nucleo diventa costante. Il moto elettronico non risulta più correlato a quello nucleare. Questa approssimazione scorpora la funzione d'onda totale in una funzione d'onda elettronica ed una

nucleare. Data una certa disposizione spaziale dei nuclei, l'energia del sistema sarà data dalla somma dell'energia elettronica e della repulsione internucleare. Il calcolo dell'energia del sistema rispetto a tutte le coordinate nucleari possibili costituisce un'ipersuperficie detta superficie di energia potenziale (PES)⁴¹.

La PES di un sistema composto da N atomi può essere definita attraverso l'uso di coordinate cartesiane o interne. Quest'ultimo approccio è leggermente meno dispendioso da un punto di vista computazionale perché riduce il numero di variabili, che passano da 3N-3 in coordinate cartesiane a 3N-6 in coordinate interne per molecole non lineari^{40,42}. Nelle procedure di calcolo, software come Orca possono elaborare file di input scritti in coordinate cartesiane convertendone il contenuto in coordinate interne per la sola computazione restituendo come risultato una geometria minimizzata espressa nuovamente in coordinate cartesiane. La matrice delle coordinate interne utilizzate per i calcoli è detta *Z-matrix*⁴².

Le ottimizzazioni geometriche che hanno portato alle geometrie di stato fondamentale dei modelli molecolari analizzati sono state condotte impiegando relazioni coordinate-energia basate su metodi quantomeccanici, sia derivanti da approcci semiempirici che fondati sulla teoria DFT. In particolare, sono stati utilizzati il metodo semi-empirico GFN2-xTB di Grimme, mentre le geometrie su cui si sono calcolate le proprietà oggetto della tesi sono state determinate attraverso calcoli DFT effettuati tramite funzionali *meta*-GGA (r²SCAN-3c), *hybrid*-GGA (PBEh-3c) e *hybrid meta*-GGA (TPSS0 e TPSSh). I software impiegati sono xTB versione 6.5.1⁴³ e Orca versione 5.0⁴⁴.

4.3 Metodi computazionali

4.3.1 Teoria DFT

La teoria DFT, ovvero *Density Functional Theory*, si basa sui due teoremi di Hohenberg⁴⁵ e Kohn. Il primo teorema afferma che l'energia dello stato elettronico fondamentale è determinata totalmente dalla densità elettronica ρ : $E = E[\rho]$. In altre parole, l'energia è un funzionale della densità. Il secondo teorema porta il principio variazionale nella teoria DFT. Noto il funzionale DFT esatto e data una densità elettronica di prova ρ_{trial} che restituisca il numero di elettroni del

sistema se integrata nello spazio, l'energia corrispondente sarà sempre maggiore o al limite eguale a quella associata alla densità elettronica corretta, $E_0: E[\rho_{\text{trial}}] \geq E_0$.

Di seguito si distinguerà una funzione da un funzionale tramite l'uso di parentesi quadre per un funzionale e tonde per una funzione⁴⁶. La distinzione fra funzione e funzionale è necessaria in quanto l'energia non dipende da semplici variabili, ma da una funzione nello spazio, la densità elettronica. La dipendenza è però universale e quindi applicabile ad ogni sistema molecolare⁴⁷.

Le prove a sostegno di questa teoria, ricercate da Wilson⁴⁸, sono sostanzialmente tre:

1. L'integrale della densità ρ definisce il numero di elettroni.
2. Le cuspidi nella densità esprimono la posizione dei nuclei.
3. L'altezza delle cuspidi definisce la carica nucleare.

Il funzionale "esatto" che collega l'energia alla densità elettronica non è però noto, quindi lo scopo primo dell'approccio DFT è progettare funzionali che connettano energia e densità elettronica con un grado di accuratezza sempre maggiore. Si noti che la teoria DFT "pura", anche detta *orbital free DFT theory*, non fa riferimento agli orbitali elettronici ma solamente alla densità definita come $\rho = \rho(\vec{r})$, ovvero la densità in funzione delle tre variabili spaziali⁴⁶. L'energia del sistema, nell'ambito dell'approssimazione di Born-Oppenheimer, si scorpora in vari contributi⁴⁷, riportati nell'equazione 4.1:

$$(4.1) E_{el}[\rho] = -T_{el}[\rho] - E_{ne}[\rho] + E_{ee}[\rho]$$

T_{el} è l'energia cinetica elettronica, E_{ne} è il potenziale di attrazione nucleo-elettrone ed E_{ee} il potenziale repulsivo interelettronico. Mediante l'approssimazione di Born-Oppenheimer la repulsione nucleo-nucleo è una costante e l'energia cinetica nucleare non è considerata.

L'attrazione nucleo-elettrone è definita sulla base dell'equazione 4.2, dove l'indice k si riferisce ai nuclei e Z_k è il numero atomico.

$$(4.2) E_{ne}[\rho_{el}] = \sum_k \int \frac{Z_k}{|r - r_k|} \rho_{el} dr$$

Questa formula esprime l'attrazione sotto forma di potenziale Coulombiano. Decisamente più complessa è la valutazione del potenziale repulsivo interelettronico, in quanto rappresentato a sua volta da più contributi, uno Coulombiano classico ed altri di **correlazione** e **scambio** derivanti dalla natura quantomeccanica delle interazioni elettrone-elettrone (equazioni 4.3 e 4.4).

$$(4.3) E_{ee} = V_{coulomb} + V_{corr} + V_{exc}$$

$$(4.4) V_{coulomb}[\rho_{el}] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho_{el}(r_1)\rho_{el}(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2$$

La definizione dei potenziali di scambio e correlazione, unitamente alla definizione di un'espressione per l'energia cinetica elettronica tra particelle aventi moto correlato rappresentano le sfide principali nella teoria DFT. Per quanto concerne l'energia cinetica, in un sistema di elettroni non interagenti si definisce usualmente attraverso l'equazione 4.5:

$$(4.5) T_{el,ni} = \sum_i \int \frac{1}{2} \nabla_i^2 \rho_i dr$$

Questo contributo non tiene però in considerazione le interazioni tra elettroni in movimento, aspetto che porta ad un significativo errore. Il primo funzionale DFT specifico che tenesse in considerazione l'energia cinetica di elettroni interagenti ed il potenziale di scambio è stato il modello Thomas-Fermi-Dirac per la nube elettronica uniforme⁴⁷.

I metodi DFT moderni scorporano l'energia elettronica in funzionali "universali", che considerano l'energia cinetica degli elettroni non interagenti, il potenziale attrattivo nucleo-elettrone e quello repulsivo coulombiano elettrone-elettrone, e funzionali "specifici" che apportano il termine correttivo all'energia cinetica poiché gli elettroni costituiscono degli oggetti aventi moto interdipendente, il potenziale di scambio e di correlazione (equazione 4.6).

$$(4.6) E_{el}[\rho_{el}] = \overbrace{-T_{el,ni}[\rho_{el}] - E_{ne}[\rho_{el}] + E_{ee}[\rho_{el}]}^{\text{universal functionals}} + \overbrace{V_{corr}[\rho_{el}] + V_{exc}[\rho_{el}] + \Delta T_{el}[\rho_{el}]}^{\text{specific functionals}}$$

I funzionali devono rispettare delle proprietà fondamentali, ad esempio devono riportare un'energia di interazione interelettronica pari a zero se applicati ad un sistema monoelettronico o approssimare l'espressione dell'energia per il gas elettronico uniforme se applicati ad un sistema a densità costante.

L'espressione dei potenziali di correlazione e scambio secondo teoria DFT è stata basata su molteplici approssimazioni, di seguito elencate.

1. La prima approssimazione ad essere usata è stata la *Local Spin Density Approximation* o LSDA, la quale stabilisce che i potenziali V_{corr} e V_{exc} in un determinato punto dello spazio dipendono esclusivamente dalla densità elettronica nel punto r^k (equazioni 4.7 e 4.8).

$$(4.7) V_{corr} = V_{corr}[\rho_{el}^k] \quad (4.8) V_{exc} = V_{exc}[\rho_{el}^k]$$

2. Una approssimazione più accurata tiene in considerazione la dipendenza non solo dalla densità elettronica, ma anche dalla variazione della stessa nel punto. Questa approssimazione è detta *Generalized Gradient Approximation* (GGA), in quanto si considera il gradiente della densità elettronica nel funzionale oltre alla densità stessa (equazioni 4.9 e 4.10).

$$(4.9) V_{corr} = V_{corr}[\rho_{el}^k, \nabla\rho_{el}|_{r=r^k}] \quad (4.10) V_{exc} = V_{exc}[\rho_{el}^k, \nabla\rho_{el}|_{r=r^k}]$$

3. Il passo successivo dopo l'approssimazione GGA consiste nell'espandere la dipendenza dell'energia introducendo il Laplaciano della densità, similmente ad un'espansione di Taylor. Quest'approccio è detto *Meta-Generalized Gradient Approximation* o *meta-GGA*. Nel caso in cui il calcolo DFT venga sviluppato attraverso un approccio orbitalico, il Laplaciano della densità elettronica può essere sostituito con una quantità correlata, la densità di energia cinetica orbitalica $\tau(\vec{r})$ (equazioni 4.11-4.14).

$$(4.11) V_{corr} = V_{corr}[\rho_{el}^k, \nabla\rho_{el}|_{r=r^k}, \nabla^2\rho_{el}|_{r=r^k}]$$

$$(4.12) V_{exc} = V_{exc}[\rho_{el}^k, \nabla\rho_{el}|_{r=r^k}, \nabla^2\rho_{el}|_{r=r^k}]$$

$$(4.13) \tau(\vec{r}) = \frac{1}{2} \sum_i^{occ} |\nabla\phi_i(\vec{r})|^2$$

$$(4.14) \tau(\vec{r}) = \frac{3}{10} (6\pi^2)^{\frac{2}{3}} \rho^{\frac{5}{3}} + \frac{1}{72} \frac{|\nabla\rho(\vec{r})|^2}{\rho(\vec{r})} + \frac{1}{6} \nabla^2\rho(\vec{r})$$

I funzionali DFT possono essere basati su una di queste tre approssimazioni e nel caso si basino unicamente su queste sono definiti “*Local DFT*”, poiché i potenziali dipendono dal punto nello spazio per il quale sono calcolati. I DFT locali più efficaci si basano sulle approssimazioni GGA e *meta*-GGA. Esistono funzionali detti “*non-local*” che si distinguono dai precedenti perché, oltre a considerare le approssimazioni precedenti, includono l’energia di scambio secondo il metodo Hartree-Fock (HF), modello che non descrive l’energia di correlazione ma permette il calcolo accurato dell’energia di scambio⁴⁷.

Data la natura del calcolo dell’energia di scambio secondo questo approccio, diventa necessaria la definizione degli orbitali molecolari, diversamente dai metodi *local*, che possono calcolare l’energia di scambio solo sulla base della densità elettronica in un insieme di punti.

I funzionali che determinano l’energia di scambio utilizzando sia la definizione *local* (LSDA, GGA o *meta*-GGA) che il modello di Hartree-Fock sono quindi funzionali ibridi. Opportuni parametri ottimizzati pesano i contributi per l’energia di scambio da entrambe le teorie. Per esempio, nel noto funzionale B3LYP il potenziale di scambio è costituito per il 20% da V_{excHF} (scambio Hartree-Fock), per l'8% da V_{excS} (scambio Slater LSDA) e per il 72% da V_{excB} (scambio GGA di Becke), mentre il termine relativo all'energia di correlazione è costituito per il 19% da V_{corrWVN} (correlazione WVN LSDA) e per l'81% da V_{corrLYP} (correlazione LYP GGA)^{47,46}. Il rapporto tra le componenti locali e non locali può essere fissato o variabile nel caso di funzionali *range-separated*.

L’energia di correlazione, trascurata nel metodo Hartree-Fock, è introdotta nei metodi DFT solitamente attraverso funzionali di tipo *local*, per quanto negli ultimi anni siano stati sviluppati approcci *non-local*, come ad esempio il funzionale VV10⁴⁹.

Un passo fondamentale nella teoria DFT è stato l’approccio di Kohn e Sham⁵⁰ che si poneva come obiettivo di migliorare la precedente teoria cambiando le definizioni dei funzionali introdotti da Hohenberg-Kohn ed introducendo gli orbitali elettronici nella definizione di densità elettronica, dato che il modulo quadro di una funzione d’onda rappresenta una densità di probabilità, la quale viene associata alla densità elettronica. La funzione d’onda elettronica Ψ_{el} è dipendente dalle $3N$ coordinate degli N elettroni del sistema ed è possibile derivarne la densità elettronica attraverso l’integrale rispetto a $N-1$ coordinate riportato nell’equazione 4.15:

$$(4.15) \rho_{el} = \rho_{el}(\vec{r}) = \int |\Psi_{el}(r_1, r_2, \dots, r_N)|^2 dr_2, \dots, dr_N$$

Alternativamente, la densità elettronica può essere ottenuta dagli orbitali molecolari o cristallini ψ_i secondo l'equazione 4.16:

$$(4.16) \rho_{el} = \sum_i |\psi_i|^2$$

A loro volta gli orbitali sono solitamente approssimati e calcolati attraverso combinazioni lineari di opportune funzioni di base.

La densità elettronica è legata al numero di elettroni N presenti nel sistema ed è scomponibile nei singoli contributi delle densità monoelettroniche secondo le equazioni 4.17 e 4.18:

$$(4.17) N = \int \rho_{el} dr$$

$$(4.18) \rho_{el} = \rho_1 + \rho_2 + \dots + \rho_N$$

Il modello di Kohn-Sham è affine al ben noto modello di Hartree-Fock, dato che il calcolo dell'energia elettronica viene risolto attraverso la divisione del problema in un sistema di equazioni monoelettroniche e per via delle similitudini nel trattamento di energia cinetica, attrazione elettrostatica elettrone-nucleo e repulsione Coulombiana⁴⁶.

Questo approccio permette di definire degli operatori monoelettronici, detti operatori di Kohn-Sham, che vanno a costruire un sistema di equazioni agli autovalori dove l'autovalore è l'energia del singolo orbitale monoelettronico^{47,51}.

$$(4.19) k_i(\rho_{el})\psi_i = \varepsilon_i\psi_i$$

$$(4.20) k_i = -\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_i^2 - \sum_k \frac{e^2 Z_k}{|r_i - r_k|} + \int \frac{\rho_{el}}{|r_i - r|} dr + XC$$

Gli operatori sono costituiti dal termine cinetico $-\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_i^2$ e da termini potenziali legati all'attrazione nucleo-elettrone, alla repulsione interelettronica Coulombiana, alla correlazione

e allo scambio. Il termine XC (scambio-correlazione) non ha un'espressione unica ma dipende dal funzionale DFT in uso.

La risoluzione di questo sistema di equazioni differenziali richiede un metodo iterativo *Self-Consistent-Field* (SCF) in quanto gli operatori di Kohn-Sham dipendono dalla densità elettronica, che a sua volta è legata agli orbitali ψ_i . Il processo SCF, che restituisce orbitali e relative energie, è rappresentato in *Figura 13*.

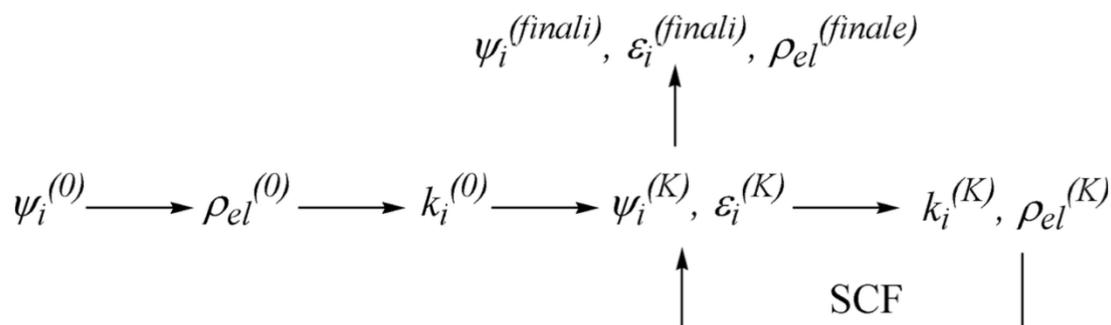


Figura 13 Rappresentazione schematica del processo SCF.

Durante il processo SCF gli orbitali molecolari vengono progressivamente ottimizzati a partire da un insieme di funzioni d'onda iniziali $\psi_i^{(0)}$ o da una densità elettronica iniziale ρ_{el}^0 , a loro volta ricavati da metodi non iterativi quali l'approssimazione degli elettroni indipendenti o la *superposition of atomic densities*⁴⁷.

4.3.2 Basis sets

Si definisce *basis set* l'insieme di funzioni (*basis functions*) da cui si costruisce un orbitale molecolare. La descrizione matematica di un orbitale molecolare segue l'approccio LCAO, dove l'orbitale molecolare è definito dalla combinazione lineare di orbitali atomici (equazione 4.21)⁴⁷:

$$(4.21) \psi_i = \sum_m a_m \phi_m$$

Attraverso gli orbitali molecolari, dati dall'ottimizzazione delle combinazioni lineari durante il processo SCF, è poi possibile calcolare l'energia del sistema oggetto di studio.

In chimica computazionale esistono diversi tipi di *basis sets*. Tra i primi si annoverano gli *Slater-type orbitals* (STO), funzioni d'onda che seguono la proporzionalità riportata nell'equazione 4.22 per la componente radiale^{41,46}.

$$(4.22) \phi \propto e^{-\alpha r}$$

In un sistema di coordinate polari le componenti angolari sono invece descritte dalle armoniche sferiche. Sebbene utilizzati, gli STO presentano un carico computazionale maggiore e sono stati rimpiazzati dai *Gaussian Type Orbitals* (GTO), i quali approssimano la componente radiale degli STO attraverso una combinazione lineare (*contrazione*) di funzioni gaussiane per ridurre il carico computazionale necessario al calcolo di determinati integrali (equazione 4.23)^{41,46,47}.

$$(4.23) STO \cong \sum_g c_g (GTO)_g \quad GTO = NY_{l,m}(\theta, \varphi) r^{2n-2-l} e^{-\alpha_g r^2}$$

La parte angolare $NY_{l,m}(\theta, \varphi)$ delle funzioni è analoga agli STO. Le singole funzioni gaussiane usate nella combinazione lineare sono dette primitive.

La qualità dell'approssimazione è in prima istanza legata al numero di primitive, in quanto le funzioni gaussiane decadono molto più rapidamente delle funzioni esponenziali e il corretto profilo è approssimato da un congruo numero di gaussiane. È stato stabilito che il numero di primitive ideale per rapporto costo/accuratezza è pari a tre^{41,46}.

Un primo esempio di *basis set* GTO è l'STO-3G: in questo set un orbitale di Slater è approssimato da una singola contrazione di 3 gaussiane, come riportato nell'equazione 4.24:

$$(4.24) STO^{1s} = c_1^{1s} (GTO)_1^{1s} + c_2^{1s} (GTO)_2^{1s} + c_3^{1s} (GTO)_3^{1s}$$

Elementi come l'ossigeno, dove ad essere occupati sono rispettivamente gli orbitali 1s, 2s, 2p_x, 2p_y e 2p_z, sono descritti da un *basis set* costituito da 15 primitive. Se si considerasse l'uso di un *basis set* come l'STO-6G il numero di primitive salirebbe a 30 ed aumenterebbe sensibilmente il tempo di calcolo.

Quando un orbitale atomico è approssimato da una singola contrazione di funzioni gaussiane il *basis set* è definito *single- ζ* ed ogni funzione gaussiana possiede coefficienti α e c fissati e caratteristici di un determinato elemento. Durante il processo SCF, quando vengono determinate le espressioni degli orbitali molecolari, si ottimizzano le combinazioni lineari ricercando il valore ottimale dei coefficienti peso a_m riportato in equazione 4.21. La singola contrazione non subisce ottimizzazioni e questo aspetto conferisce una scarsa flessibilità ad un *basis set* di questo tipo.

Negli anni hanno trovato sempre maggiore impiego *basis sets* caratterizzati da un approccio diverso, che prevede che l'orbitale atomico non sia più rappresentato da una singola contrazione, ma da più contrazioni attraverso una procedura detta *decontrazione*. Questo tipo di *basis sets* è definito *multiple- ζ* e possiede il vantaggio di incrementare la qualità dell'approssimazione rispetto a *basis set* di dimensioni analoghe senza aumentare il numero assoluto di primitive. I tempi di calcolo aumentano perché cresce il numero di coefficienti a_m da ottimizzare in fase SCF e conseguentemente il numero di equazioni concatenate da risolvere^{46,47}. Un buon compromesso tra qualità dell'approssimazione e tempi di calcolo è dato dall'approccio *split-valence*, ovvero la limitazione dell'approccio *multiple- ζ* ai soli orbitali di valenza. Uno dei *basis set* più semplici di questo tipo è il 3-21G, dove il singolo orbitale atomico di valenza è approssimato da due contrazioni di gaussiane, una costituita dalla combinazione lineare di due primitive ed una seconda da una singola funzione gaussiana (equazione 4.25).

$$(4.25) \text{STO}^{1s} = a_1^{1s} [c_1^{1s} (\text{GTO})_1^{1s} + c_2^{1s} (\text{GTO})_2^{1s}] + a_2^{1s} (\text{GTO})_3^{1s}$$

Il numero di coefficienti da ottimizzare non raddoppia rispetto al *basis set* STO-3G, dato che viene mantenuto il *basis set single- ζ* per gli orbitali di *core*, ciascuno descritto da una contrazione di tre primitive^{41,46,47}. Va sottolineato che il numero di orbitali molecolari che si ottengono da una combinazione lineare è pari al numero di funzioni di base impiegate. *Basis sets* di tipo *multiple- ζ* sono composti da un numero di *basis functions* superiore rispetto agli orbitali atomici ad energie ragionevoli previsti per un dato elemento. Di conseguenza, il numero di orbitali molecolari ottenuti al termine del processo SCF risulta essere superiore rispetto agli orbitali atomici che idealmente dovrebbero comporre il sistema. Gli orbitali molecolari "in eccesso" rappresentano comunque soluzioni ad alta energia prive di particolare significato fisico⁴⁷.

I *basis sets* così costruiti possiedono una criticità legata al fatto che sono costituiti solo da approssimazioni di orbitali atomici di valenza centrati sui nuclei. La loro combinazione in orbitali molecolari potrebbe non essere sufficiente per una buona descrizione della distribuzione elettronica nelle regioni interatomiche, con conseguente sovrastima dell'energia del sistema. Il problema viene superato includendo nella combinazione lineare un *set* di funzioni dotate di numero quantico azimutale superiore, solitamente di un'unità rispetto agli orbitali di valenza. Per esempio, la regione interatomica di H₂ viene più fedelmente descritta aggiungendo alla sovrapposizione di orbitali s una piccola componente di orbitali p caratterizzati da opportuna componente radiale^{41,46,47}

Questo tipo di funzioni sono dette funzioni polarizzanti e sono concepite per incrementare la flessibilità del *basis set*. Il coefficiente peso di queste funzioni all'interno della combinazione lineare è piuttosto ridotto, ma rappresenta il più delle volte un miglioramento significativo nell'energia e nella localizzazione spaziale degli orbitali molecolari.

Nei *basis sets* può essere inclusa un'ulteriore categoria di funzioni, le *funzioni diffuse*^{46,47}. Similmente a quanto capita per le funzioni di polarizzazione, le funzioni diffuse permettono in certi casi una migliore descrizione degli orbitali e delle energie, dato che sono caratterizzate da una componente radiale che tende a zero per relativamente elevate distanze dai nuclei grazie al basso valore del parametro α . Il campo di impiego tipico delle funzioni diffuse è quello dei composti caratterizzati da nuvole elettroniche facilmente polarizzabili, come ad esempio composti anionici di atomi scarsamente elettronegativi.

La rappresentazione degli orbitali degli elementi, al netto dei progressi fatti in questo campo, è virtualmente possibile per tutti gli elementi della tavola periodica. Una difficoltà che sorge spostandosi lungo la tavola periodica è la crescente complessità degli elementi, che vedono un crescente numero di elettroni. L'aumento di questi ultimi porta ad un maggior numero di funzioni nel *basis set*, aspetto che rallenterebbe di molto i tempi di calcolo mantenendo questo approccio, detto *all electrons*.

Unitamente a questo aspetto meramente computazionale vi è pure l'incremento della carica nucleare netta dovuta al maggior numero di protoni nei nuclei pesanti. L'innalzamento del potenziale elettrostatico nucleare provoca un aumento della quantità di moto elettronica tale da causare degli effetti relativistici. In particolare, gli elettroni dotati di basso momento angolare, ovvero gli elettroni caratterizzati da numeri quantici azimutali l pari a 0 ed 1, subiscono una contrazione della loro orbita influenzando così la carica nucleare efficace

percepita dagli elettroni d ed f. Le orbite di questi ultimi si espandono a causa del maggior effetto schermante di elettroni s e p relativistici⁴⁷.

Per ridurre i tempi di calcolo in molti *basis sets* sono state introdotte le funzioni *Effective Core Potentials* o ECP^{41,46,47}, che riproducono gli effetti elettrostatici della nube elettronica al di sotto della sfera di valenza senza però dover includere esplicitamente tutti questi orbitali nel calcolo. È inoltre possibile introdurre negli ECP dei termini correttivi che riproducano le deviazioni indotte dagli effetti relativistici, semplificando ulteriormente i calcoli in presenza di elementi pesanti quali, ad esempio, Hg o Au senza introdurre pesanti modifiche all'Hamiltoniano e riducendo di conseguenza il carico computazionale.

4.3.3 Metodi e *basis sets* impiegati

4.3.3.1 Il funzionale PBEh-3c

Il funzionale ibrido PBEh-3c è stato sviluppato dal gruppo di ricerca computazionale di Stefan Grimme, ma trova la sua origine nel funzionale di Perdew-Burke-Ernzerhoff (PBE), metodo DFT locale basato sull'approssimazione GGA per la descrizione delle energie di scambio e correlazione.

Uno dei limiti del funzionale PBE, comune per i funzionali DFT *local*, è la scarsa accuratezza nella descrizione di interazioni *closed-shell long-range*, in particolare le forze di dispersione di London. La teoria di Kohn prevede infatti una dipendenza esclusiva dell'energia dalla densità elettronica e non dalla funzione d'onda, mentre le interazioni *long-range* trovano origine proprio dalla funzione d'onda. È stato osservato da Grimme e colleghi che il funzionale di Perdew-Burke-Ernzerhoff è puramente repulsivo nei confronti delle interazioni π - π e non riproduce con sufficiente accuratezza le forze di dispersione nei dimeri di Kr. È stata pertanto introdotta una correzione basata su un approccio teorico semiclassico che il gruppo di Grimme ha denominato D3. Questo tipo di correzioni, applicate a vari funzionali DFT, ha creato una famiglia di metodi detti DFT-D, i quali descrivono generalmente l'energia dispersiva tra una coppia di atomi tramite un polinomio di grado pari (equazione 4.26).

$$(4.26) E_{disp}^{DFT-D} = - \sum_{AB} \sum_{n=6,8,10\dots} s_n \frac{c_n^{AB}}{R_{AB}^n} f_{damp}(R_{AB})$$

Il termine s_n costituisce un fattore di scala, c_n^{AB} una costante empirica di dispersione, R_{AB}^n la distanza interatomica ed $f_{damp}(R_{AB})$ una funzione detta *damping* introdotta allo scopo di evitare errori di *double-counting* e singolarità per bassi valori di R. La correzione D3 nel metodo PBEh-3c utilizza la *damping function* di Becke-Johnson.

L'energia totale è calcolata in accordo con l'equazione 4.27. Oltre alla correzione per le forze di dispersione, l'equazione include il termine E_{BSE}^{gCP} , che corregge l'energia per gli errori legati alla finitezza del *basis set*, che possono portare ad una fittizia extra-stabilizzazione di addotti intramolecolari rispetto alle specie costituenti. Nello specifico, il metodo PBEh-3c è stato ottimizzato in combinazione con un *basis set split-valence double- ζ* derivato dal def2-SV(P) proposto da Ahlrichs e includente opportuni ECP per gli elementi più pesanti. Il *basis set* è parametrizzato per tutti gli elementi della tavola periodica ed è costituito da un numero relativamente limitato di primitive, a vantaggio dei tempi di calcolo. Le modifiche di Grimme hanno permesso un miglioramento delle prestazioni. Ad esempio, sono stati scalati gli esponenti delle funzioni s dell'idrogeno per compensare un noto errore sistematico del *basis set* originale, ovvero la sovrastima della lunghezza di legami coinvolgenti l'idrogeno⁵²⁻⁵⁵.

$$(4.27) E_{tot}^{PBEh-3c} = E_{tot}^{PBEh} + E_{disp} + E_{BSE}^{gCP}$$

Essendo questo un metodo ibrido, il termine concernente l'energia di scambio è stato combinato con una percentuale di scambio HF fissata empiricamente, come riportato nell'equazione 4.28:

$$(4.28) E_{XC}^{PBEh} = (1 - a_x)E_X^{PBE} + a_x E_X^{HF} + E_C^{PBE} \text{ con } a_x = 0.42$$

4.3.3.2 I funzionali TPSSO e TPSSH

Entrambi i funzionali sono delle versioni ibride e migliorate del preesistente funzionale *meta-GGA TPSS* studiato da Tao, Perdew, Scuderia e Staroverov, che sfrutta la densità di energia

cinetica orbitalica $\tau(\vec{r})$ per il calcolo dell'energia di scambio e di correlazione. TPSS0 e TPSSh sono funzionali DFT ibridi, quindi l'energia totale è ottenuta pesando una certa percentuale di energia di scambio calcolata a livello HF, 25% nel caso di TPSS0 e 10% nel TPSSh (equazione 4.29).

$$(4.29) E_{XC}^{TPSSh/0} = (1 - a_x)E_X^{TPSS} + a_x E_X^{HF} + E_C^{TPSS} \text{ con } a_x = 0.10 \text{ o } 0.25$$

I funzionali non includono termini correttivi per il BSSE poiché, secondo gli autori, il *basis set* utilizzato per il benchmark è sufficientemente grande. I due metodi utilizzati non prevedono nemmeno l'uso di correzioni per le forze di dispersione di London e, seppur implementate successivamente, non sono state utilizzate in questo lavoro di tesi^{56,57}.

Per quanto concerne i *basis sets* impiegati nello svolgimento dei calcoli computazionali, è stato deciso di utilizzare il def2-SVP in combinazione con il funzionale TPSS0 e il def2-TZVP con TPSSh, entrambi proposti da Weigend e Ahlrichs. Come accennato precedentemente, def2-SVP è un *basis set split-valence double- ξ* dotato di funzioni di polarizzazione. Il *basis set* def2-TZVP si distingue dal precedente per il numero di contrazioni, tale da renderlo *triple- ζ* in valenza, oltre che per le funzioni di polarizzazione.

Entrambi i *set* base sono dotati di ECP Stuttgart-Dresden per gli elementi con $Z > 37$. Per esempio, nel caso dell'ittrio lo pseudopotenziale include i 28 elettroni di *core* da 1s a 3d (ECP-28).⁵⁸.

4.3.3.3 Il funzionale r^2 SCAN-3c

Questo funzionale DFT deriva dal funzionale SCAN (*Strongly Constrained and Appropriately Normed*), un metodo *meta*-GGA che utilizza la densità di energia cinetica orbitalica $\tau(\vec{r})$ in luogo del Laplaciano della densità similmente al funzionale TPSS descritto precedentemente. Si distingue da altri funzionali DFT assimilabili per l'aderenza completa a 17 vincoli esatti imposti alle energie di correlazione-scambio, come descritto da Sun e colleghi. Esempi di questi vincoli sono negatività dell'energia di scambio, non-positività dell'energia di correlazione, energia di correlazione pari a zero in sistemi monoelettronici, conformità al gas

elettronico uniforme. Dal momento che il funzionale “reale” E_{XC} non è noto ma approssimato, il rispetto di questi vincoli promette di ottenere dei risultati fisicamente consistenti.

Il funzionale SCAN non è però efficiente in termini computazionali, soprattutto in termini di stabilità numerica, pertanto sono state effettuate da autori diversi una serie di modifiche che ne hanno migliorato efficienza ed accuratezza. La prima modifica ha prodotto un funzionale numericamente più stabile e rinominato Regularized SCAN o rSCAN, il quale però non rispetta più strettamente tutti i vincoli citati precedentemente. La seconda modifica, detta Regularized Restored SCAN o r²SCAN, ha migliorato l’efficienza mantenendo l’aderenza ai vincoli. Questo funzionale, grazie alle modifiche effettuate, ha quindi delle prestazioni paragonabili al metodo TPSS ed una buona robustezza numerica. Il gruppo di ricerca di Grimme ha poi implementato la correzione semiempirica D4, la correzione cGP per il *basis set* e costruito un *basis set triple- ξ ad hoc*. L’espressione dell’energia comprende quindi due correzioni, similmente al funzionale PBEh-3c (equazione 4.30).

$$(4.30) E_{tot}^{r^2SCAN-3c} = E_{tot}^{r^2SCAN} + E_{disp}^{D4} + E_{cGP}$$

Il *basis set* costruito per il metodo è basato sui preesistenti def-TZVP e def2-TZVP ed è il risultato di un lavoro di miglioramento dell’accuratezza e della consistenza cominciato da Grimme con il metodo B97-3c, dotato anch’esso di un *set* derivato dai due sopracitati TZVP di Ahlrichs. Sono stati cambiati i *pattern* di contrazione, gli esponenti delle funzioni e le funzioni di polarizzazione ed il *basis set* è stato così designato dalla sigla mTZVPP, dove m sta per “*modified*” e PP rimanda alle nuove funzioni di polarizzazione⁵⁹⁻⁶².

4.3.3.4 Il metodo semiempirico GFN2-xTB

Questo metodo computazionale semiempirico è stato sviluppato dal gruppo di ricerca di Grimme e fa parte di una “gerarchia” di modelli quantomeccanici *low level* caratterizzati da diversi gradi di approssimazione. GFN2-xTB costituisce il vertice della gerarchia in virtù delle approssimazioni considerate. L’acronimo che forma il nome sta per *Geometries, Frequencies, Non covalent interactions eXtended Tight Binding*.

I metodi GFN sono derivati dai modelli DFTB (*Density Functional Tight-Binding*). L'energia totale del sistema (funzionale della densità) è approssimata attraverso un'espansione di Taylor rispetto alle fluttuazioni della densità ($\delta\rho$), in cui ogni termine di grado n rappresenta un contributo all'energia che può essere considerato o meno a seconda del grado di approssimazione (equazione 4.31).

$$(4.31) E[\rho] = E^{(0)}[\rho_0] + E^{(1)}[\rho_0, \delta\rho] + E^{(2)}[\rho_0, (\delta\rho)^2] + E^{(3)}[\rho_0, (\delta\rho)^3] + \dots$$

In GFN2-xTB si considera quest'espressione per l'energia troncata al terzo ordine. Il calcolo dell'energia parte da una densità elettronica di riferimento ρ_0 , risultante dalla somma di densità elettroniche atomiche. L'espressione può essere riarrangiata in termini dipendenti da ρ_0 e dalle fluttuazioni di densità di carica atomiche. La minimizzazione dell'energia del sistema è ottenuta attraverso l'ottimizzazione iterativa delle cariche parziali atomiche (approccio SCC, *self-consistent charges*). Una importante approssimazione applicata ai metodi DFTB è l'assunzione che le suddette fluttuazioni di densità elettronica coinvolgano solo gli elettroni di valenza, mentre gli elettroni di *core* rimangono non perturbati.

A differenza dei modelli DFT classici, la funzione d'onda elettronica è formalmente *spin-restricted* e non sono presenti termini dipendenti dalla densità di spin. Quindi, gli spin-orbitali α e β hanno sempre parti spaziali ed energie orbitaliche identiche, ma possibilmente occupazione diversa. Gli orbitali molecolari ψ_i sono espressi come combinazioni lineari di orbitali ortogonali centrati sull'atomo, a loro volta approssimati con contrazioni di primitive, da tre a sei. Vengono trattati esplicitamente solo gli elettroni di valenza e per atomi con $Z > 9$ sono introdotte funzioni di polarizzazione ^{43,63-65}.

4.3.4 Simulazione IR e termodinamica

La spettroscopia infrarossa coinvolge transizioni vibrazionali ed è quindi strettamente legata al moto nucleare. Dai dati provenienti da una simulazione IR è possibile ricavare molte informazioni riguardanti la termodinamica del sistema in esame.

Se la PES di una molecola è nota, nel contesto dell'approssimazione di Born-Oppenheimer è possibile formulare e risolvere l'equazione di Schrödinger per il moto nucleare, in accordo con l'equazione 4.32:

$$(4.32) \left[- \sum_k \frac{1}{2m_k} \nabla_k^2 + U(q) \right] \Xi(q) = E^{vib} \Xi(q)$$

La funzione d'onda nucleare è indicata con Ξ . L'operatore Hamiltoniano nucleare è composto da due termini, ovvero la somma dei termini cinetici di ciascun nucleo e l'energia potenziale $U(q)$ dipendente dall'insieme delle coordinate interne q e rappresentante l'energia della PES. Sfortunatamente, l'intera superficie di energia potenziale $U(q)$ è solitamente ignota. Durante un'ottimizzazione geometrica vengono calcolati solo alcuni valori corrispondenti ad alcuni insiemi di coordinate fino al raggiungimento della convergenza. Ciò che è noto con precisione alla fine di un'ottimizzazione geometrica è l'insieme delle coordinate per cui le derivate prime dell'energia sono pari a zero⁴⁷.

Al termine di una ottimizzazione geometrica è quindi noto un punto stazionario che può rappresentare un minimo locale o un punto di sella, se è stato ottimizzato uno stato di transizione. Per ottenere un'espressione per $U(q)$ da introdurre nell'Hamiltoniano nucleare sono necessarie delle approssimazioni.

Si considerino le vibrazioni di un legame. Il caso più semplice è costituito da una molecola biatomica AB, che può essere descritta per mezzo della sola coordinata interna r . Indicando con r_{eq} la distanza interatomica d'equilibrio, il valore dell'energia potenziale $U(r)$ può essere approssimato per piccoli scostamenti dal minimo da un'espansione di Taylor (equazione 4.33).

$$(4.33) U(r) = U(r_{eq}) + \left. \frac{\partial U}{\partial r} \right|_{r=r_{eq}} (r - r_{eq}) + \frac{1}{2!} \left. \frac{\partial^2 U}{\partial r^2} \right|_{r=r_{eq}} (r - r_{eq})^2 + \frac{1}{3!} \left. \frac{\partial^3 U}{\partial r^3} \right|_{r=r_{eq}} (r - r_{eq})^3 + \dots$$

È possibile imporre che il valore di U all'equilibrio sia nullo, $U(r_{eq}) = 0$. Inoltre, per $r = r_{eq}$ la derivata prima dell'energia in funzione di r deve essere pari a zero, poiché r_{eq} rappresenta un punto stazionario. Per questi motivi, i primi due termini dell'espansione di Taylor sono pari a zero. Se volessimo terminare l'espansione di Taylor al termine quadratico, l'equazione risultante sarebbe una parabola (equazione 4.34).

$$(4.34) U(r) = \frac{1}{2} \left. \frac{\partial^2 U}{\partial r^2} \right|_{r=r_{eq}} (r - r_{eq})^2, \text{ dove } \left. \frac{\partial^2 U}{\partial r^2} \right|_{r=r_{eq}} = k_{AB} \text{ costante di forza}$$

Attraverso l'approssimazione armonica riportata nell'equazione 4.34 diventa nota una forma approssimata del potenziale ed è possibile completare l'espressione dell'equazione di Schrödinger per la funzione d'onda nucleare della molecola biatomica AB (equazione 4.35).

$$(4.35) \left[-\sum_k \frac{1}{2m_k} \nabla_k^2 + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 U}{\partial r^2} \Big|_{r=r_{eq}} (r - r_{eq})^2 \right] \Xi(q) = E^{vib} \Xi(q)$$

Il termine cinetico può essere semplificato attraverso la massa ridotta del sistema (equazione 4.36).

$$(4.36) -\sum_k \frac{1}{2m_k} \nabla_k^2 = -\left(\frac{1}{2m_A} \frac{d^2}{dr^2} + \frac{1}{2m_B} \frac{d^2}{dr^2} \right) = -\frac{1}{2} \frac{m_A + m_B}{m_A m_B} \frac{d^2}{dr^2} = -\frac{1}{2m^*} \frac{d^2}{dr^2}$$

Per una molecola generica il numero di variabili aumenta coerentemente con le coordinate interne, ma l'approccio può essere esteso considerando l'espansione di Taylor per una funzione di n variabili. La relativa equazione di Schrödinger assume la forma riportata nell'equazione 4.37.

$$(4.37) \left[-\sum_k \frac{1}{2m_k} \nabla_k^2 + \frac{1}{2} (q - q_{eq})^T H_{eq} (q - q_{eq}) \right] \Xi(q) = E^{vib} \Xi(q)$$

H_{eq} è la matrice Hessiana relativa al punto di equilibrio espresso dal vettore q_{eq} , il quale contiene le coordinate interne di equilibrio. Gli autovalori della suddetta equazione rappresentano l'energia degli stati vibrazionali molecolari, che sono legati alla frequenza di vibrazione ω_m del modo normale vibrazionale (m) tramite l'equazione 4.38:

$$(4.38) E_m^{vib} = \left(n + \frac{1}{2} \right) \hbar \omega_m \text{ dove } n = 0, 1, 2 \dots$$

n è il numero quantico vibrazionale. Nel caso dell'approssimazione armonica le regole di selezione impongono transizioni tra stati vibrazionali con $\Delta n = \pm 1$, per cui per una transizione vibrazionale l'energia associata è data dall'equazione 4.39:

$$(4.39) E_m^{vib} = \hbar\omega_m$$

Il numero di modi normali vibrazionali di una molecola è dipendente dal numero N di atomi costituenti la stessa e dalla sua geometria. In caso di geometria non lineare, il numero di modi indipendenti è pari a $3N-6$ ⁴⁷.

L'equazione di Schrödinger derivata nel presente paragrafo è però applicabile solo a geometrie corrispondenti a punti di minimo o di sella e permette di calcolare le frequenze delle transizioni vibrazionali nell'ambito dell'approssimazione armonica. Dal momento che le citate frequenze sono proporzionali alla radice quadrata della costante di forza, la quale è legata alla concavità o convessità della PES, ne consegue che sarà possibile distinguere una geometria corrispondente ad uno stato di transizione dalla presenza di una frequenza immaginaria^{46,47}.

Dalla risoluzione dell'equazione di Schrödinger per il moto nucleare si ottiene una stima delle frequenze vibrazionali. Come nel caso delle simulazioni UV-VIS, descritte nel prossimo paragrafo, anche gli spettri IR calcolati sono una semplice rappresentazione grafica dei dati ottenuti e sono costituiti da bande infinitamente strette. L'intensità I_m di una transizione vibrazionale è proporzionale al quadrato del momento dipolare di transizione e quindi alla variazione del momento di dipolo (equazione 4.40).

$$(4.40) I_m \propto |\mu_m^{trans}|^2, \quad I_m \propto \left(\frac{d\mu}{dq}\right)^2$$

Da un punto di vista computazionale il calcolo delle intensità di banda restituisce risultati qualitativi, in quanto l'intensità delle transizioni infrarosse è prevista calcolando le derivate seconde dell'energia rispetto al moto nucleare e ad un campo elettrico esterno F , essendo il momento di dipolo la prima derivata dell'energia rispetto a F ⁴⁷(Equazione 4.41).

$$(4.41) I_m \propto \left(\frac{d\mu}{dq}\right)^2 \Rightarrow I_m \propto \left(\frac{\partial^2 U}{\partial q \partial F}\right)^2$$

È importante porre l'accento sul fatto che l'energia di una molecola in un punto (di minimo o sella) non è semplicemente pari all'energia elettronica sommata al potenziale di repulsione nucleare, dato che l'approssimazione di Born-Oppenheimer ha posto pari a zero l'energia cinetica nucleare. La simulazione IR permette di correggere l'energia con un termine dipendente dalle masse atomiche, la *Zero Point Vibrational Energy* o ZPVE, che emerge dalla quantizzazione dell'energia degli stati vibrazionali fondamentali. L'energia del *ground state* vibrazionale ($n = 0$) non è mai pari a zero ed è un termine che va sommato ai contributi precedenti per ottenere l'energia del sistema^{41,46,47}. L'energia vibrazionale di punto zero a sua volta è la somma delle energie del primo livello di ogni modo vibrazionale (Equazione 4.42).

$$(4.42) E_0 = E_{el} + V_{nucleare}(q_{eq}) + ZPVE \text{ dove } ZPVE = \sum_m E_m^{vib} = \sum_m \frac{1}{2} \hbar \omega_m$$

Note l'energia della molecola e le frequenze vibrazionali è inoltre possibile il calcolo di contributi termici necessari per determinare l'entalpia e l'entropia della molecola e quindi l'energia libera di Gibbs. I contributi termici per sistemi molecolari vengono comunemente stimati attraverso equazioni derivanti dalla termodinamica statistica⁴⁷.

4.3.5 Modelli di solvatazione

La grandezza fondamentale che descrive l'interazione soluto-solvente è l'energia libera di solvatazione, ΔG_{sol} . Questa quantità è chiamata anche energia libera di trasferimento e si riferisce alla variazione di energia libera dovuta al passaggio di una molecola dalla fase gassosa alla fase condensata. L'energia libera di solvatazione, di cui si riporta l'espressione nell'equazione 4.43, è dovuta a vari contributi, tra cui i principali sono:

- I. Interazioni elettrostatiche ΔG_{el} ;
- II. Energia libera di cavitazione ΔG_{cav} ;
- III. Interazioni dispersive ΔG_{disp} .

$$(4.43) \Delta G_{sol} = \Delta G_{el} + \Delta G_{cav} + \Delta G_{disp}$$

La variazione dell'energia libera associata alle interazioni elettrostatiche tra soluto e solvente, ΔG_{el} , è sempre inferiore a zero. Solo se si considera la dissoluzione di specie completamente apolari come i gas nobili ΔG_{el} è nulla⁴⁷.

La variazione dell'energia libera ΔG_{el} è causata dall'interazione tra i momenti multipolari del solvente e del soluto. I momenti multipolari delle molecole del solvente si orientano in funzione del soluto, con la conseguente formazione di un campo elettrico. Questo campo elettrico, noto come *reaction field* F , influenza il soluto, aumentandone la polarità. L'aumento di polarità del soluto favorisce a sua volta l'orientamento delle molecole di solvente e quindi aumenta il *reaction field*. Il processo di orientamento delle molecole di solvente e di polarizzazione del soluto non può tuttavia continuare all'infinito. L'orientamento delle molecole di solvente intorno al soluto diminuisce l'entropia del sistema. Inoltre, le molecole di solvente interagiscono sfavorevolmente con il campo elettrico che esse stesse creano. Infine, l'incremento eccessivo dei multipoli del soluto causerà una distorsione destabilizzante della nuvola di elettroni del soluto stesso. ΔG_{el} è quindi il valore di equilibrio tra i fenomeni opposti. Un altro processo fisico associato alla solvatazione è la cavitazione, ovvero la formazione di una cavità nella struttura del solvente che ospita il soluto. La variazione di energia libera associata alla creazione della cavità, ΔG_{cav} , è sempre maggiore di zero; la cavitazione è un processo termodinamicamente sfavorevole. Il valore di ΔG_{cav} include, oltre al lavoro necessario per creare la cavità, la riduzione dell'entropia del sistema associata alla riorganizzazione delle molecole di solvente in prossimità della cavità stessa.

Un contributo energetico fondamentale nel processo di solvatazione è dato dalle interazioni di dispersione, ΔG_{disp} , ovvero le interazioni di Van der Waals tra solvente e soluto. Pur manifestandosi solo a brevi distanze, essendo proporzionali a r^{-6} , queste interazioni sono essenziali per la comprensione del comportamento di sostanze sia apolari che molto polari, dato che sono sempre energeticamente favorevoli e sono spesso la componente dominante della coesione molecolare.

A seconda del sistema in esame, possono esserci ulteriori contributi energetici associati alla solvatazione. Ad esempio, nel caso di soluti polari in solventi protici diventa importante la formazione di legami ad idrogeno tra le molecole di soluto e di solvente. In ogni caso, va sottolineato che non è possibile, dal punto di vista sperimentale, misurare separatamente i vari contributi all'energia libera di solvatazione.

Per modellizzare questi contributi energetici si fa solitamente uso di modelli di solvatazione implicita invece di considerare esplicitamente le molecole di solvente, in quanto aumenterebbe il carico computazionale e sarebbero introdotti degli errori derivanti dalla scarsa capacità dei metodi computazionali più comuni di descrivere le interazioni *long-range* soluto-solvente e solvente-solvente. In questo modello di solvatazione la presenza del solvente è simulata dall'introduzione di un mezzo continuo in grado di interagire con il soluto. La solvatazione modifica la struttura elettronica del soluto, principalmente a causa delle interazioni elettrostatiche. È possibile modellare il solvente come un mezzo continuo con un campo elettrico nelle regioni occupate dal soluto. Il campo elettrico F in un determinato punto è il gradiente del potenziale elettrostatico $\phi(r)$ in quel punto, che può essere calcolato in funzione della densità di carica $\rho_c(r)$ del soluto e della costante dielettrica ϵ^D del mezzo mediante l'equazione di Poisson (equazione 4.44).

$$(4.44) \nabla^2 \phi(r) = -\frac{4\pi\rho_c(r)}{\epsilon^D}$$

La densità di carica $\rho_c(r)$ può essere espressa sia come una funzione continua nello spazio, sia come un insieme di cariche puntiformi discrete, a seconda del modello teorico utilizzato. Sulla base dell'equazione di Poisson è possibile calcolare l'energia associata all'interazione elettrostatica tra soluto e solvente, secondo l'equazione 4.45:

$$(4.45) G_{el} = -\frac{1}{2} \int \rho_c(r) \phi(r) dr$$

Per calcolare la componente elettrostatica della variazione di energia libera dovuta alla dissoluzione, ΔG_{el} , è sufficiente sottrarre dall'energia G_{el} calcolata per il solvente considerato quella calcolata in fase gassosa ($\epsilon^D = 1$), come riportato nell'equazione 4.46:

$$(4.46) \Delta G_{el} = G_{el}(\epsilon^D = \epsilon_{solvente}^D) - G_{el}(\epsilon^D = 1)$$

L'equazione di Poisson è alla base del calcolo della componente elettrostatica dell'interazione soluto-solvente, ma la sua risoluzione è generalmente complessa. In alcuni casi può essere risolta analiticamente e questa è la base di molti modelli approssimati di solvatazione implicita.

Nel 1920 Born ricavò la componente elettrostatica dell'energia libera di solvatazione per una carica situata in una cavità sferica del solvente di raggio a . Nel modello di Born la componente elettrostatica della variazione di energia libera dovuta alla dissoluzione ΔG_{el} è data dall'equazione 4.47:

$$(4.47) \Delta G_{el} = -\frac{q^2}{2a} \left(1 - \frac{1}{\epsilon^D}\right)$$

L'equazione di Born nella sua forma originale può essere adattata ai sistemi poliatomici combinandola con le equazioni che descrivono le interazioni coulombiane tra cariche parziali. Su questa base è stato sviluppato il più semplice dei modelli impliciti di solvatazione, noto come *Generalized Born* (GB). Il modello di Born generalizzato descrive la distribuzione di carica del soluto utilizzando un insieme di cariche atomiche parziali centrate sugli atomi, rappresentando così la molecola come un insieme di monopoli distribuiti nello spazio. Essenziale per il corretto funzionamento dei metodi basati sul modello GB è la scelta di appropriati raggi atomici (raggi di Born) e la definizione delle cariche parziali. Queste ultime possono derivare sia da equazioni di *molecular mechanics* sia da analisi di popolazione come quella di Mulliken⁴⁷.

Un esempio di metodo GB recente impiegato nel corso della tesi è il metodo ALPB (*Analytical Linearized Poisson-Boltzmann*)⁶⁶, implementato con successo nei metodi DFTB e xTB dal gruppo di Grimme in virtù della sua efficienza computazionale e robustezza. La ripartizione dell'energia di solvatazione è riportata nell'equazione 4.48:

$$(4.48) \Delta G_{solv} = \Delta G_{polar} + \Delta G_{non-polar} + \Delta G_{HB}$$

I contributi energetici riportati rappresentano rispettivamente il contributo polare dipendente dal potenziale elettrostatico, il contributo non-polare che è influenzato dalla forma della cavità e dal contributo associato ai legami a idrogeno. Il contributo ΔG_{polar} è dipendente, come nell'equazione originale di Born, dalla costante dielettrica del solvente, dai raggi atomici di Born opportunamente corretti e dalle cariche parziali assegnate ai singoli atomi. La componente non-polare $\Delta G_{non-polar}$, che tiene conto dell'energia di cavitazione e delle interazioni di dispersione, è dipendente dalla tensione superficiale e dalla superficie accessibile al solvente dei singoli atomi. Infine, il contributo energetico dato dai legami a

idrogeno ΔG_{HB} è determinato da un'equazione parametrica dipendente dai momenti di dipolo elettrico di donatore ed accettore.⁶⁶⁻⁶⁸

Un approccio per superare il modello di Born, dipendente dalle cariche parziali assegnate ai singoli atomi, è il *polarizable continuum model* (PCM). La variante considerata nel corso della tesi in combinazione con i calcoli DFT è il *conductor-like polarizable continuum model* (C-PCM). La cavità è generata a partire dagli atomi costituenti secondo un modello *space-filling*. All'interno della cavità la costante dielettrica è uguale a quella del vuoto, mentre all'esterno assume il valore del solvente desiderato. Una volta definita la cavità, la superficie viene mappata in modo omogeneo da piccoli elementi superficiali, detti tessere. Il calcolo della struttura elettronica del soluto permette di assegnare ad ogni singola tessera una carica parziale, sulla base della quale viene ricavato il potenziale elettrostatico, dipendente dalla costante dielettrica del solvente. Il *reaction field* F complessivo viene generato considerando i contributi di tutte le tessere. Dato però che il potenziale elettrostatico dipende dalle cariche parziali, che a loro volta dipendono da una struttura elettronica influenzata da F , la procedura richiesta è iterativa e termina con il raggiungimento di una distribuzione di carica superficiale costante (*self-consistent reaction field* SCRF)^{47,69,70}.

4.3.6 Time-Dependent DFT

La teoria DFT di Kohn-Sham permette di calcolare l'energia di un sistema di fermioni sottoposto ad un potenziale stazionario ma non permette la descrizione dei sistemi dinamici dove l'Hamiltoniano, e di conseguenza anche la funzione d'onda, dipende dal tempo (equazione 4.49). In questi sistemi la non stazionarietà degli stati è dovuta alla presenza di una perturbazione esterna come un potenziale variabile nel tempo, ad esempio un'onda elettromagnetica.

$$(4.49) \quad \hat{H}(t)\Psi(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_N, t) = i \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_N, t)$$

L'introduzione della dipendenza dal tempo nella teoria DFT porta ad una nuova branca di quest'ultima, la *Time-Dependent DFT*.

Il formalismo di questa teoria è basato sul teorema di Runge-Gross, l'analogo *time-dependent* del già citato teorema di Hohenberg-Kohn. Si consideri un sistema a molti corpi caratterizzato

da uno stato stazionario iniziale Ψ_0 . Tra le componenti dell'Hamiltoniano viene introdotto un potenziale esterno dipendente dal tempo $V(\vec{r}, t)$, che produce una funzione d'onda dipendente dal tempo $\Psi(t)$ a partire dallo stato iniziale Ψ_0 e una densità dipendente dal tempo $n(\vec{r}, t)$. Per esempio, il potenziale $V(\vec{r}, t)$ dato da un laser può essere espresso secondo l'equazione 4.50, dove E , ω e α rappresentano rispettivamente l'ampiezza, la frequenza e la polarizzazione del laser.

$$(4.50) V_{laser}(t) = E \sin(\omega t) \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \alpha$$

Il teorema di Runge-Gross dimostra che esiste una corrispondenza biunivoca tra la densità dipendente dal tempo $n(\vec{r}, t)$ e potenziale applicato $V(\vec{r}, t)$. Per un dato stato iniziale, la densità elettronica dipendente dal tempo è un funzionale unico del potenziale, ma anche il potenziale esterno è un funzionale unico della densità dipendente dal tempo. La densità dipendente dal tempo è quindi sufficiente per ottenere una grandezza osservabile desiderata di un sistema a molte particelle dipendente dal tempo.

La densità elettronica *time-dependent* è ottenuta secondo l'approccio TDKS (*Time-Dependent Kohn-Sham*) sulla base degli orbitali molecolari monoelettronici di Kohn-Sham dipendenti dal tempo $\varphi_i(t)$, a loro volta ottenuti dalla risoluzione di equazioni di Kohn-Sham dipendenti dal tempo (equazione 4.51). Tra i termini potenziali compare, oltre alla interazione coulombiana $V_{coulomb}$ e al potenziale di correlazione-scambio V_{XC} , anche il potenziale esterno dipendente dal tempo V_{Ext} .

$$(4.51) i \frac{\partial}{\partial t} \varphi_i(t) = \left[-\frac{\nabla^2}{2} + V_{ext} + V_{coulomb} + V_{XC} \right] \varphi_i(t)$$

La densità elettronica dipendente dal tempo si ricava dagli orbitali monoelettronici secondo l'equazione 4.52:

$$(4.52) n(t) = \sum_{i=1}^{occ} |\varphi_i(t)|^2$$

Data la dipendenza dal tempo di tutti i potenziali riportati nell'equazione 4.51, i calcoli vengono semplificati nei casi in cui il potenziale esterno sia di debole entità attraverso

un'approssimazione nota come *linear response*, che considera la densità elettronica dipendente dal tempo $n(t)$ come somma della densità elettronica *ground state* e di una densità elettronica linearmente dipendente dal potenziale applicato. Il calcolo di quest'ultima quantità ha come conseguenza la determinazione delle frequenze di risonanza tra il sistema studiato e il potenziale applicato e quindi la simulazione delle transizioni elettroniche ⁷¹.

4.3.7 Spostamento chimico NMR

Un nucleo k caratterizzato da spin I_k è dotato di un momento magnetico μ_k , direttamente proporzionale a I_k attraverso il rapporto giromagnetico γ_k . Il momento magnetico interagisce con un magnetico esterno B secondo l'equazione 4.53:

$$(4.53) \Delta E = -\mu_k \cdot (1 - \sigma_k)B$$

σ_k rappresenta la costante di schermo, ovvero la differenza tra il campo magnetico esterno e quello realmente percepito dal nucleo per via dell'influenza della struttura elettronica. Dato che μ_k e B possono avere tra loro una qualsiasi orientazione, σ_k è un tensore, ma nella comune spettroscopia NMR in soluzione è sufficiente ricavare il valore isotropico medio, dato dall'equazione 4.54:

$$(4.54) \sigma_k = \frac{1}{3}(\sigma_k^{xx} + \sigma_k^{yy} + \sigma_k^{zz})$$

Una volta deciso un opportuno riferimento, ad esempio il tetrametilsilano TMS per i nuclei ^1H e ^{13}C , lo spostamento chimico δ_k è dato dalla differenza tra la costante di schermo del riferimento e del nucleo indagato (equazione 4.55).

$$(4.55) \delta_k = \sigma_{ref} - \sigma_k$$

Da un punto di vista computazionale, l'introduzione di un campo magnetico richiede una modifica dell'Hamiltoniano nella sua componente cinetica con l'aggiunta di un termine vettoriale A legato al campo magnetico B , dato che B è il rotore di A . La relazione tra A e B non

è però strettamente biunivoca, dato che A può essere definito sulla base dell'equazione 4.56, dove R_0 rappresenta un termine arbitrario, detto origine di *gauge*.

$$(4.56) A = \frac{1}{2} B \times (r - R_0)$$

Nei sistemi reali il campo magnetico è indipendente dalla scelta dell'origine di *gauge* e lo stesso vale per le proprietà magnetiche calcolate se la funzione d'onda utilizzata è esatta. Le funzioni d'onda calcolate con i comuni metodi computazionali sono però approssimate e la finitezza dei *basis sets* impiegati rende i risultati dipendenti dall'origine scelta. Un approccio impiegato nel corso dell'attività di tirocinio che elimina la dipendenza dall'origine di *gauge* delle proprietà calcolate consiste nel rendere il *basis set* esplicitamente dipendente dal campo magnetico mediante l'inserimento di un fattore di fase complesso riferito alla posizione della funzione base. Tali funzioni di base sono rinominate GIAO, *Gauge-Invariant/Including Atomic Orbitals*. Attraverso l'implementazione DFT di questo approccio è possibile calcolare le principali proprietà magnetiche di una molecola o di un ensemble, tra cui i tensori dei *chemical shielding* da cui è possibile estrapolare i dati di *chemical shift*. Il sistema di equazioni monoelettroniche di Kohn-Sham, in cui l'operatore è stato modificato tenendo conto dell'inclusione del campo magnetico, viene risolto costruendo gli orbitali molecolari come somma di GIAOs per rimuovere la dipendenza dall'origine di *gauge*⁷²⁻⁷⁴.

5 Risultati e discussione

5.1 Estrazione e caratterizzazione sperimentale della PCB

La ficocianobilina (PCB) è stata estratta da campioni di alga spirulina commerciali. Dopo un primo lavaggio del materiale di partenza con metanolo a temperatura ambiente, soluzioni di PCB grezza in metanolo sono state ottenute mediante estrazione a caldo in continuo. Dopo aver separato per precipitazione buona parte del materiale proteico derivante dal processo di estrazione, la PCB è stata purificata attraverso filtrazione di soluzioni concentrate in opportuni solventi ed eluizione selettiva su gel di silice. Sfortunatamente, a causa della natura del materiale di partenza ogni preparazione ha portato all'isolamento di pochi mg di PCB. La regione delle alte frequenze dello spettro ^1H NMR conferma comunque l'accettabile grado di purezza, dato tra 7.0 e 5.9 ppm sono presenti solo quattro risonanze, tre singoletti associati ai frammenti metinici congiungenti gli eterocicli ed un quartetto dovuto al CH metilenico esociclico, accoppiato con il sostituente metilico (*Figura 14*).

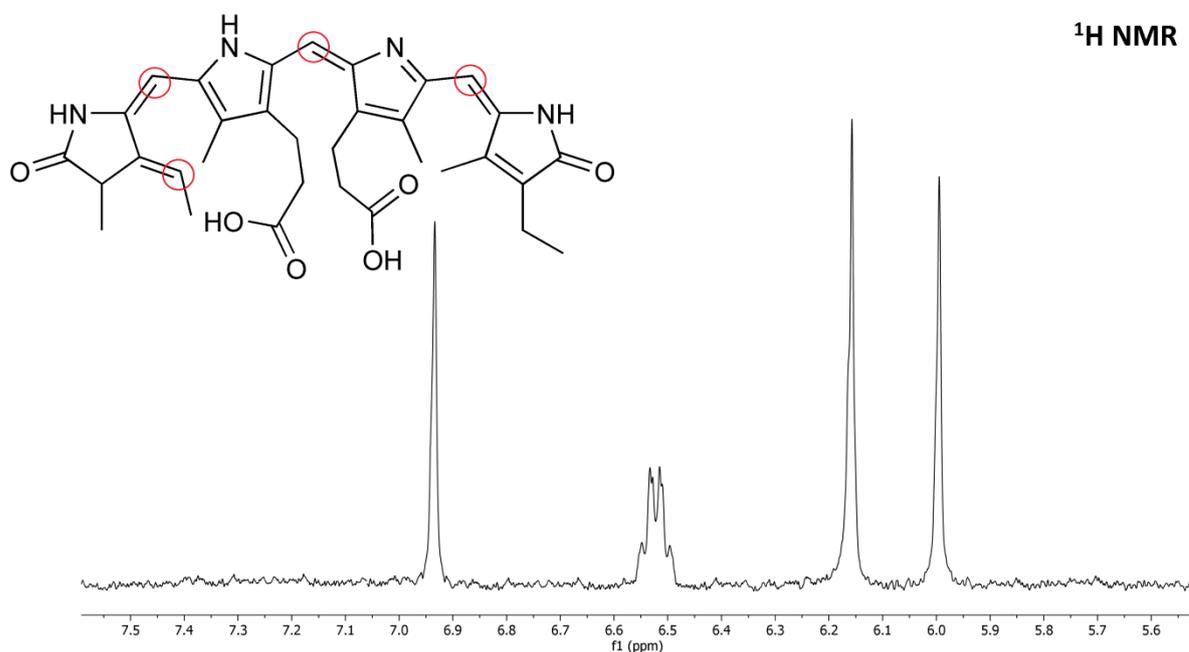


Figura 14 Porzione dello spettro ^1H NMR della PCB (CD_3OD , 300 K.)

Un ulteriore dato di caratterizzazione è stato ricavato dallo spettro IR riportato in *Figura 15*, che mostra nella regione compresa tra 1600 e 1400 cm^{-1} bande attribuibili agli stiramenti dei gruppi carbossilici, sovrapposte ad altre vibrazioni della molecola. Gli stiramenti ν_{CH} sono

compresi tra 3000 e 2850 cm^{-1} , mentre gli stiramenti ν_{NH} e ν_{OH} attesi nella regione a numeri d'onda superiori a 3000 cm^{-1} non sono individualmente riconoscibili.

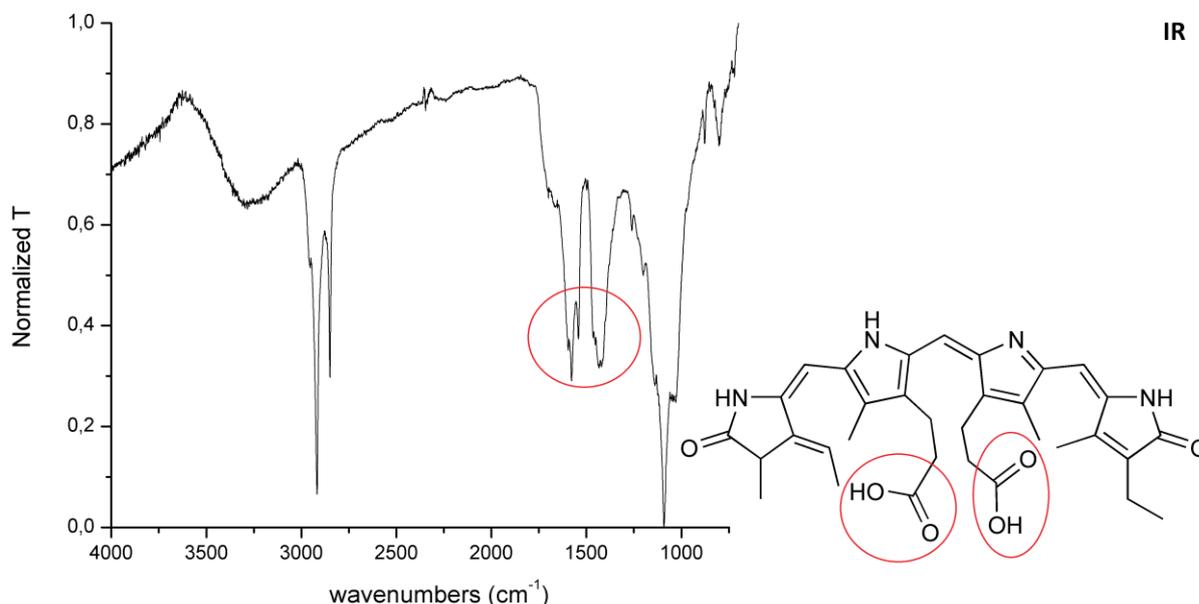


Figura 15 Spettro IR della PCB (finestre di KBr).

Lo spettro di assorbimento (ABS) della PCB in metanolo è coerente con la letteratura, con una banda allargata centrata intorno a 600 nm associata alla transizione $S_1 \leftarrow S_0$ in cui sono rilevabili *shoulders* attribuibili alla struttura vibrazionale o alla presenza di diversi conformeri in soluzione. Una seconda intensa banda di assorbimento, dovuta alla popolazione di uno stato eccitato di singoletto a maggiore energia, è centrata nel vicino ultravioletto (Figura 16). Per eccitazione della PCB in metanolo con radiazione *near-UV* è stato ottenuto lo spettro di emissione (PL) mostrato in Figura 16, composto da due bande centrate a 636 e 690 nm. La separazione tra le due bande è pari a 1230 cm^{-1} , una quantità coerente con le vibrazioni caratteristiche degli anelli pirrolici, quindi la presenza di due bande potrebbe essere attribuibile alla struttura vibrazionale della PCB, come riportato in letteratura. Lo *Stokes shift* tra assorbimento ed emissione, misurato tra i punti di minimo delle due bande principali degli spettri ABS e PL, suggerisce una ridotta distorsione della geometria tra stato fondamentale e stato eccitato emettente, essendo pari a 1330 cm^{-1} .

In accordo con l'ipotesi di una sola specie emettente in soluzione, gli spettri di eccitazione (PLE) sono risultati indipendenti dalla lunghezza d'onda di emissione. Un esempio di spettro di eccitazione è riportato in Figura 16, sovrapposto allo spettro di assorbimento. Il massimo PLE nella regione dell'ultravioletto cade a 336 nm, spostato a lunghezze d'onda inferiori

rispetto alla corrispondente banda di assorbimento. Una seconda banda PLE, grossolanamente simmetrica rispetto all'emissione, presenta un massimo a 575 nm.

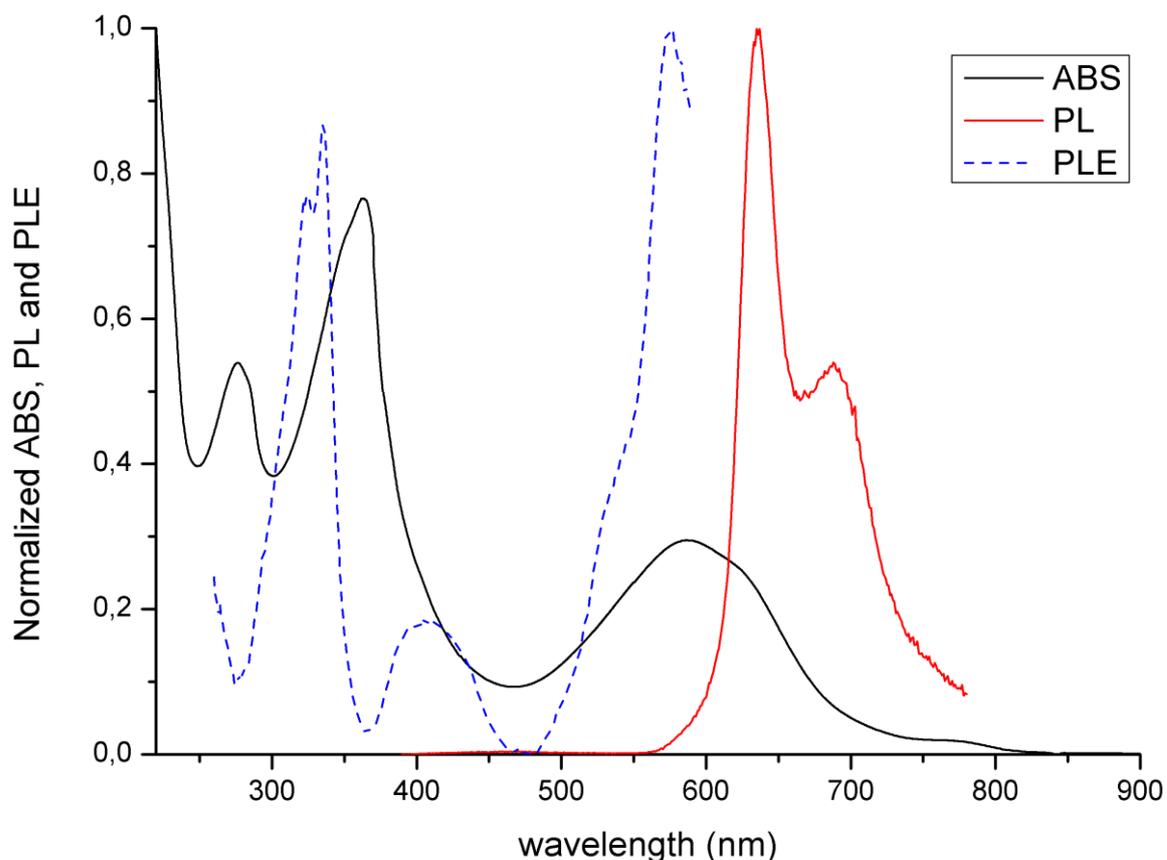


Figura 16 Spettri normalizzati di assorbimento (ABS), emissione (PL, $\lambda_{eccitazione} = 336$ nm) ed eccitazione (PLE, $\lambda_{emissione} = 636$ nm) della PCB in metanolo a temperatura ambiente.

In accordo con quanto osservato registrando gli spettri PLE a diverse lunghezze d'onda di emissione, gli spettri PL sono risultati indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione, come osservabile nello spettro 3D riportato in Figura 17. A ulteriore conferma di una sola specie emettente presente in soluzione, il tempo di vita ottenuto dalle curve di decadimento è risultato indipendente dalla lunghezza d'onda di emissione. Il valore ottenuto, 6 ns, indica che l'emissione dalla PCB è una fluorescenza organica. Un esempio di curva di decadimento è mostrato in Figura 17. Non sono stati osservati ulteriori decadimenti caratterizzati da costanti temporali più elevate, escludendo quindi il coinvolgimento di stati eccitati con molteplicità diversa da quella dello stato fondamentale.

La resa quantica di fluorescenza della PCB in metanolo, calcolata per confronto con la rodamina 6G, è risultata molto contenuta, pari allo 0.4%.

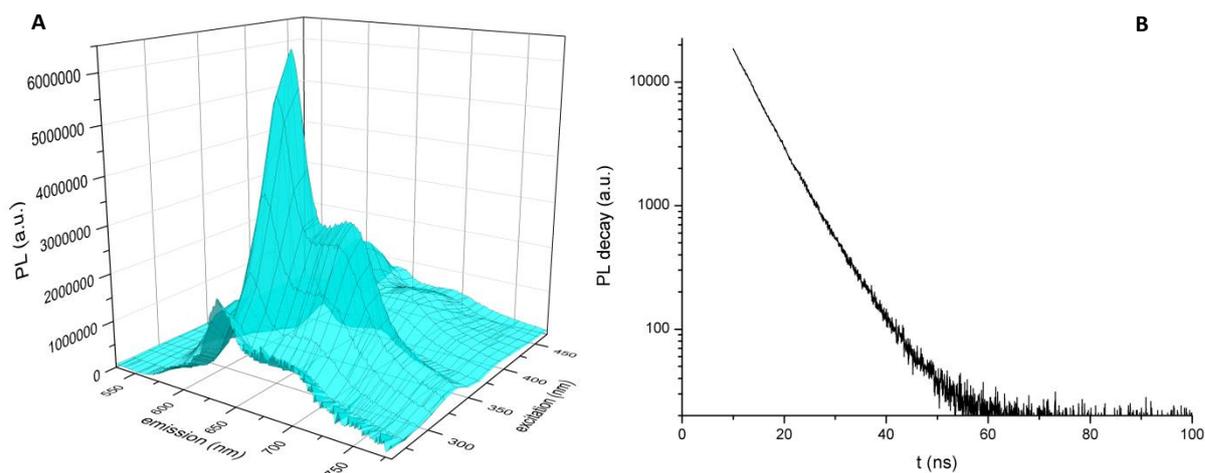


Figura 17: (A) Spettro di luminescenza 3D; (B) plot semilogaritmico del decadimento dell'emissione ($\lambda_{eccitazione} = 373 \text{ nm}$, $\lambda_{emissione} = 636 \text{ nm}$) della PCB in metanolo a temperatura ambiente.

5.2 Modello molecolare di partenza

Per costruire il modello molecolare della PCB su cui eseguire i calcoli quantomeccanici è stata inizialmente considerata la struttura terziaria della C-PC del *Synechococcus Elongatus*. In particolare, è stata isolata una delle due catene costituenti l'unità monomerica tramite il software Chimera⁷⁵ ed è stata estratta la struttura del cromoforo legato covalentemente ad un frammento cisteinico. I dati strutturali provengono da misure a raggi X⁷⁶, pertanto gli atomi di idrogeno non sono riportati. Si riporta in *Figura 18* la catena isolata dal monomero. Si osserva la presenza del cromoforo legato allo zolfo del residuo cisteinato.

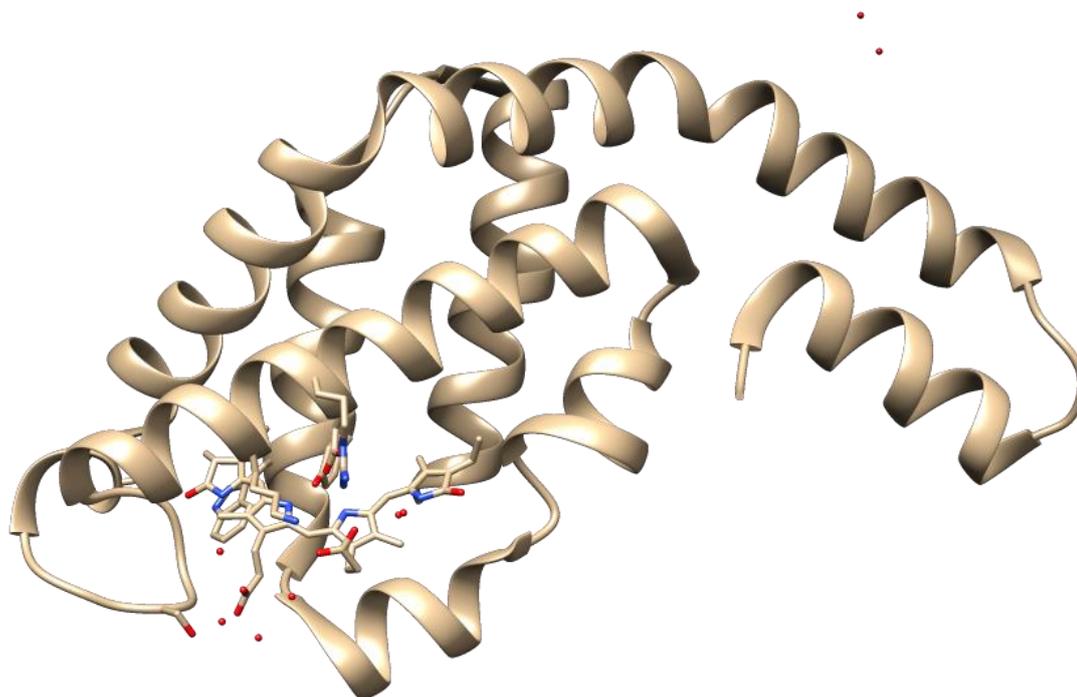


Figura 18 Monomero proteico della C-PC.

Per completare il modello molecolare con il numero appropriato di atomi di idrogeno è stato utilizzato il software Spartan '14 [Spartan '14, version 1.1.4, Wavefun, Inc., Irvine (USA), 2014]. La posizione dei nuclei costituenti lo scheletro è stata bloccata e i nuclei di idrogeno sono stati aggiunti in numero congruo ai rispettivi atomi considerando le formule di struttura riportate in letteratura. Tramite ottimizzazione geometrica MMFF⁷⁷ implementata nel software i nuclei aggiunti sono stati posizionati alle distanze di legame previste dal modello. La struttura ottenuta, di cui si presenta la numerazione degli atomi utilizzata in *Figura 19*, costituisce il *guess* iniziale della molecola. Ai fini dei calcoli computazionali è stata considerato un ambiente di solvatazione a pH neutro, pertanto i due frammenti carbossilici sono stati considerati deprotonati. Ulteriori considerazioni sullo stato di protonazione verranno discusse nei prossimi paragrafi.

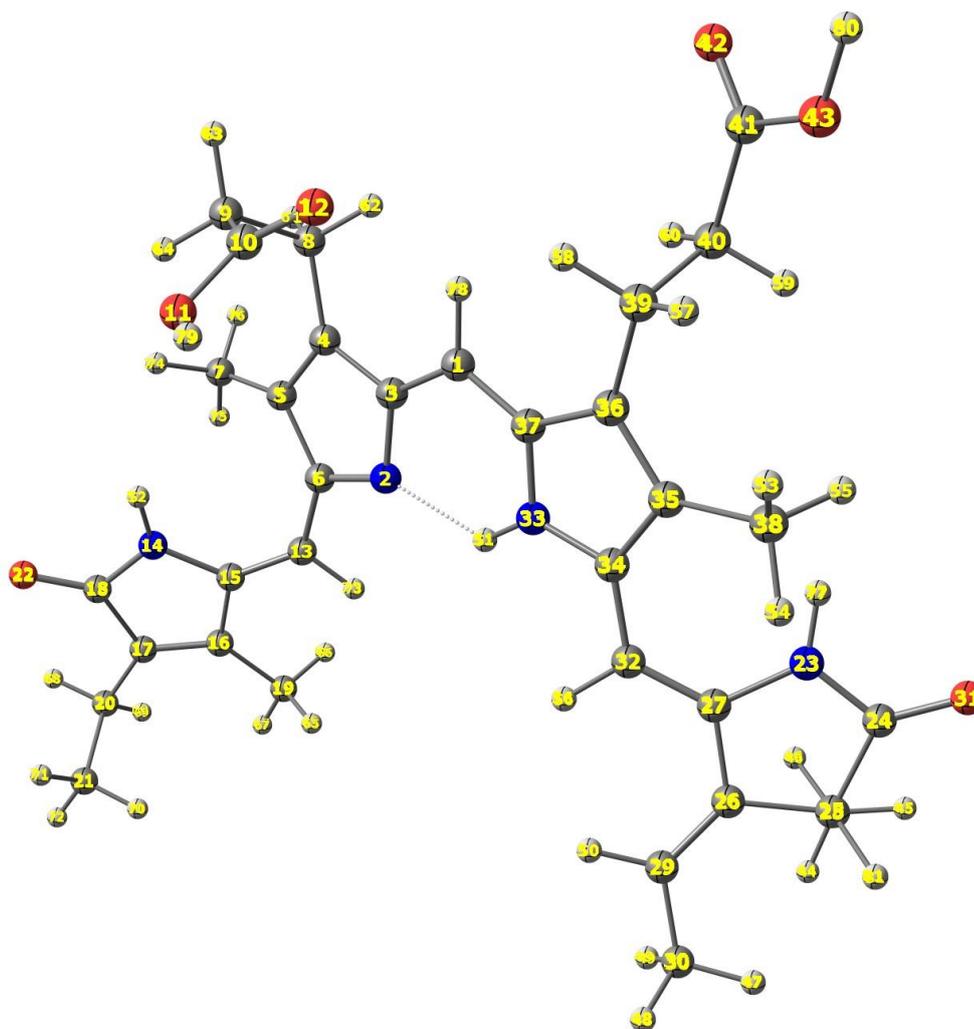


Figura 19 Numerazione degli atomi.

5.3 Calcoli semiempirici GFN2-xTB sulla PCB

Il modello molecolare di partenza è stato sottoposto ad ottimizzazione geometrica tramite il modello semiempirico GFN2-xTB a livello di convergenza stretta. Il parametro “tight” si riferisce ad una tolleranza per l’energia di convergenza pari $1 \cdot 10^{-6}$ Eh. È stato impiegato come modello di solvatazione il modello ALPB ed il solvente simulato è stato l’acqua. La geometria d’equilibrio ottenuta è riportata in *Figura 20*.

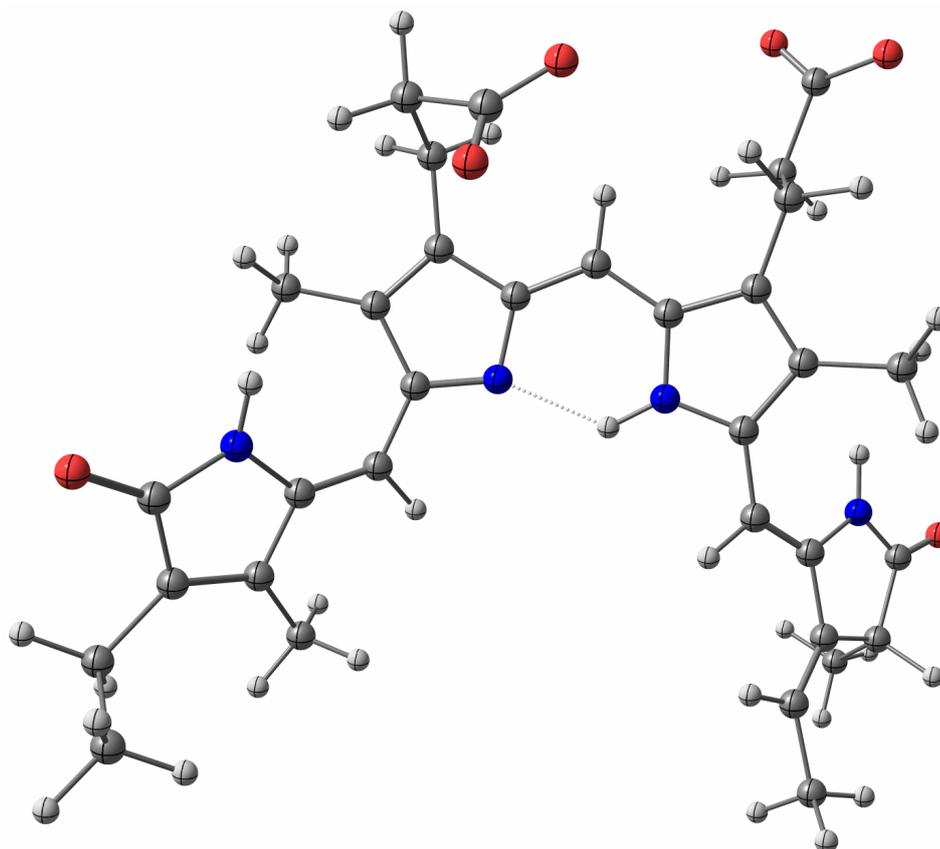


Figura 20 Struttura molecolare ottimizzata a livello GFN2-xTB.

La struttura ottenuta è stata confrontata con quella derivata dalle misure a raggi X ed è stata calcolata la *Root Mean Square Deviation* (RMSD) con l'ausilio del software *Chemcraft*⁷⁸, escludendo dal calcolo gli atomi di idrogeno non riportati nei dati sperimentali. In *Figura 21* è mostrata la sovrapposizione delle due strutture, in bianco quella sperimentale ed in grigio il modello teorico. Il modello molecolare ottimizzato presenta un valore di RMSD pari a 0.95 Å, un valore accettabile considerando la flessibilità dei sostituenti sugli anelli pirrolici. Considerando la struttura tetrapirrolica centrale, la differenza principale rispetto alla PCB legata alla struttura proteica risiede in un avvicinamento dei due eterocicli centrali grazie all'instaurarsi di un ponte a idrogeno.

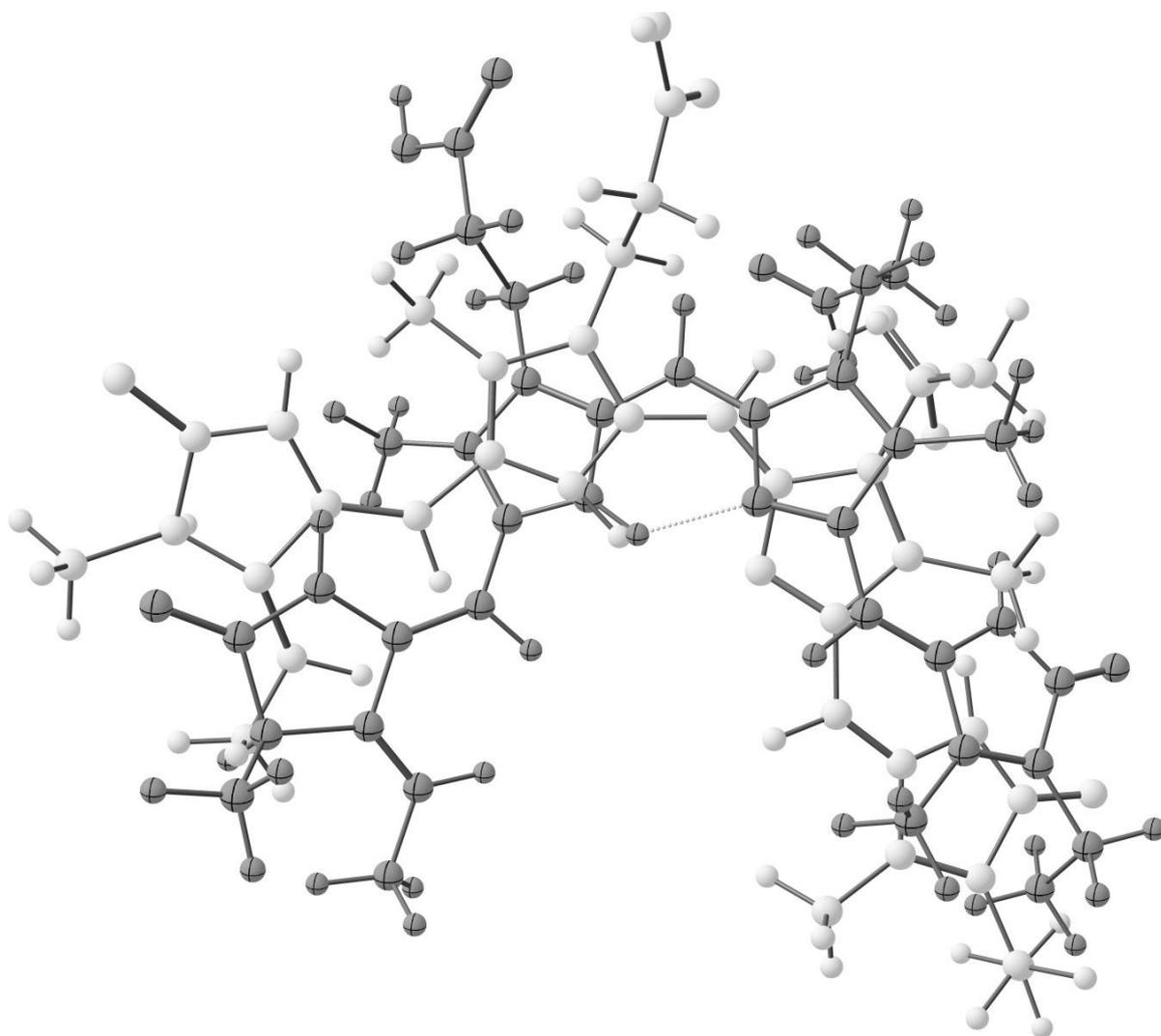


Figura 21 Sovrapposizione tra la struttura molecolare derivante dai raggi X con atomi di idrogeno ottimizzati MMFF (bianco) e struttura ottimizzata a livello ALPB/GFN2-xTB (grigio).

Per valutare le differenze a livello orbitalico tra la PCB legata e libera è stata modellata ed ottimizzata la PCB legata ad una catena di tredici residui amminoacidici, la cui carica è stata assegnata considerando pH neutro. La sequenza impiegata, PEGKAKCARDIGY, è stata estratta direttamente dalla struttura proteica utilizzata per generare il *guess* iniziale. Il frammento cisteinato è stato considerato deprotonato, conseguentemente la carica negativa associata è stata sommata alla carica totale assegnata al modello. Non sono stati applicati vincoli geometrici agli amminoacidi costituenti il peptide. Questo modello è stato utilizzato per determinare le differenze energetiche degli orbitali di frontiera tra i due modelli. I dati sono riassunti in *Tabella 2*.

Tabella 2 Energie degli orbitali di frontiera per PCB e PCB legata ad un oligopeptide calcolate a livello ALPB/GFN2-xTB.

Modello	HOMO (Eh)	LUMO (Eh)	H-L gap [eV]
PCB	-0.3442	-0.2995	1.22
PCB+peptide	-0.3154	-0.2762	1.07

È osservabile che il gap HOMO-LUMO aumenta del 20% circa nella PCB libera e che gli orbitali di frontiera sono a energia minore. La ragione potrebbe essere imputabile all'assenza della carica negativa delocalizzata sul sistema π della PCB portata dal cisteinato. Nonostante le differenze energetiche, la localizzazione degli orbitali di frontiera è la medesima tra PCB libera e legata alla catena peptidica, come osservabile in *Figura 22*. In entrambi i casi HOMO e LUMO sono centrati sul sistema π delocalizzato della PCB.

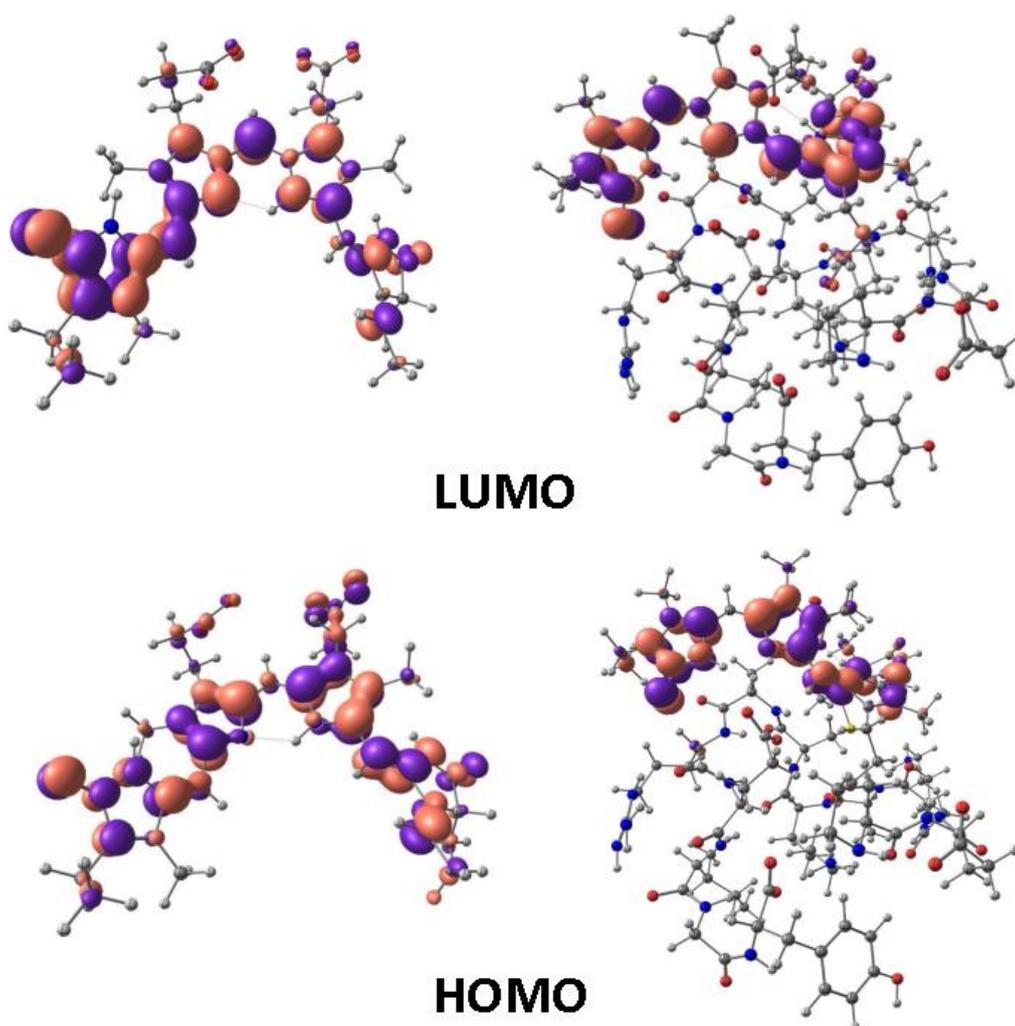


Figura 22 HOMO e LUMO della PCB libera e legata ad un oligopeptide calcolati a livello ALPB/GFN2-xTB. Isovalue 0.03 a.u.

5.4 Calcoli DFT sulla PCB

5.4.1 Ottimizzazione geometrica e simulazioni IR ed NMR

A seguito dei calcoli preliminari a livello semiempirico è stata svolta un'analisi computazionale più approfondita ed accurata a livello DFT, tramite l'impiego dei funzionali e *basis sets* descritti nel paragrafo 4.3.3 (PBEh-3c, r²SCAN-3c, TPSS0 e TPSSh, ognuno accoppiato ad uno specifico *set* di base). La geometria d'equilibrio è stata determinata per tutti i metodi, considerando acqua come solvente attraverso il modello di solvatazione implicito C-PCM. Le strutture ottenute sono state confrontate con i dati strutturali forniti dalle misure a raggi X, mantenendo come parametro di confronto geometrico il valore di RMSD riferita agli atomi C, N ed O. I valori, riportati in *Tabella 3*, evidenziano una migliore aderenza delle geometrie determinate con i funzionali di Grimme rispetto alle altre due, risultato probabilmente almeno in parte imputabile all'assenza di correzioni di dispersione e di *basis set completeness* nei metodi TPSS0 e TPSSh. Si ricorda che la correzione dispersiva in PBEh-3c è la D3, mentre per r²SCAN-3c è la D4. Non sembra esserci una marcata influenza del *basis set* nella determinazione della struttura d'equilibrio. In *Figura 23* è rappresentato un modello molecolare esemplificativo ottenuto con il metodo r²SCAN-3c, che presenta il valore di RMSD più basso.

Tabella 3 RMSD delle strutture ottimizzate a livello DFT contro il valore sperimentale.

Funzionale	RMSD vs exp
PBEh-3c	0.86
r ² SCAN-3c	0.83
TPSS0/def2-SVP	0.96
TPSSh/def2-TZVP	1.00

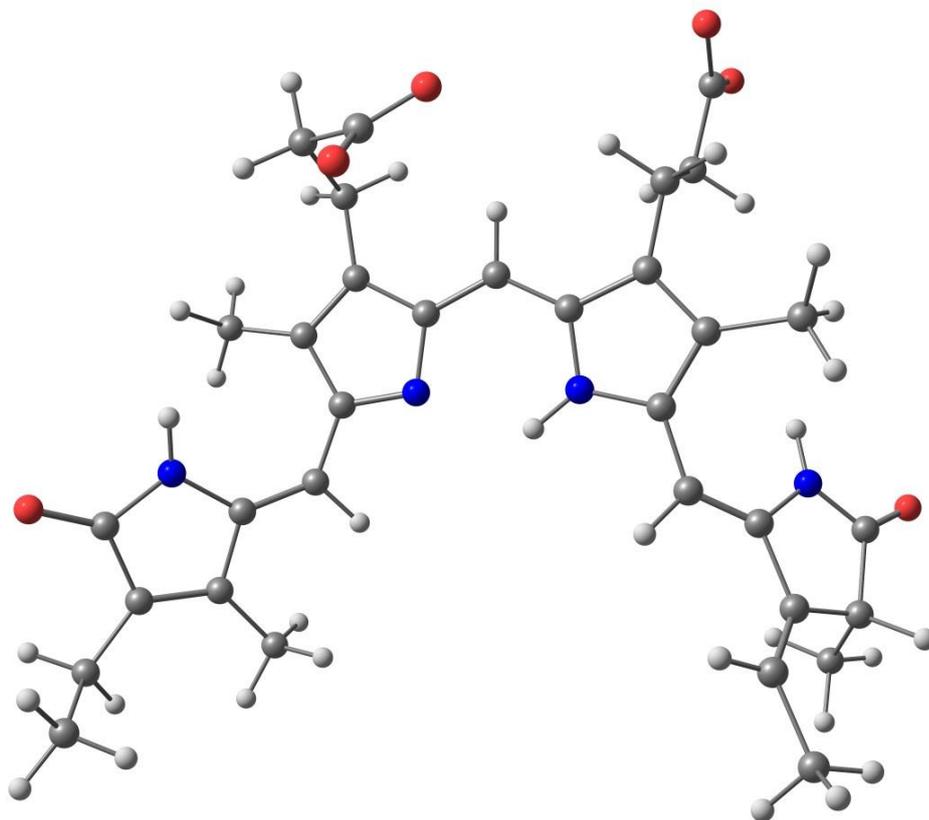


Figura 23 Struttura della PCB ottimizzata con il metodo C-PCM/r²SCAN-3c.

Le simulazioni IR confermano l'ottenimento di geometrie di equilibrio, data l'assenza di frequenze immaginarie. Considerando alcune vibrazioni prese a riferimento, riassunte in *Tabella 4*, si osservano differenze rispetto ai dati sperimentali di riferimento, almeno in parte imputabili all'approssimazione armonica. Va comunque notato che *basis sets* più limitati hanno come conseguenza una maggiore sovrastima dei numeri d'onda delle vibrazioni. Gli spettri IR simulati, interpolati con una *broadening function* lorentziana (FWHM = 8 cm⁻¹), sono confrontati in *Figura 24*.

Tabella 4 Transizioni vibrazionali riportate come esempio, dati espressi in cm⁻¹. Per la numerazione degli atomi di carbonio si veda *Figura 18*.

funzionale	VC-H C ₁	VC-H C ₁₃	VC-H C ₃₂	VC-H C ₂₉	VC=O C ₂₄	VC=O C ₁₈
PBEh-3c	3272	3254	3250	3237	1878	1844
r ² SCAN-3c	3180	3157	3162	3141	1737	1681
TPSS0/def2-SVP	3188	3226	3218	3203	1838	1792
TPSSh/def2-TZVP	3178	3159	3158	3139	1723	1668

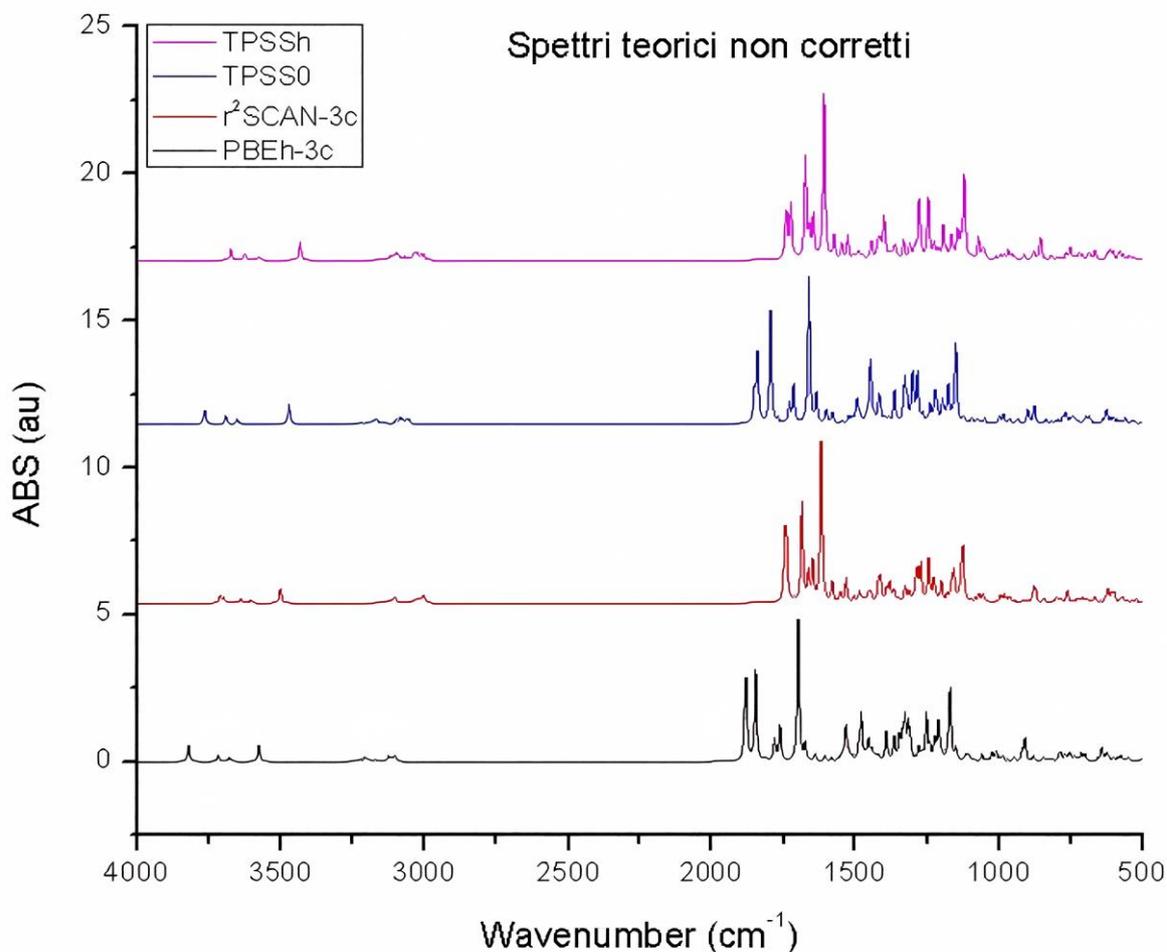


Figura 24 Spettri IR simulati secondo i diversi metodi DFT considerati.

Il calcolo dei *chemical shifts* protonici rispetto al tetrametilsilano (TMS) è stato effettuato utilizzando i valori medi di *chemical shielding* tra protoni equivalenti, corretto per il valore medio di *chemical shieldings* isotropico ottenuto per il TMS. I valori sono riportati in *Tabella 5*. Gli spostamenti chimici marcati con un asterisco sono segnali di protoni labili (pirrolici o acidi), riportati per completezza ma soggetti ad un consistente errore di metodo, dato che non sono previsti fenomeni di scambio e interazioni puntuali soluto-solvente che influenzano lo spettro NMR reale. I quattro metodi utilizzati hanno restituito in generale valori tra loro coerenti. Considerando la regione delle alte frequenze, investigata anche da un punto di vista sperimentale (vedasi capitolo 5.1), le risonanze appaiono previste a valori di spostamento chimico leggermente più alte del reale. La minore sovrastima è stata ottenuta con il metodo TPSS0. Gli spettri simulati sono mostrati in *Figura 25*.

Tabella 5 Tabella riassuntiva dei chemical shifts calcolati con i quattro funzionali DFT.

Nuclei	¹ H Chemical shift vs TMS [ppm]				Gruppo funzionale
	PBEh-3c	TPSS0/def2-SVP	TPSSh/def2-TZVP	r ² SCAN-3c	
44-45- 46	1.46	1.38	1.55	1.65	Metile in α rispetto al C chirale
47-48-49	2.16	2.14	2.23	2.31	Metile in α rispetto al metilene n° 29
50	7.12	6.77	7.07	7.02	Protone metilenico
51*	11.34	11.86	12.24	11.53	Protone N-H di anello
52*	6.77	6.94	7.45	7.10	Protone N-H di anello
53-54-55	2.22	2.20	2.28	2.29	Metile su anello pirrolico
56	6.25	5.90	6.34	6.12	Protone metinico
57-58	3.12	3.04	3.26	3.27	CH ₂ in β rispetto a carbossile
59-60	2.57	2.50	2.74	2.78	CH ₂ in α rispetto a carbossile
61-62	3.04	2.93	3.18	3.20	CH ₂ in β rispetto a carbossile
63-64	2.64	2.58	2.87	2.91	CH ₂ in α rispetto a carbossile
65-66-67	2.33	2.31	2.45	2.54	Metile su anello pirrolico
68-69	2.49	2.42	2.57	2.61	CH ₂ su anello pirrolico
70-71-72	1.23	1.16	1.22	1.29	Metile in β rispetto ad anello pirrolico
73	6.54	6.24	6.70	6.50	Protone metinico
74-75-76	2.35	2.35	2.45	2.42	Metile su anello pirrolico
77*	6.60	6.87	7.42	7.02	Protone N-H di anello
78	7.88	7.58	7.76	7.68	Protone metinico
79*	6.64	6.53	6.78	6.66	Protone carbossilico
80*	6.78	6.62	6.94	6.89	Protone carbossilico
81	3.25	3.22	3.56	3.67	Protone su C chirale

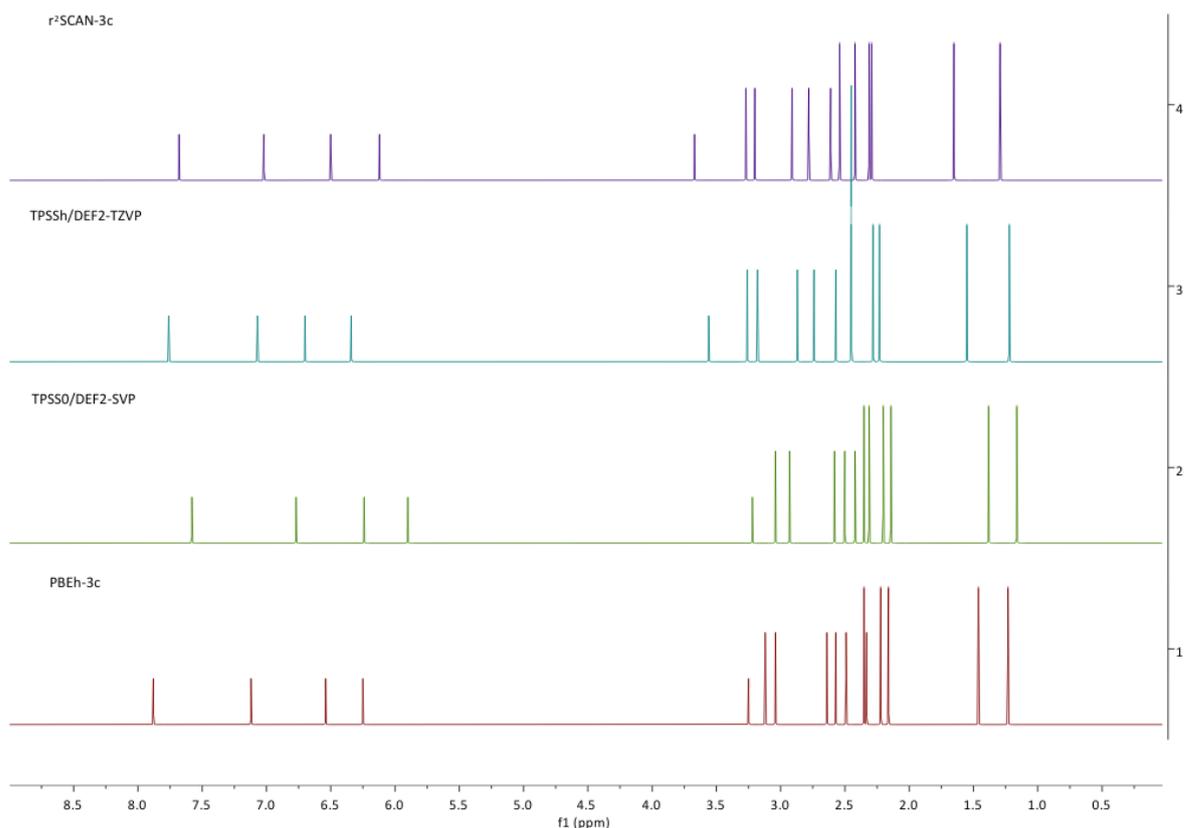


Figura 25 ^1H chemical shifts simulati secondo i diversi metodi DFT considerati.

5.4.2 Strutture elettroniche fondamentali di singoletto e tripletto

Analogamente ai calcoli GFN2-xTB precedentemente descritti, è stata indagata la struttura elettronica della molecola attraverso il calcolo delle energie degli orbitali di frontiera e del *gap* corrispondente. I valori sono riportati in *Tabella 6*. Sulla base delle evidenze spettroscopiche ed ammettendo che le transizioni a più bassa energia coinvolgano l'HOMO e il LUMO, il salto energetico tra questi due orbitali dovrebbe essere compreso tra 1.8 e 2.0 eV. Tra i metodi di calcolo descritti, il risultato meno aderente ai dati sperimentali è stato ottenuto con il metodo PBEh-3c, ovvero quello meno dispendioso da un punto di vista computazionale. Al contrario, un valore strettamente affine ai dati sperimentali è stato ottenuto con il metodo TPSSh combinato con il *basis set* def2-TZVP, con un gap HOMO-LUMO pari a 1.83 eV.

Tabella 6 Dati relativi agli orbitali di frontiera calcolati con vari metodi DFT.

Funzionale	HOMO [Eh]	LUMO [Eh]	H-L gap [eV]
PBEh-3c	-0.2105	-0.0746	3.70
R2SCAN-3c	-0.1671	-0.1124	1.49
TPSS0/def2-SVP	-0.1851	-0.0875	2.66
TPSSh/def2-TZVP	-0.1707	-0.1033	1.83

Per quanto i risultati ottenuti differiscano consistentemente da funzionale a funzionale, la qualità della previsione appare in relazione alla dimensione del *basis set*, visto che i funzionali accoppiati a *basis sets triple- ζ* (r²SCAN-3c e TPSSh) portano ai valori più vicini all'intervallo sperimentale. Gli orbitali HOMO e LUMO calcolati a livello TPSSh/def2-TZVP sono mostrati in *Figura 26*, la quale permette di osservare il notevole grado di delocalizzazione degli orbitali molecolari sulla struttura tetrapirrolica coniugata.

I calcoli svolti finora hanno considerato una configurazione elettronica di singoletto, in accordo con i dati sperimentali NMR, che non hanno manifestato fenomeni di *shift* o rilassamento riscontrabili in specie paramagnetiche. Per approfondire l'indagine computazionale su possibili stati eccitati sono state calcolate anche le possibili strutture elettroniche di tripletto, potenzialmente accessibili per *intersystem crossing*. La geometria delle strutture è stata ottimizzata nuovamente mantenendo il modello di solvatazione C-PCM e imponendo lo stato di tripletto. Sono stati calcolati i valori di RMSD rispetto alle geometrie di singoletto, riportati in *Tabella 7*. Non si osservano marcate differenze tra strutture aventi differente molteplicità, possibile conseguenza dell'elevato grado di delocalizzazione π e della localizzazione degli orbitali di frontiera nelle stesse regioni molecolari.

Tabella 7 Valori di RMSD tra geometrie di equilibrio in stato di singoletto e tripletto.

Funzionale	RMSD
PBEh-3C	0.45
r ² SCAN-3C	0.34
TPSS0/def2-SVP	0.41
TPSSh/def2-TZVP	0.30

La stabilità relativa rispetto agli stati di singoletto è stata ricavata sulla base della differenza energetica tra le strutture di equilibrio corrispondenti alle diverse molteplicità. I valori sono riportati in *Tabella 8*. Si può notare che i metodi accoppiati a *basis sets triple- ζ* , ovvero r^2 SCAN-3c e TPSSh, determinano delle strutture di tripletto meno stabili delle corrispondenti geometrie di singoletto, mentre gli altri due metodi prevedono una maggiore stabilità delle geometrie di tripletto, risultato in disaccordo con l'evidenza sperimentale. Lo stato di tripletto a livello r^2 SCAN-3c e TPSSh si trova comunque ad energia prossima allo stato di singoletto, essendo i *gap* energetici di poco superiori ad 1 eV. In *Figura 26* sono confrontate le energie degli orbitali HOMO e LUMO per la configurazione di singoletto con gli orbitali α -HOMO e α -HOMO-1 per la configurazione di tripletto, calcolate a livello TPSSh/def2-TZVP. La stabilizzazione degli orbitali in configurazione di tripletto è conseguenza della minore repulsione interelettronica e del contributo dato dall'energia di scambio. La superficie di densità di spin, mostrata in *Figura 27*, è coerente con gli orbitali singolarmente occupati riportati in *Figura 26* e conferma l'elevato grado di delocalizzazione elettronica della PCB in stato di tripletto.

Tabella 8 Energie delle configurazioni di singoletto e tripletto alle rispettive geometrie di equilibrio.

	$E_{\text{singoletto}}$ [Eh]	$E_{\text{tripletto}}$ [Eh]	ΔE [eV]
PBEh-3c	-1945.4818	-1945.6936	-5.76
r^2 SCAN-3c	-1949.5566	-1949.5114	1.23
TPSS0/def2-SVP	-1948.0855	-1948.2755	-5.17
TPSSh/def2-TZVP	-1950.7487	-1950.7014	1.29

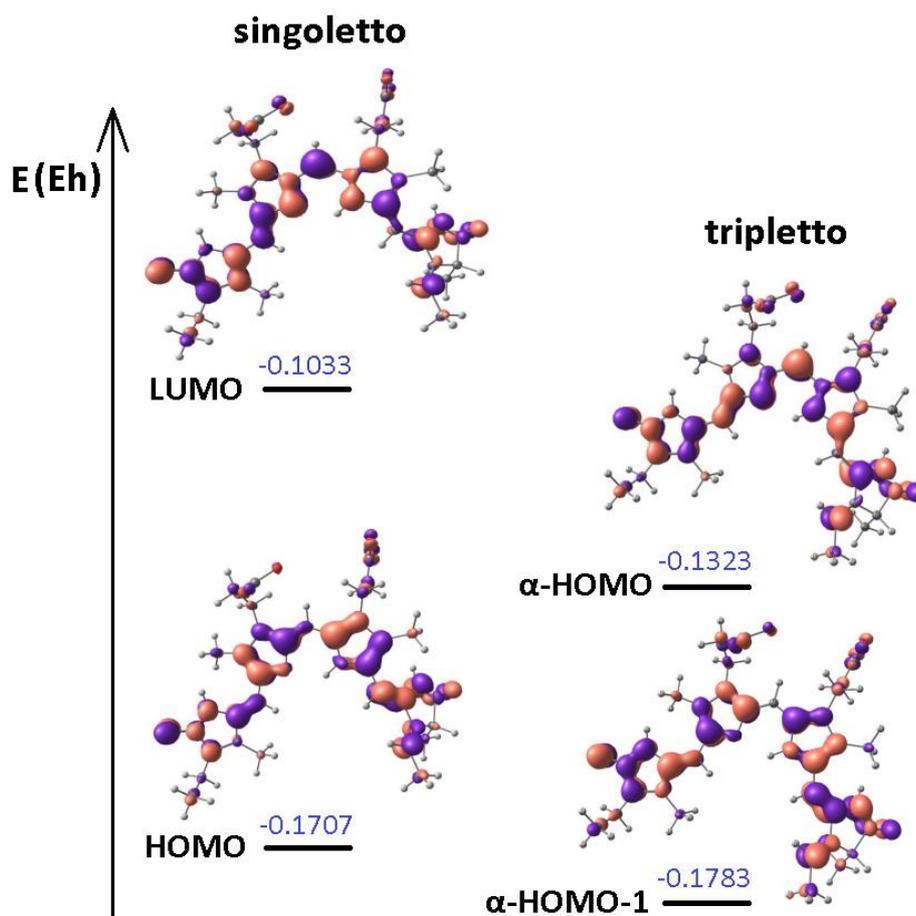


Figura 26 Orbitali molecolari di frontiera calcolati a livello TPSSH/def2-TZVP per le configurazioni di singoletto e di tripletto.
Isovalue = 0.03 a.u.

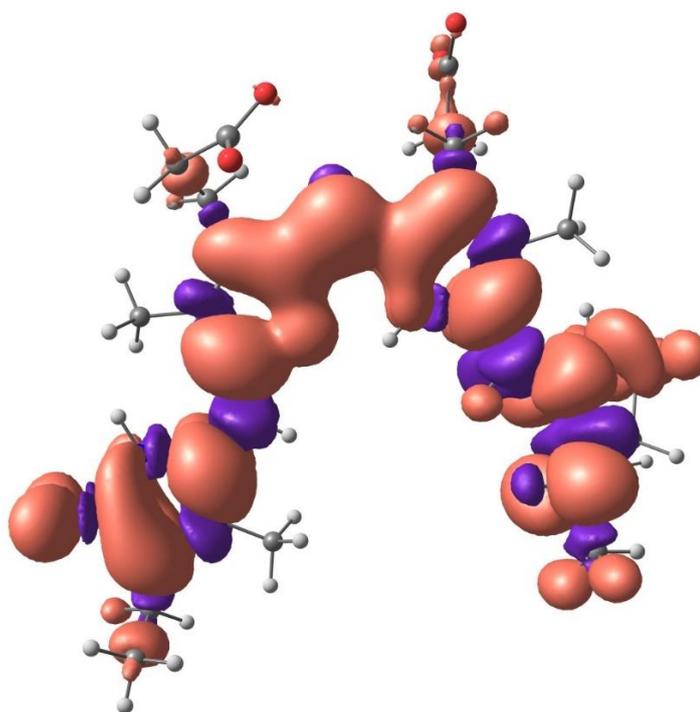


Figura 27 Superficie di densità di spin calcolata per la PCB in stato di tripletto. Isovalue = 0.0005 a.u.

5.4.3 Simulazioni TD-DFT

Attraverso la teoria TD-DFT sono state calcolate le energie relative degli stati eccitati di tripletto e singoletto della PCB. In particolare, sono state simulate le transizioni di assorbimento a partire dalla geometria ottimizzata per la configurazione di singoletto e le possibili emissioni da geometrie corrispondenti alla configurazione di tripletto. I calcoli sono stati svolti con i medesimi funzionali e *basis sets* impiegati per le ottimizzazioni geometriche, considerando 12 stati eccitati per ogni configurazione. Per quanto riguarda la simulazione degli assorbimenti, si può osservare in *Tabella 9* come il carattere della transizione $S_1 \leftarrow S_0$ sia prevalentemente LUMO \leftarrow HOMO, confermando le considerazioni precedenti sulla maggiore accuratezza dei metodi accoppiati a *basis sets triple- ζ* , ovvero r²SCAN-3c e TPSSh. I risultati ottenuti con questi metodi sono in buon accordo con il dato sperimentale.

Tabella 9 Dati calcolati relativi all'assorbimento $S_1 \leftarrow S_0$.

	PBEh-3c	r ² SCAN-3c	TPSS0/def2-SVP	TPSSh/def2-TZVP
Energia del fotone [eV]	2.65	2.18	2.40	2.21
Lunghezza d'onda [nm]	467	569	517	562
HOMO \leftarrow LUMO %	96.1	72.5	96.3	92.5

Le transizioni a maggiore energia hanno in generale carattere più complesso. Per esempio, si riportano in *Tabella 10* i dati relativi alla seconda transizione per intensità, dove è osservabile il significativo coinvolgimento di diversi orbitali molecolari occupati, del LUMO e del LUMO+1.

Tabella 10 Dati di assorbimento calcolati per la seconda transizione in termini di intensità

	PBEh-3c	r ² SCAN-3c	TPSS0/def2-SVP	TPSSh/def2-TZVP
Energia del fotone [eV]	4.08	2.55	3.91	2.71
Lunghezza d'onda [nm]	304	486	317	457
Carattere della transizione	H-6 -> L 45.0% H-3 -> L 19.2% H -> L+1 9.7% H-1 -> L 7.8% H-2 -> L 5.7%	H-5 -> L 60.1% H -> L+1 21.8% H -> L 6.9% H-3 -> L 6.0%	H -> L+2 42.1% H-9 -> L 18.3% H-10 -> L 8.3% H -> L+1 5.6% H-7 -> L 5.5%	H-5 -> L 50.8% H -> L+1 33.9% H-3 -> L 6.4%

In *Figura 28* sono riportati gli spettri di assorbimento simulati nella regione del visibile. Dato che il calcolo TD-DFT riporta stati eccitati discreti non affetti dalla struttura vibrazionale, è stata introdotta attraverso il software Multiwfn 3.8⁷⁹ una *broadening function* gaussiana, fissando il parametro di ampiezza a metà altezza (FWHM) a 0.300 eV. L'eventuale influenza dell'accoppiamento spin-orbita (SOC) sulle transizioni è stata inoltre verificata computazionalmente, ma come osservabile in *Figura 29* (calcolo a livello TPSSh/def2-TZVP) gli spettri con e senza correzione SOC sono perfettamente sovrapponibili. L'assenza di atomi pesanti nella PCB rende trascurabile il mescolamento di stati eccitati di singoletto e tripletto.

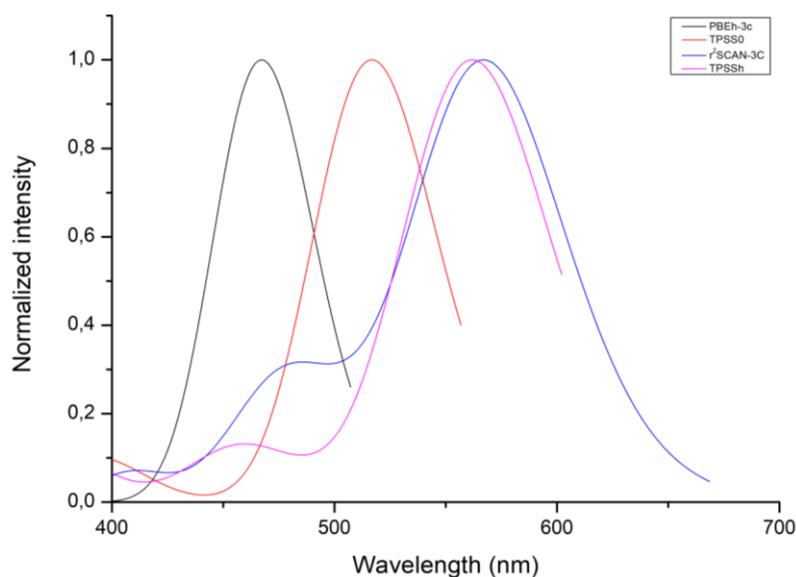


Figura 28 Spettri di assorbimento ottenuti dai calcoli TD-DFT.

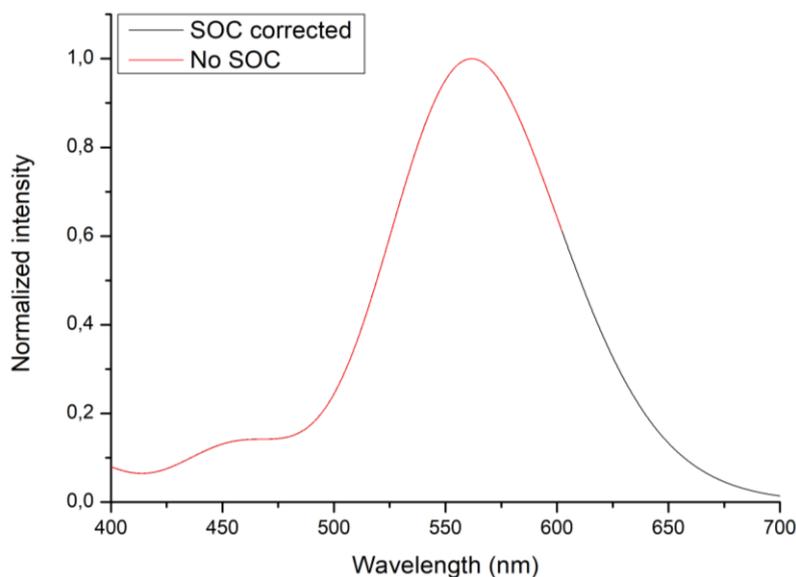


Figura 29 Spettri di assorbimenti calcolati con e senza SOC a livello TPSSh/def2-TZVP.

Per rappresentare nello spazio le conseguenze elettroniche della transizione di singoletto è stata calcolata la *Charge Density Difference* (CDD), un approccio introdotto da Tian Lu⁸⁰ che rende conto della variazione di distribuzione elettronica a seguito di una transizione. Considerando la formazione di una “buca” elettronica conseguente alla transizione dell’elettrone coinvolto nella transizione e la circolazione dell’elettrone in stato eccitato, la differenza tra queste quantità porta a mappare le zone molecolari con aumento e diminuzione della densità elettronica a causa della transizione. Si riporta in *Figura 30* la CDD a partire da dati provenienti dal calcolo TPSSh/def2-TZVP. Come si può osservare, la transizione elettronica genera un effettivo spostamento della densità elettronica lungo la molecola, coinvolgendo in particolare i due frammenti pirrolonici terminali. L’eterociclo caratterizzato dal doppio legame esociclico viene impoverito elettronicamente, mentre l’altro pirrolone risulta maggiormente elettrone-ricco a causa della transizione. La CDD della molecola è in perfetto accordo con la localizzazione degli orbitali di frontiera mostrati in *Figura 26*.

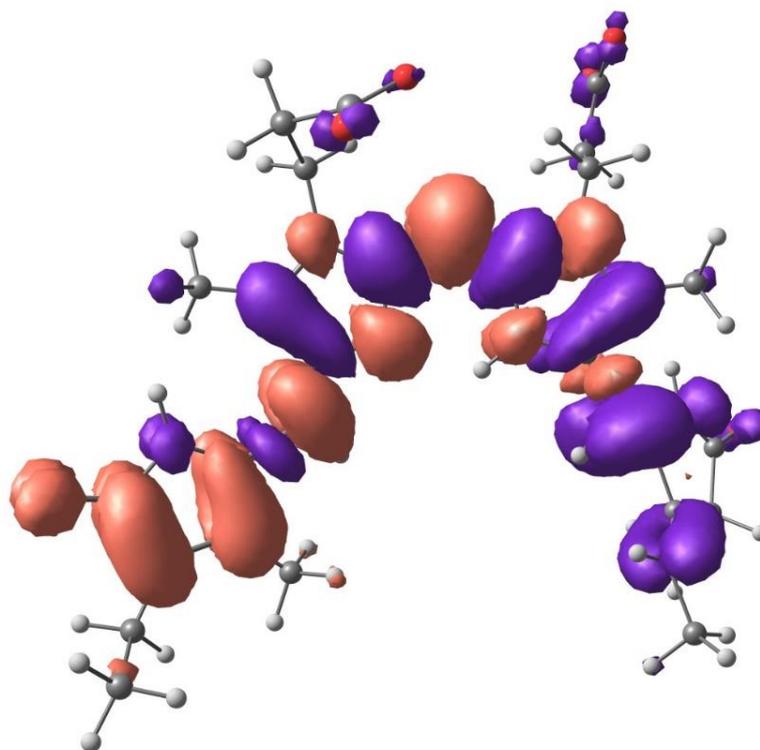


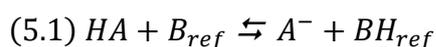
Figura 30 CDD della ficocianobilina calcolata a livello TPSSh/def2-TZVP con regioni di aumento e diminuzione di densità elettronica rappresentate rispettivamente in arancione e viola. Isovalue 0.0005 a.u.

L’emissione fosforescente dallo stato di tripletto è stata simulata effettuando un calcolo single-point TD-DFT a partire dalla geometria di equilibrio dello stato di tripletto. Nel calcolo sono state incluse le transizioni con cambio di molteplicità ed è stata presa in considerazione solo la

transizione S←T verso il primo stato eccitato, la cui energia rappresenta l'energia del fotone emesso a seguito del decadimento radiativo dell'ipotetico stato di tripletto. Trascurando i dati relativi al metodo PBEh-3c, non coerenti con le evidenze sperimentali data l'eccessiva stabilizzazione dello stato di tripletto, i restanti funzionali hanno portato ad un valore di energia del fotone intorno a 0.91 eV, corrispondente ad un'emissione nel vicino infrarosso intorno a 1360 nm. Il risultato lascia presagire che la molecola, se soggetta a *intersystem crossing*, non dia emissione fosforescente a causa dell'*energy gap law*.

5.5 Stima dei valori di pK_a

La stima dei valori di pK_a è stata svolta secondo il metodo isodesmico⁸¹, che considera una reazione acido-base tra la specie chimica oggetto di studio ed un riferimento strutturalmente simile:



$$(5.2) pK_a = pK_{a,ref} + \frac{\Delta G_{DFT}}{2.303RT}$$

Il confronto di due strutture simili ottenute a livello DFT permette in astratto di ridurre gli errori sistematici introdotti dai metodi. I gruppi acidi della PCB sono carbossilici, pertanto il riferimento utilizzato è stato l'acido acetico. Sono state ottimizzate agli stessi livelli le strutture nei vari stati di protonazione e l'acido acetico in forma neutra e deprotonata.

Per stabilire quale isomero corrispondesse ad un determinato stato di protonazione è stata inizialmente modellata la PCB in forma neutra. A partire da questa struttura sono stati considerati i possibili anioni derivanti dalla deprotonazione. Una volta trovato l'anione più stabile, quest'ultimo è stato impiegato come punto di partenza per definire la specie dianionica a minore energia. Lo stesso approccio è stato applicato per la determinazione del trianione più stabile (*Figure 32-34*). I calcoli sono stati effettuati sia a livello GFN2-xTB che con i metodi DFT PBEh-3c e TPSS0/def2-SVP. La nomenclatura impiegata è rappresentata per chiarezza in *Figura 31*, dove sono anche evidenziate le specie più stabili.

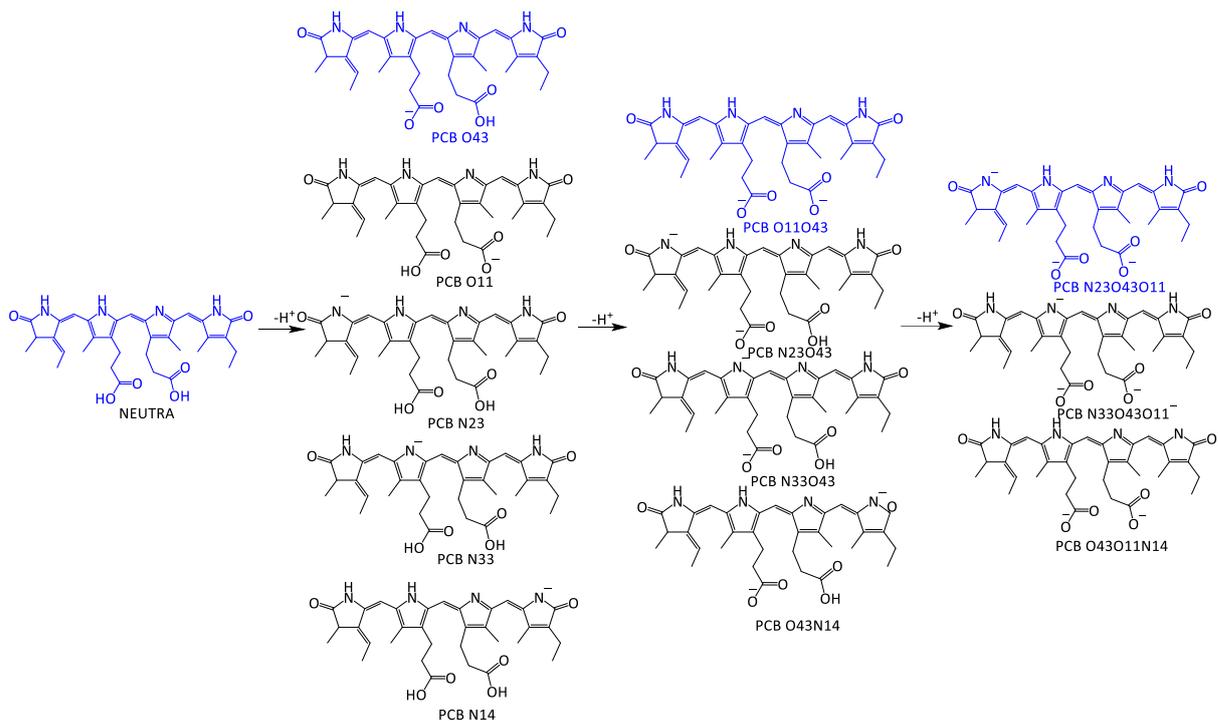


Figura 31 Isomeri degli anioni indagati e relativa nomenclatura.

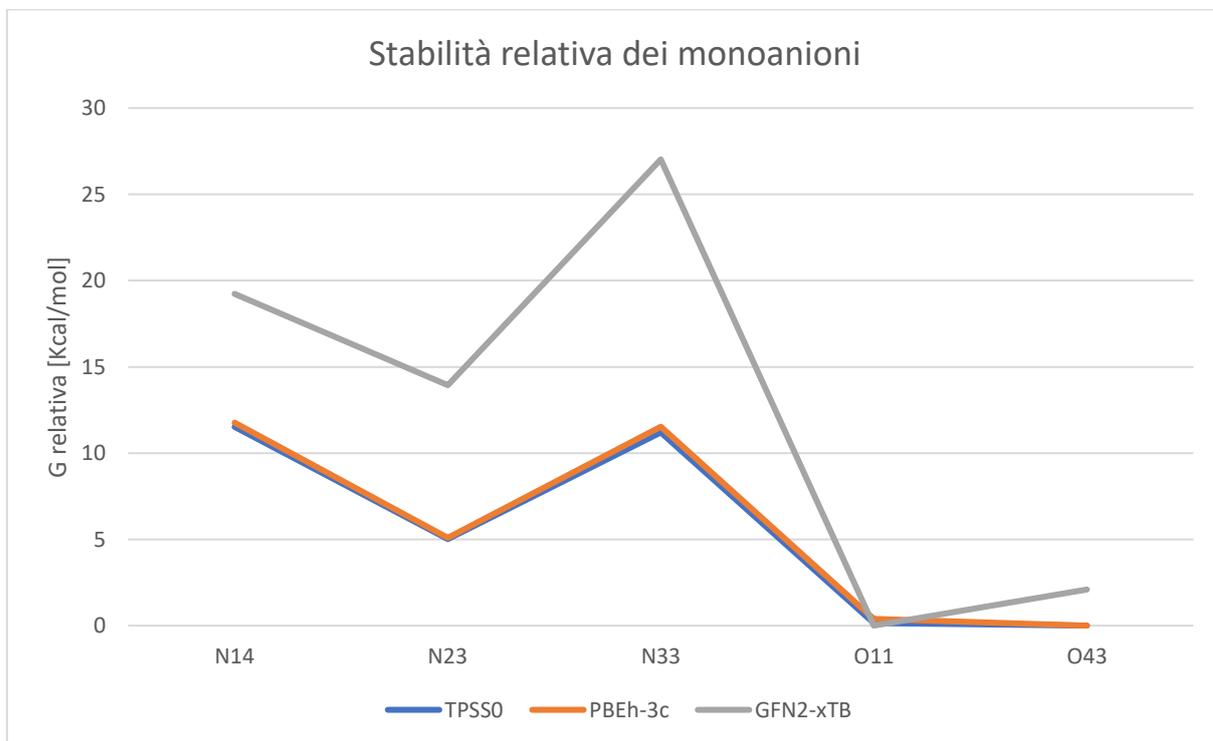


Figura 32 Andamento dell'energia libera di Gibbs relativa alla specie monoanionica più stabile.

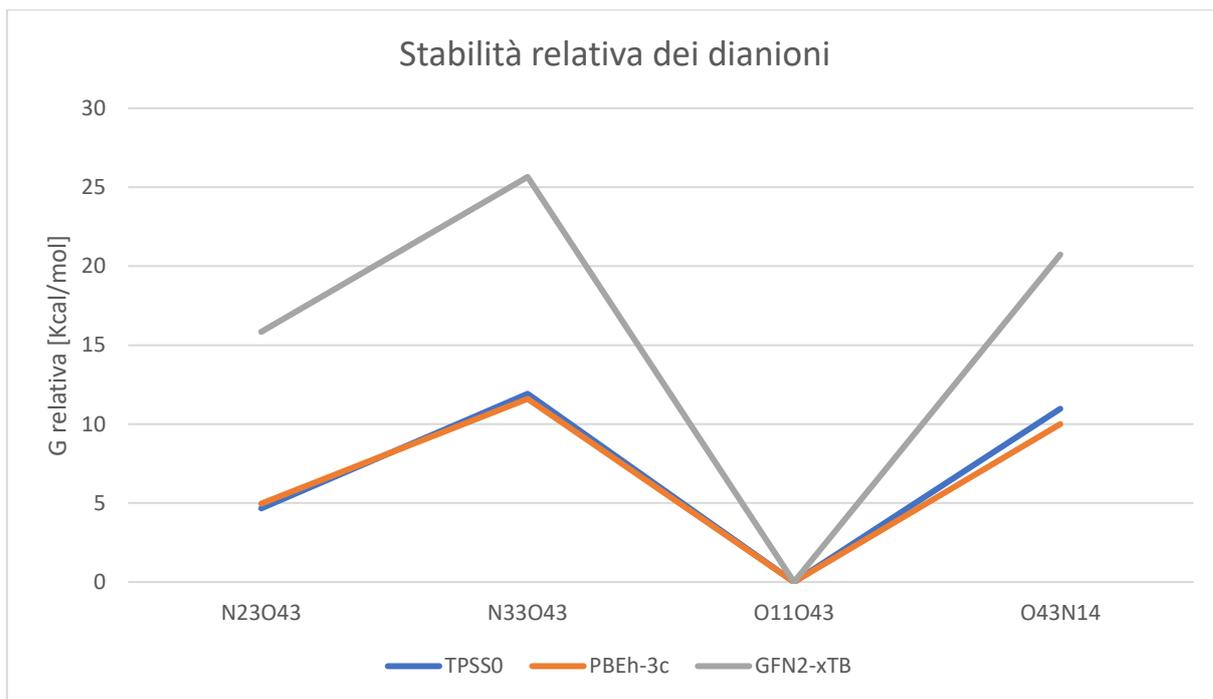


Figura 33 Andamento dell'energia libera di Gibbs relativa alla specie dianionica più stabile.

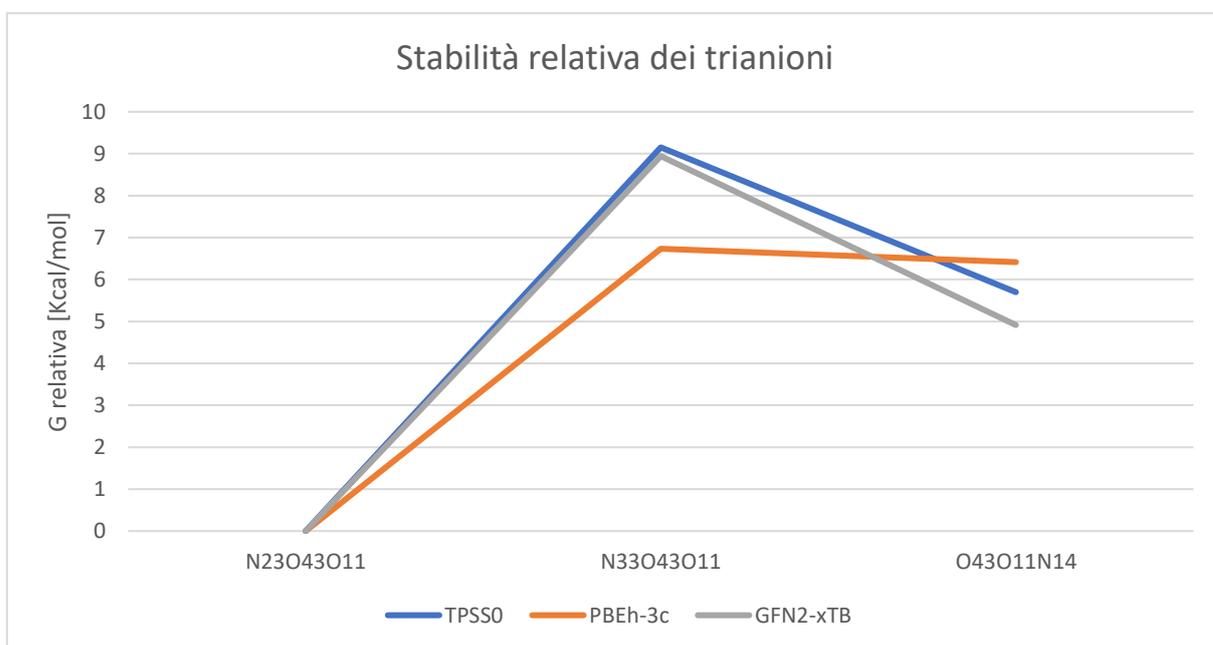


Figura 34 Andamento dell'energia libera di Gibbs relativa alla specie trianionica più stabile.

Dalle Figure 32 e 33 si osserva come i protoni posti sui gruppi carbossilici risultino significativamente più acidi dei protoni posti sugli atomi di azoto, aspetto coerente con la natura dei gruppi funzionali. Dai dati riportati in Figura 34 emerge anche una differenza di acidità piuttosto contenuta tra i protoni legati agli atomi di azoto 14 e 23, presumibilmente

dovuta alle analogie strutturali dell'intorno chimico poiché entrambi gli atomi di azoto appartengono ad eterocicli pirrolonici, mentre l'atomo di azoto 33 appartiene ad un anello che non possiede gruppi elettron-attrattori vicini.

Si riportano in *Tabella 11* i valori di pK_a calcolati per la PCB, che giustificano l'assunzione iniziale di considerare i gruppi carbossilici deprotonati a pH fisiologico. Tutti i metodi di calcolo confermano l'accessibilità in soluzione acquosa dei quattro stati di protonazione considerati per la PCB. Sfortunatamente, le esigue quantità di prodotto isolato non hanno permesso il confronto sperimentale dei dati attraverso titolazione.

Tabella 11 Valori di pK_a calcolati attraverso metodo isodesmico.

	TPSS0/def2-SVP	PBEh-3c	TPSSh/def2-TZVP	r ² SCAN-3c
pK_{a1}	3.82	3.91	3.14	1.75
pK_{a2}	5.06	4.43	4.13	4.48
pK_{a3}	9.27	8.74	10.51	9.95

5.6 Relaxed Surface Scan e studio del conformero elicoidale

Tutte le considerazioni finora effettuate sono limitate alla geometria molecolare aperta tipica del cromoforo nel complesso proteico e alle proprietà ad essa legate, ma durante lo studio computazionale sono state quantificate anche le barriere rotazionali degli anelli pirrolici esterni seguendo l'approccio *relaxed surface scan*, ovvero imponendo una serie di valori fissi per una coordinata interna e lasciando le altre coordinate libere durante l'ottimizzazione geometrica. Nello specifico sono stati considerati i due angoli diedri mostrati nelle *Figure 35* e *36*, partendo dalla PCB in forma dianionica e impiegando il metodo r²SCAN-3c, che ha rappresentato un buon compromesso tra prestazioni e velocità di calcolo. Le barriere rotazionali sono risultate relativamente contenute e del tutto confrontabili con la barriera rotazionale del butadiene calcolata allo stesso livello. Le strutture finali sono inoltre energeticamente più stabili. Si dimostra così la libertà conformazionale della PCB, aspetto confermato dalla letteratura^{39,82}. La geometria d'equilibrio della forma elicoidale è mostrata in *Figura 37*.

Escluse le barriere rotazionali, tutti i calcoli relativi alle proprietà di questa forma sono stati svolti con il metodo TPSSh/def2-TZVP.

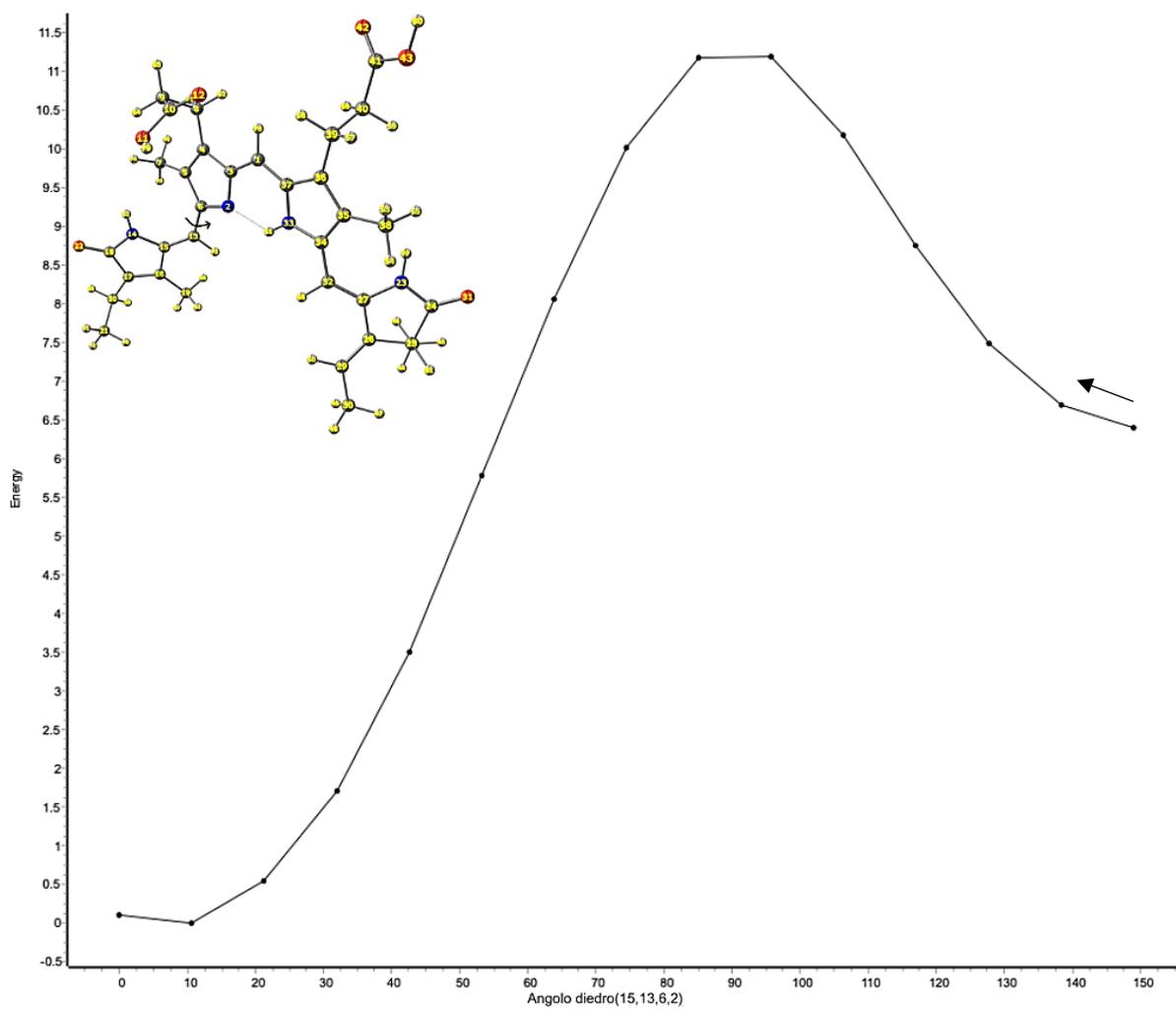


Figura 35 Barriera rotazionale dell'angolo diedro formato dagli atomi 15, 13, 6 e 2.

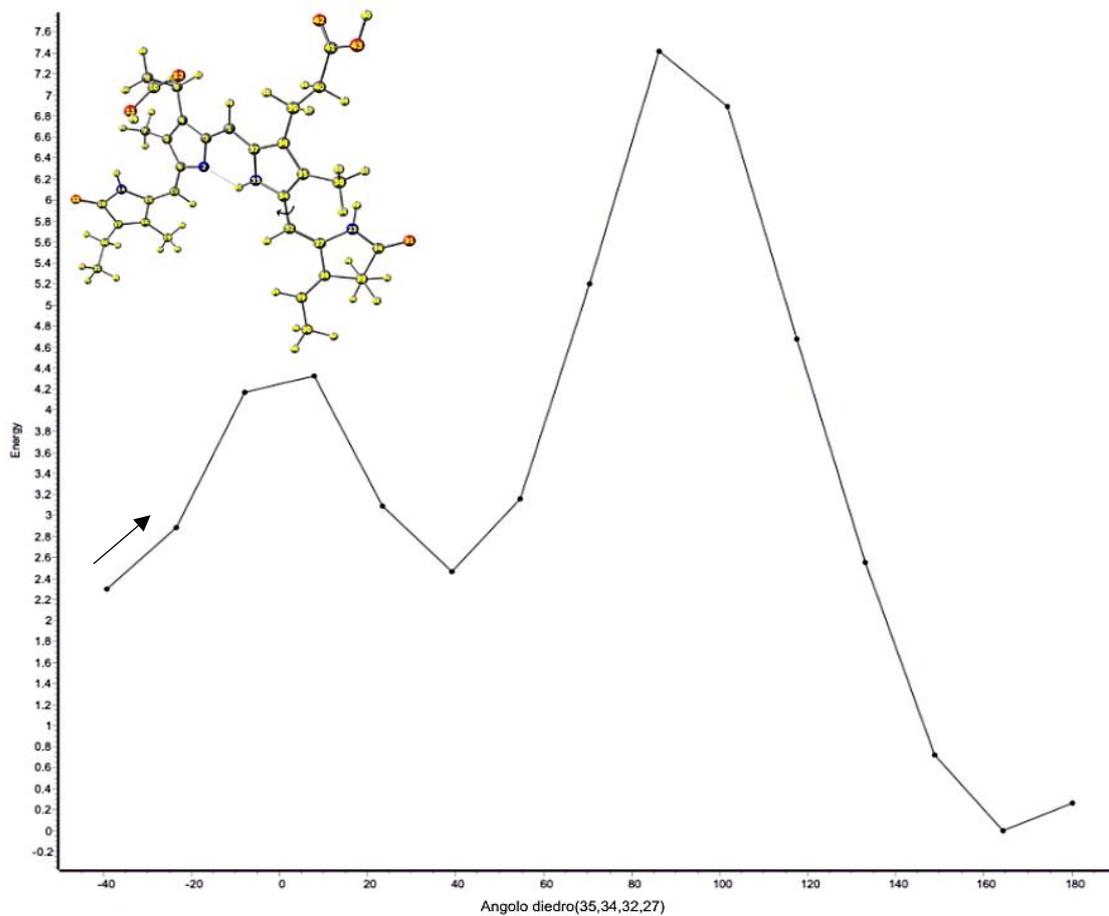


Figura 36 Barriera rotazionale dell'angolo diedro formato dagli atomi 35, 34, 32 e 27.

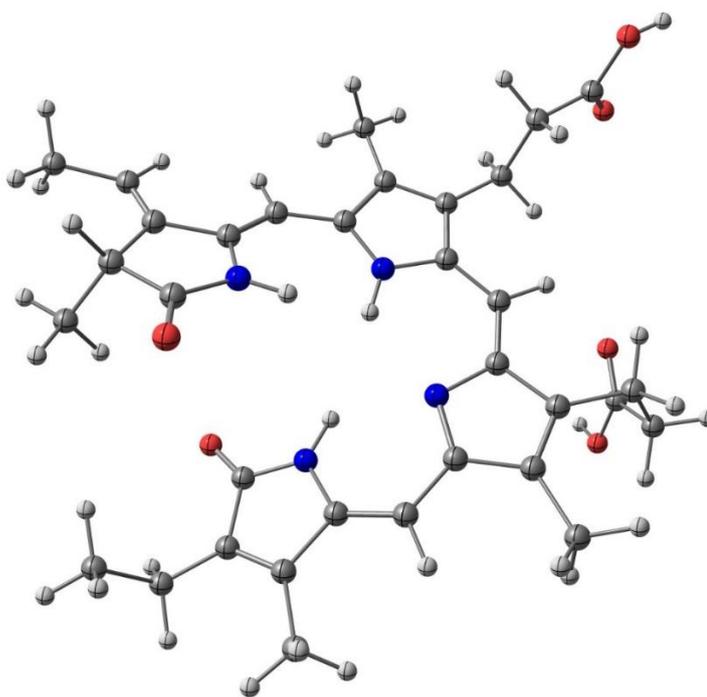


Figura 37 Conformero elicoidale della PCB ottimizzato a livello TPSSh/def2-TZVP

Unitamente alla libertà conformazionale è stata calcolata la stabilità relativa della forma elicoidale rispetto alla forma aperta studiata nei paragrafi precedenti. A tal fine, in *Tabella 12* è stata calcolato il ΔG relativo al cambio di conformazione confrontando le energie libere delle due strutture ottimizzate geometricamente.

Tabella 12 Dati termodinamici a 298.5K relativi ai due conformeri.

Carica	PCB elicoidale	PCB aperta	ΔG (Kcal/mol)	$\log(K_{eq})$
0	-1951.1245	-1951.1103	-8.9	6.52
-1	-1950.6632	-1950.6530	-6.4	4.69
-2	-1950.2042	-1950.1935	-6.7	4.91
-3	-1949.7386	-1949.7201	-11.6	8.50

I risultati suggeriscono la predominanza della forma elicoidale in soluzione, che è caratterizzata da un gap HOMO-LUMO di 1.70 eV, grossolanamente confrontabile con il valore ottenuto per la forma aperta allo stesso livello di calcolo, 1.83 eV. I valori di pK_{a1} e pK_{a2} calcolati per la forma elicoidale si mantengono nel range tra 3 e 5 unità, similmente a quelli ottenuti per la forma aperta. Un aspetto interessante riguarda il valore di pK_{a3} , pari a 6.92, sensibilmente inferiore rispetto a quello calcolato per la forma aperta allo stesso livello teorico, 10.51, che suggerirebbe l'esistenza a pH fisiologico di una non trascurabile frazione di PCB trianionica.

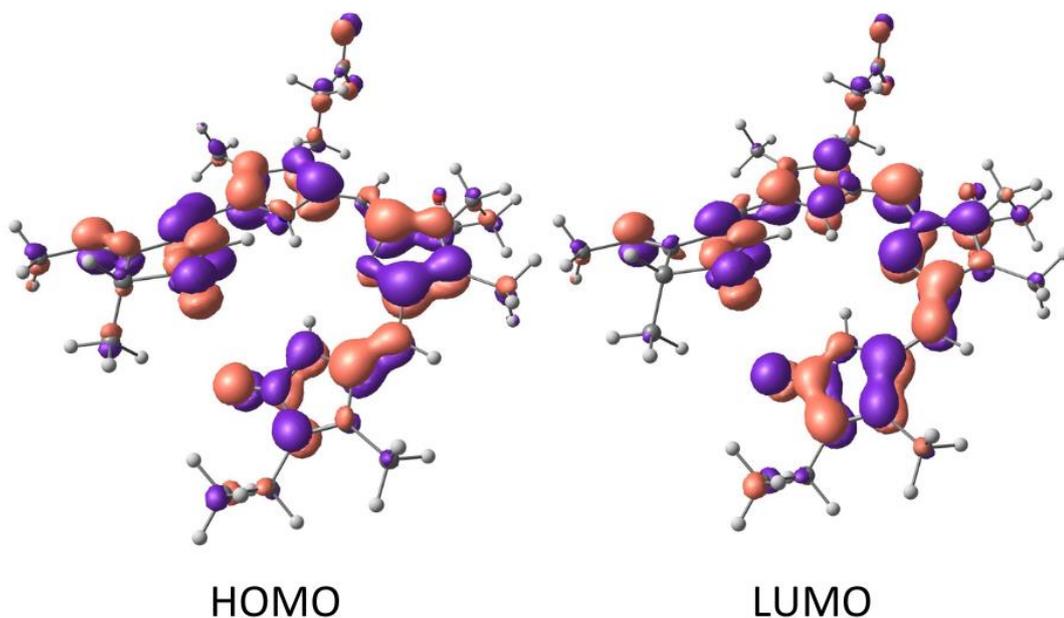


Figura 38 HOMO e LUMO della PCB elicoidale. Isovalue 0.03 a.u.

Dato che il gap HOMO-LUMO è comunque leggermente inferiore rispetto alla forma aperta studiata precedentemente, la transizione al primo stato eccitato di singoletto vede un incremento della lunghezza d'onda associata pari a 48 nm (*Tabella 13*), suggerendo che la presenza di diverse *shoulders* nello spettro sperimentale di assorbimento nella regione del rosso possa essere imputata non solo alla struttura vibrazionale, ma anche alla presenza di più conformeri in soluzione. La lunghezza d'onda calcolata per la seconda transizione più intensa si sposta nel vicino UV, cadendo a 381 nm contro i 457 nm della forma aperta e avvicinandosi al valore della banda sperimentale centrata a 364 nm (*Tabella 14*). I calcoli relativi ad un eventuale stato di tripletto (RMSD rispetto alla geometria di singoletto pari a 0.190 Å) confermano che una emissione fosforescente da questo stato avverrebbe nel vicino infrarosso (*Tabella 15*). La densità di spin, rappresentata in *Figura 39*, non si discosta da quella della forma aperta e coinvolge tutto il sistema π -coniugato della struttura polieterociclica.

Tabella 13 Dati calcolati relativi all'assorbimento $S_1 \leftarrow S_0$ e confronto tra i due conformeri oggetto di studio.

	Chiusa	Aperta
Energia del fotone [eV]	2.03	2.21
Lunghezza d'onda [nm]	610	562
HOMO \leftarrow LUMO %	95.0	92.5

Tabella 14 Dati di assorbimento calcolati per la seconda transizione in termini di intensità.

	Elicoidale	Aperta
Energia del fotone [eV]	3.25	2.71
Lunghezza d'onda [nm]	381	457
Carattere della transizione	H-11 \rightarrow L 37.5% H-13 \rightarrow L 20.2% H \rightarrow L+1 8.1% H-10 \rightarrow L 7.1% H-1 \rightarrow L 6.8%	H-5 \rightarrow L 50.8% H \rightarrow L+1 33.9% H-3 \rightarrow L 6.4%

Tabella 15 Dati di emissione dallo stato fondamentale di tripletto.

	Aperta	Chiusa
Energia del fotone [eV]	0.82	0.91
Lunghezza d'onda [nm]	1512	1362

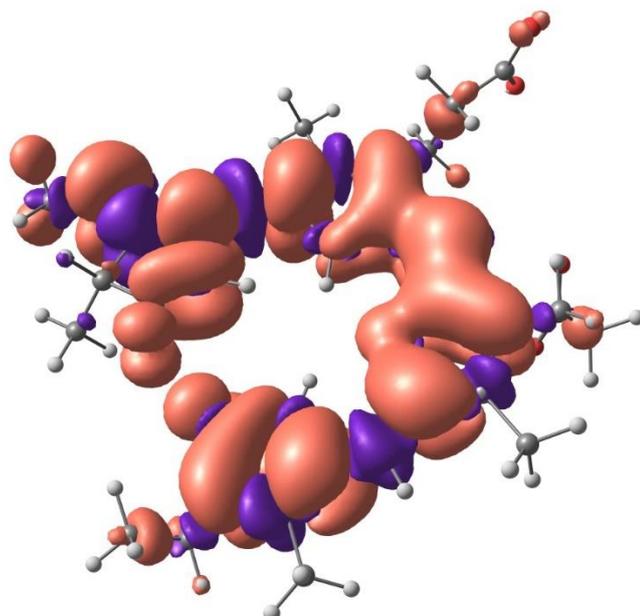


Figura 39 Isosuperficie della spin density della PCB in forma elicoidale in stato di tripletto. Isovalue: 0.0005 a.u.

Le due forme di PCB considerata presentano, come attendibile, spettri simulati IR ed NMR piuttosto simili. Gli spettri simulati sono confrontati nelle *Figure 40 e 41*, mentre dati relativi a numeri d'onda e *chemical shifts* sono riassunti nelle *Tabelle 16 e 17*. Le simulazioni computazionali suggeriscono che le forme di PCB considerate non siano facilmente distinguibili sperimentalmente attraverso spettroscopia IR o spettroscopia NMR monodimensionale.

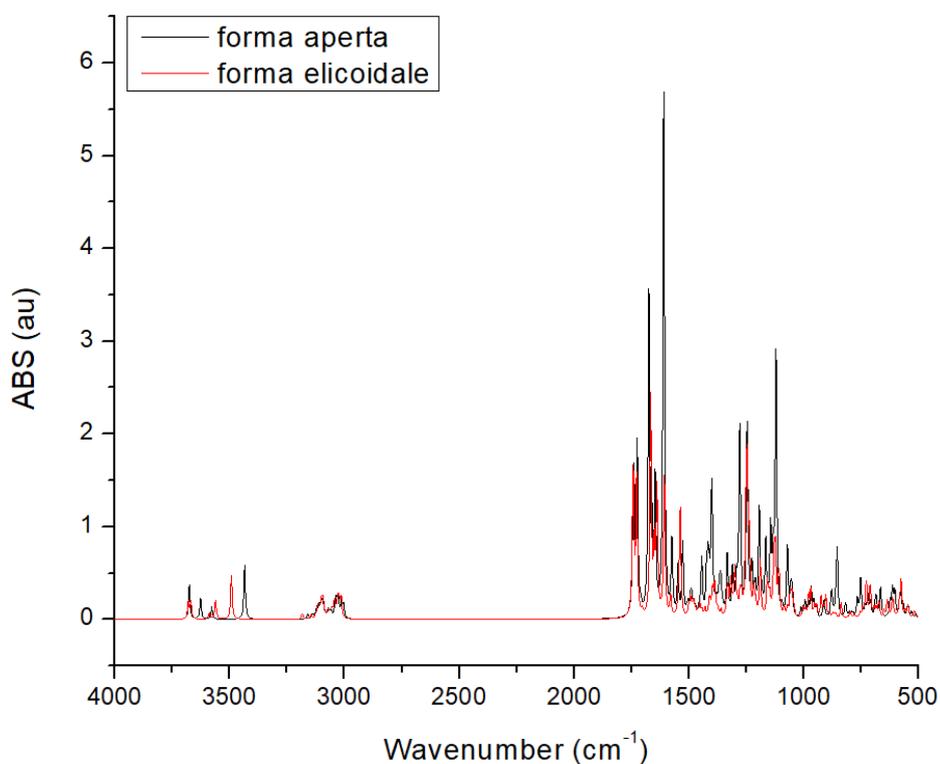


Figura 40 Confronto tra spettri IR simulati dei conformeri aperto ed elicoidale della PCB.

Tabella 16 Principali modi vibrazionali considerati.

Conformero	ν_{C-H} C₁	ν_{C-H} C₁₃	ν_{C-H} C₃₂	ν_{C-H} C₂₉	$\nu_{C=O}$ C₂₄	$\nu_{C=O}$ C₁₈
Elicoidale	3185	3181	3184	3144	1725	1662
Aperto	3178	3159	3158	3139	1723	1668

Tabella 17 Confronto tra i valori di chemical shift dei due conformeri.

Nuclei	Chemical shift vs TMS [ppm]		
	forma elicoidale	forma aperta	Gruppo funzionale
44-45- 46	1.39	1.55	Metile in α rispetto al C chirale
47-48-49	2.11	2.23	Metile in α rispetto al metilene n° 29
50	7.07	7.07	Protone metilenico
51*	11.18	12.24	Protone N-H di anello
52*	9.08	7.45	Protone N-H di anello
53-54-55	2.19	2.28	Metile su anello pirrolico
56	6.39	6.34	Protone metinico
57-58	2.99	3.26	CH ₂ in β rispetto a carbossile
59-60	2.72	2.74	CH ₂ in α rispetto a carbossile
61-62	3.10	3.18	CH ₂ in β rispetto a carbossile
63-64	2.73	2.87	CH ₂ in α rispetto a carbossile
65-66-67	2.24	2.45	Metile su anello pirrolico
68-69	2.39	2.57	CH ₂ su anello pirrolico
70-71-72	1.03	1.22	Metile in β rispetto ad anello pirrolico
73	6.55	6.70	Protone metinico
74-75-76	2.23	2.45	Metile su anello pirrolico
77*	7.66	7.42	Protone N-H di anello
78	7.25	7.76	Protone metinico
79*	6.75	6.78	Protone carbossilico
80*	6.98	6.94	Protone carbossilico
81	3.36	3.56	Protone su C chirale

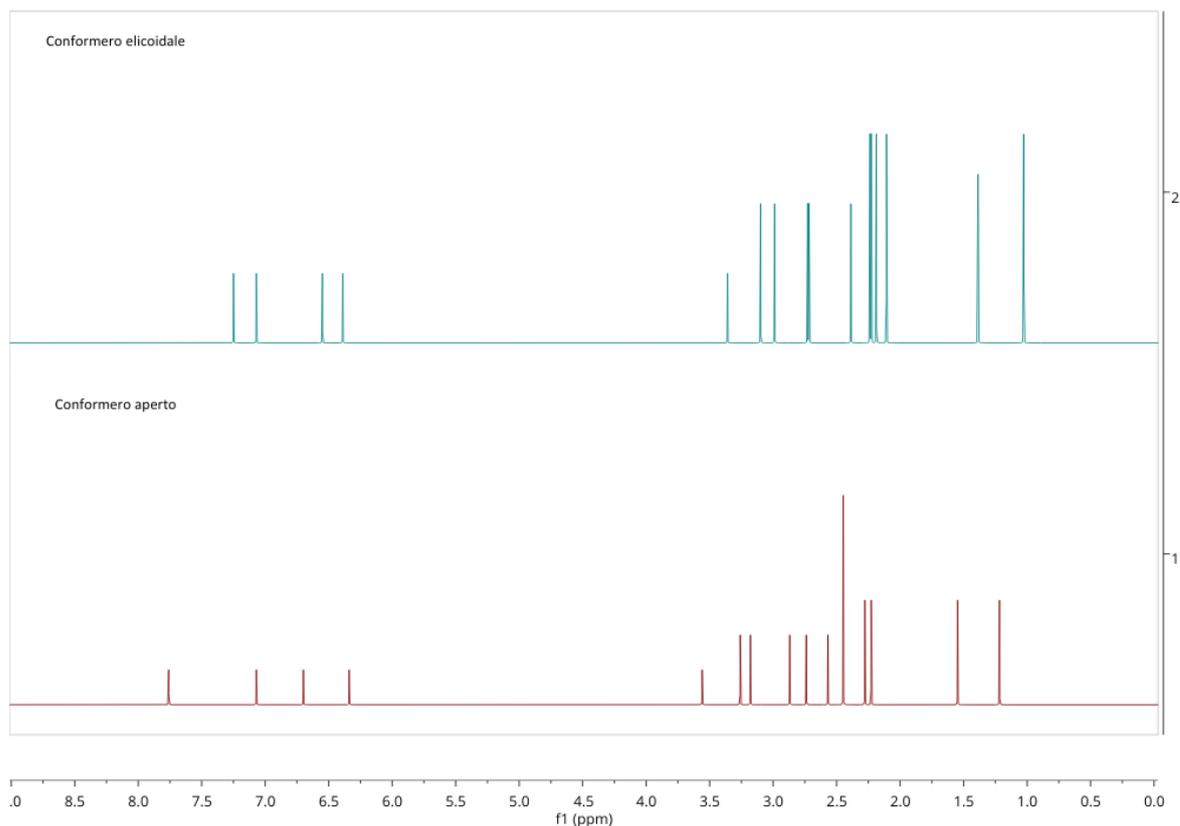


Figura 41 Simulazione dei chemical shift protonici dei due conformeri.

5.7 Complessi metallici della PCB

Come descritto nella parte sperimentale, a soluzioni di PCB in metanolo sono stati aggiunti $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o $[\text{Y}(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ in rapporto stechiometrico 1:1 e 1:2. Nel caso dell'aggiunta del precursore di Zn(II) si è osservato un immediato cambio di colore della soluzione, da blu a turchese, dovuto almeno in parte ad uno spostamento a lunghezze d'onda maggiori della transizione a minore energia, che si mostra composta da un insieme di bande centrate a 773, 683, 625 e 581 nm. L'aggiunta di un secondo equivalente di $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ non ha portato a significative modifiche dello spettro (Figura 42).

Diversamente da quanto attendibile considerando le significative variazioni nello spettro di assorbimento, lo spettro di emissione della PCB dopo l'aggiunta di $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ non presenta notevoli variazioni nella forma rispetto alla molecola libera, essendo composto da due bande centrate a 694 e 637 nm (Figura 43) indipendentemente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Non sono evidenti variazioni significative nemmeno negli spettri di PLE, che sono

risultati indipendenti dalla lunghezza d'onda di emissione (*Figura 43*). Sia gli spettri PL che PLE sono però risultati decisamente più intensi dopo aggiunta del precursore di Zn(II). Il risultato, verificato in ripetizioni successive delle misure, ha implicato un deciso incremento di resa quantica, da 0.4% a 2.4%. Una possibile spiegazione è che il catione metallico compete con i protoni acidi della molecola, riducendo la probabilità di decadimento non radiativo grazie alla rimozione di oscillatori ad alta energia nella molecola.

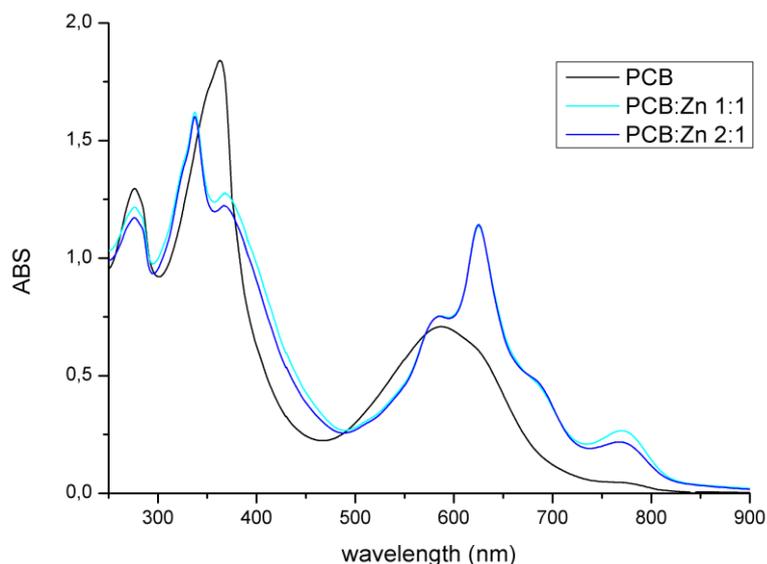


Figura 42 Spettri di assorbimento della PCB in metanolo a temperatura ambiente prima e dopo l'aggiunta di $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

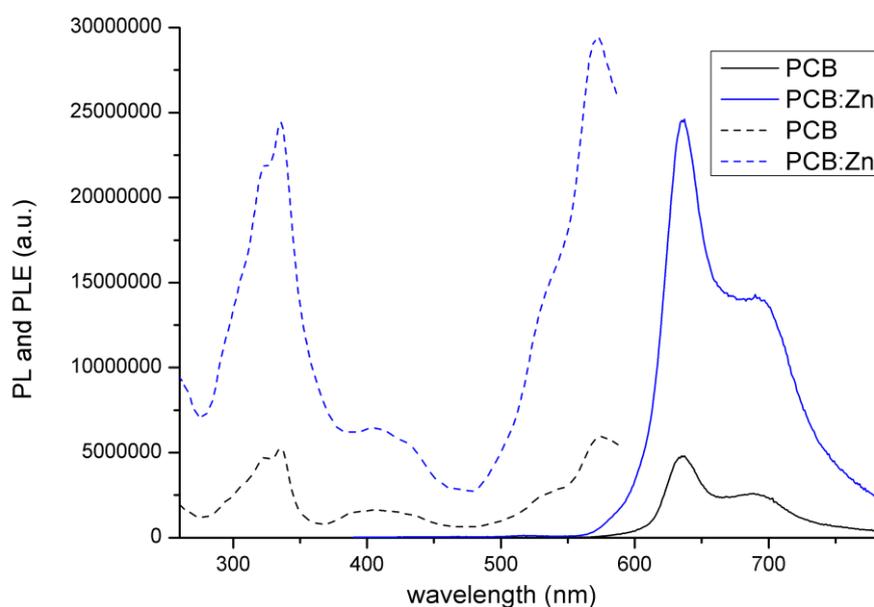


Figura 43 Spettri PL (linea continua, $\lambda_{eccitazione} = 336 \text{ nm}$) e PLE (linea tratteggiata, $\lambda_{emissione} = 636 \text{ nm}$) della PCB in metanolo a temperatura ambiente prima e dopo l'aggiunta di $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

L'impiego di $[Y(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ come altro precursore metallico ha portato a risultati diversi in termini di spettri di assorbimento, che presenta un allargamento delle bande relative alle transizioni a più bassa energia, amplificato dall'aggiunta di un secondo equivalente di Y(III). I due massimi principali sono centrati a 623 e 576 nm (*Figura 44*). Gli spettri PL e PLE, anche in questo caso indipendenti da lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione, sono risultati al contrario molto simili a quelli della molecola libera sia in termini di forma che di intensità (*Figura 44*), tanto che il valore di resa quantica calcolato in presenza di $[Y(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ è risultato pari a 0.4%, esattamente come per la PCB libera.

Dato che lo spettro di assorbimento evidenzia una effettiva interazione tra PCB e Yb(III), la differenza di comportamento rispetto all'introduzione di Zn(II) in soluzione potrebbe essere razionalizzato considerando il fortuito bilanciamento di due opposti effetti, ovvero la competizione tra centro metallico e protoni acidi per i siti basici della PCB, con riduzione del decadimento non radiativo, e l'*intersystem crossing* causato da un catione della serie dei lantanidi, che potrebbe portare ad uno spegnimento della luminescenza sia per via della bassa energia relativa dello stato di tripletto calcolata per la PCB, sia per l'energia della transizione $^2F_{5/2} \leftarrow ^2F_{7/2}$ del centro metallico, intorno a 9800 cm^{-1} .⁸³ In ogni caso, le misure sperimentali sui campioni in soluzione non hanno mostrato alcuna luminescenza proveniente dal centro metallico.

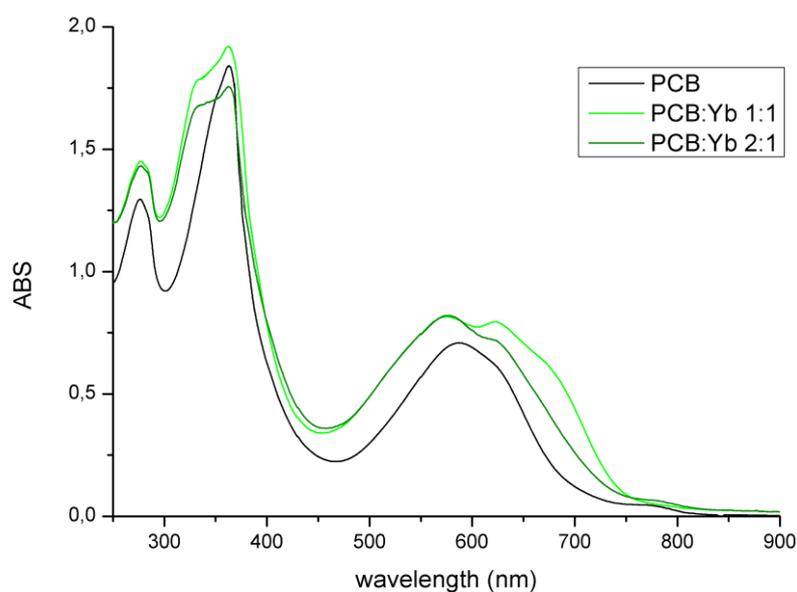


Figura 44 Spettri di assorbimento della PCB in metanolo a temperatura ambiente prima e dopo l'aggiunta di $[Y(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$.

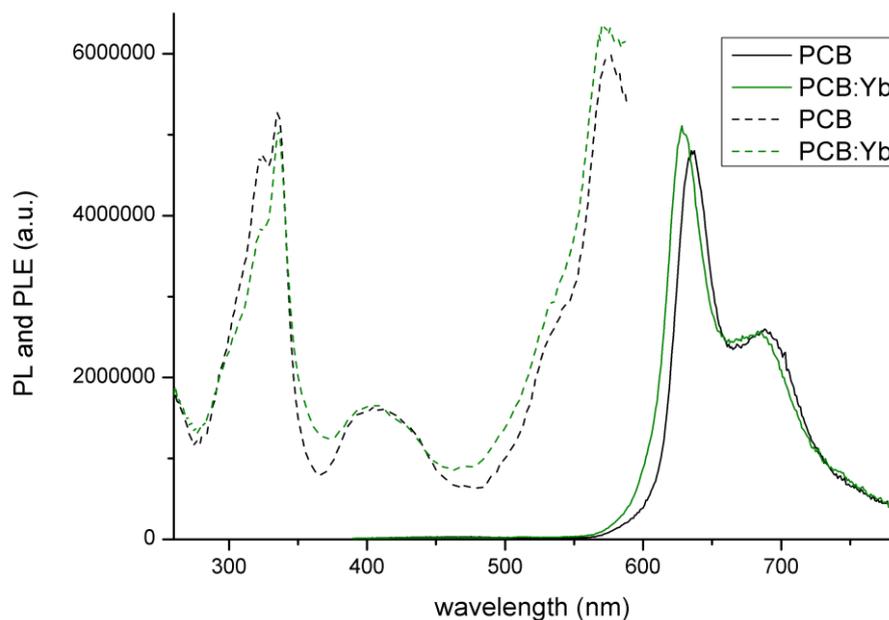


Figura 45 Spettri PL (linea continua, $\lambda_{eccitazione} = 336 \text{ nm}$) e PLE (linea tratteggiata, $\lambda_{emissione} = 636 \text{ nm}$) della PCB in metanolo a temperatura ambiente prima e dopo l'aggiunta di $[Y(\kappa^2\text{-NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3]$.

L'emissione della PCB rimane una fluorescenza organica anche in presenza dei cationi metallici, come indicato da tempi di vita compresi tra 6 e 7 ns. Le curve di decadimento sono riportate in Figura 46.

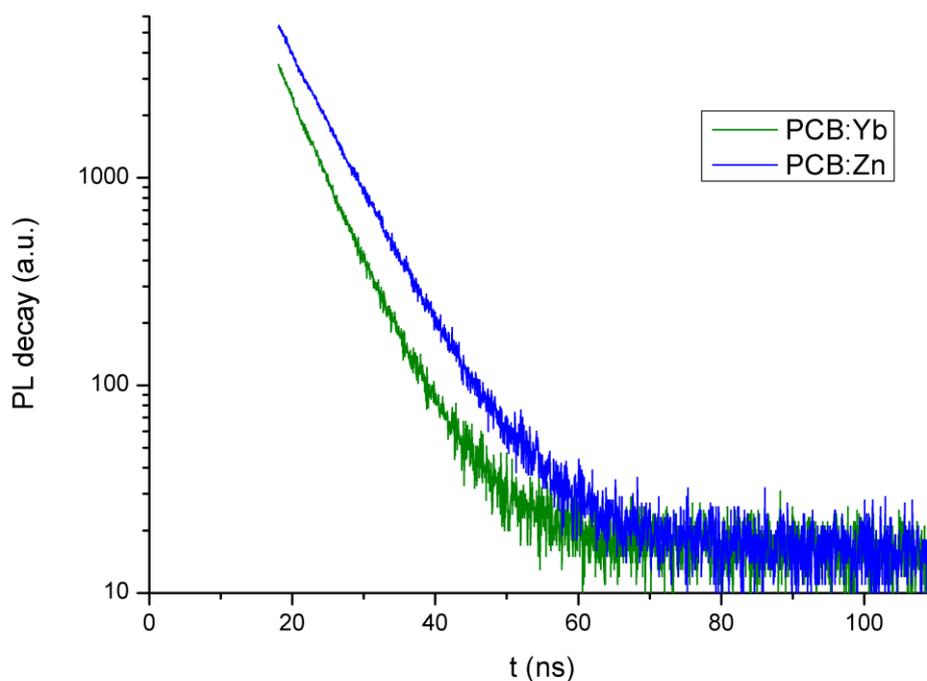


Figura 46 Plot semilogaritmico del decadimento dell'emissione ($\lambda_{eccitazione} = 373 \text{ nm}$, $\lambda_{emissione} = 629\text{-}636 \text{ nm}$) della PCB in metanolo in presenza di precursori metallici a temperatura ambiente.

5.8 Indagine computazionale su possibili complessi della PCB

L'interazione della PCB, inizialmente in forma dianionica, con i cationi Zn(II) e Y(III) è stata modellata computazionalmente considerando un sistema semplificato, in cui gli unici leganti ancillari introdotti sono molecole d'acqua. Per i calcoli sono stati impiegati i metodi GFN2-xTB, PBEh-3c e TPSS0/def2-SVP, mentre i funzionali accoppiati a *basis sets* triple- ζ non sono stati utilizzati a causa dell'elevato carico computazionale dovuto al peso del *basis set* e del numero di atomi costituenti il complesso. Come anticipato nelle sezioni precedenti, è stato considerato Y(III) al posto di Yb(III) per semplificare i calcoli computazionali.

La struttura della PCB presenta un numero consistente di atomi di azoto ed ossigeno che possono fungere da σ -donatori per un generico centro metallico e i dati sperimentali in possesso non forniscono informazioni determinanti sul modo di coordinazione. La stechiometria dei complessi è stata simulata mantenendo un rapporto 1:1 tra metallo e PCB e colmando i siti di coordinazione vacanti con molecole d'acqua. Per entrambi i complessi il numero di molecole d'acqua ottimale è stato stabilito circondando il centro metallico con un eccesso di leganti H₂O ed effettuando un'ottimizzazione geometrica a livello GFN2-xTB *tight* che ha portato fuori dalla prima sfera di coordinazione le molecole in eccesso. Le geometrie ottimizzate a livello semiempirico sono state poi impiegate come *initial guess* per i calcoli DFT successivi. Le tre principali geometrie d'equilibrio ottenute nel caso del complesso con lo zinco, aventi formula generale [Zn(PCB)(H₂O)₃], sono riportate in *Figura 47*. L'ottenimento di punti di minimo locali della PES è stato confermato dalle simulazioni IR. Nel primo isomero rappresentato, [Zn(PCB)(H₂O)₃]-is1, la coordinazione della PCB avviene attraverso l'eterociclo pirrolico centrale avente l'atomo di azoto in forma imminica. La coordinazione è rafforzata da un gruppo carbossilato, legato κ^1 a Zn(II) e coinvolto in un legame a idrogeno con una molecola d'acqua coordinata. In un altro isomero considerato, [Zn(PCB)(H₂O)₃]-is2, la coordinazione della PCB avviene attraverso gli atomi di ossigeno degli eterocicli pirrolici. Infine, in [Zn(PCB)(H₂O)₃]-is3 l'interazione tra PCB e Zn(II) avviene tramite i gruppi carbossilato, uno legato κ^1 e coinvolto in un legame ad idrogeno con una molecola d'acqua coordinata, l'altro legato κ^2 . Data la presenza di tre molecole d'acqua in prima sfera di coordinazione, la geometria risultante è ottaedrica distorta. Il confronto dei valori di energia libera di Gibbs ha indicato che l'isomero [Zn(PCB)(H₂O)₃]-is3 è significativamente più stabile degli altri, quindi

l'interazione di Zn(II) con PCB in forma dianionica dovrebbe coinvolgere *in primis* i pendagli carbossilato.

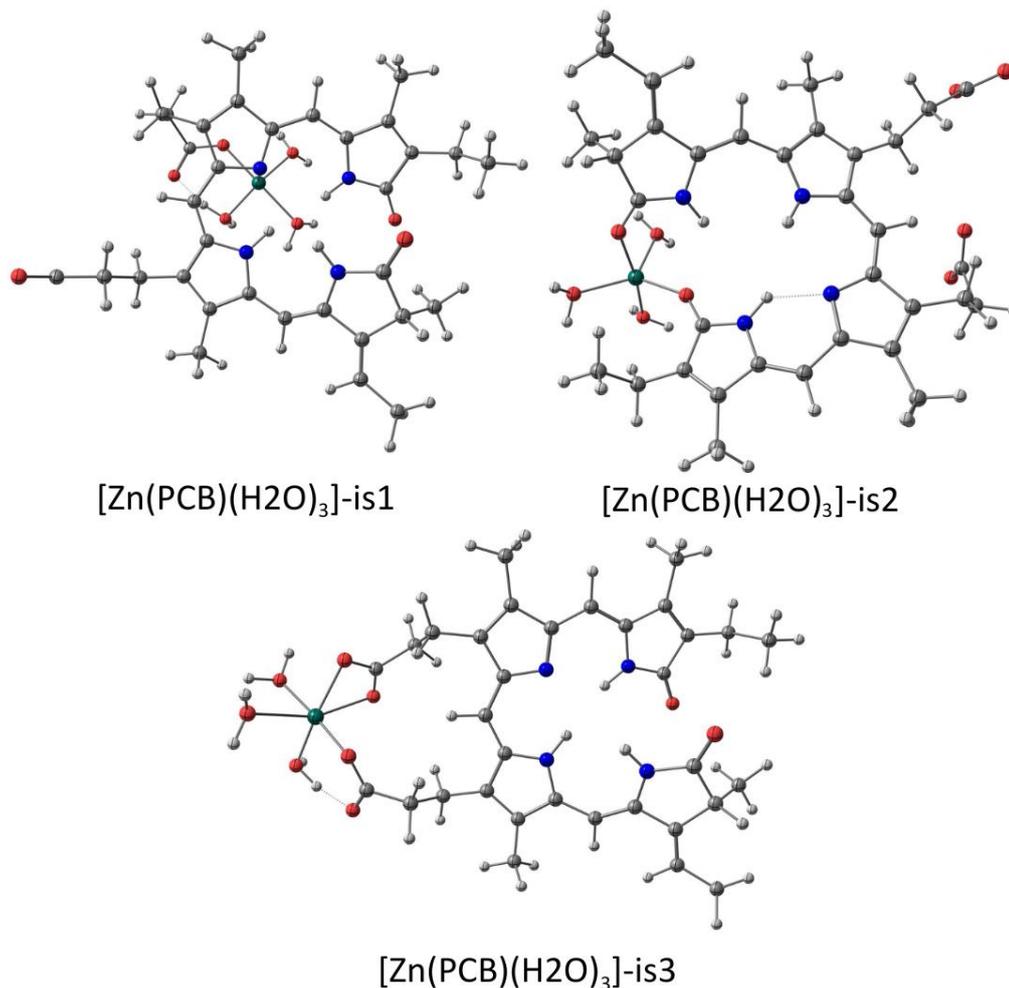


Figura 47 Isomeri di $[Zn(PCB)(H_2O)_3]$ ottimizzati a livello TPSS0/def2-SVP.

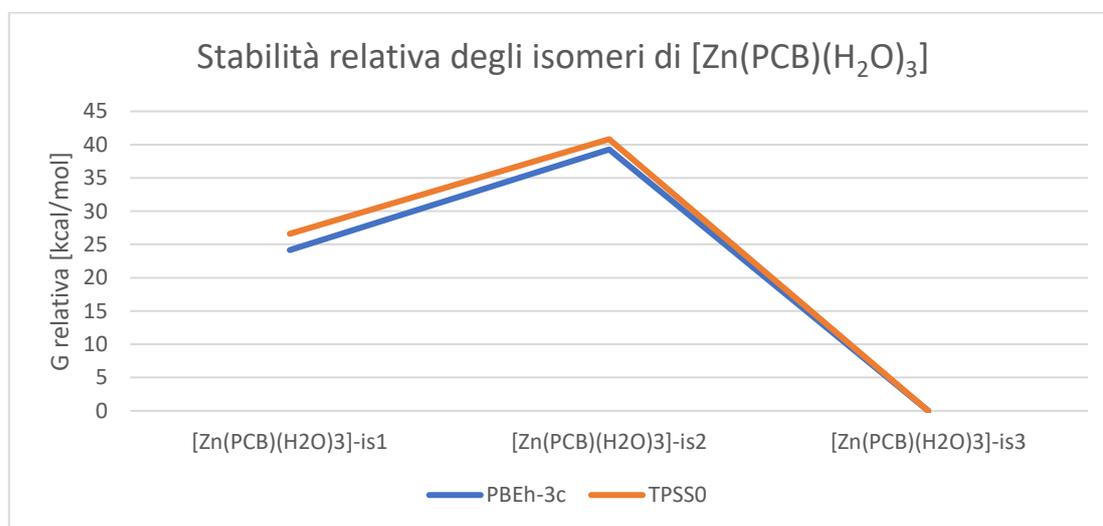


Figura 48 Stabilità termodinamica relativa dei tre isomeri.

Come osservabile in *Figura 49*, gli orbitali di frontiera di $[\text{Zn}(\text{PCB})(\text{H}_2\text{O})_3]\text{-is3}$ sono entrambi localizzati prevalentemente sulla PCB. Le energie dei due orbitali ed il *gap* HOMO-LUMO differiscono significativamente tra i due metodi, come già osservato per la PCB libera. Il confronto tra complesso e legante libero a parità di metodo indica però una riduzione del *gap* HOMO-LUMO associata alla coordinazione del centro metallico (*Tabella 18*). Dato che la natura della transizione a più bassa energia è la stessa tra PCB e il suo complesso, l'assorbimento viene previsto a lunghezze d'onda maggiori, risultato in accordo con la variazione dello spettro di assorbimento osservata sperimentalmente (*Tabella 19*). Gli spettri UV-Vis simulati sono mostrati in *Figura 50*. La *Figura 50* mostra anche che l'introduzione dello *spin-orbit coupling* ha effetti trascurabili sulla simulazione dello spettro di assorbimento.

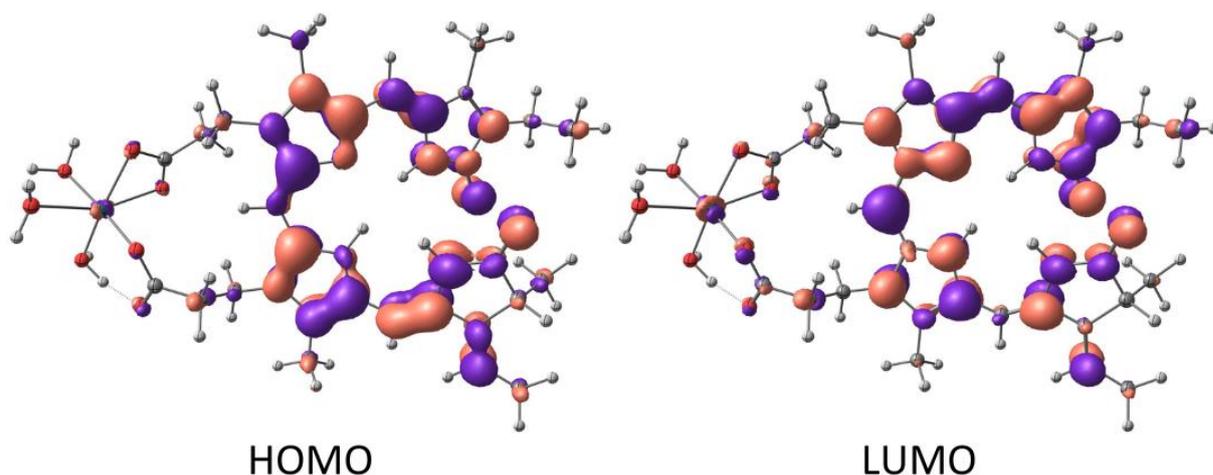


Figura 49 Orbitali HOMO e LUMO calcolati a livello TPSS0/def2-SVP. Isovalue: 0.03 a.u.

Tabella 18 Energie degli orbitali di frontiera ed H-L gap calcolati per PCB libera (conformero aperto) e complesso di Zn(II).

Funzionale	$[\text{Zn}(\text{PCB})(\text{H}_2\text{O})_3]$			PCB		
	HOMO [Eh]	LUMO [Eh]	H-L gap [eV]	HOMO [Eh]	LUMO [Eh]	H-L gap [eV]
PBEh-3c	-0.2062	-0.0860	3.27	-0.2105	-0.0746	3.70
TPSS0/def2-SVP	-0.1850	-0.0967	2.40	-0.1851	-0.0875	2.66

Tabella 19 Dati relativi alla transizione $S_1 \leftarrow S_0$.

$S_1 \leftarrow S_0$	[Zn(PCB)(H ₂ O) ₃]		PCB	
	PBEh-3c	TPSS0/def2-SVP	PBEh-3c	TPSS0/def2-SVP
Energia del fotone [eV]	2.23	2.12	2.65	2.40
Lunghezza d'onda [nm]	557	586	467	517
HOMO \leftarrow LUMO %	96.5	96.6	96.1	96.3

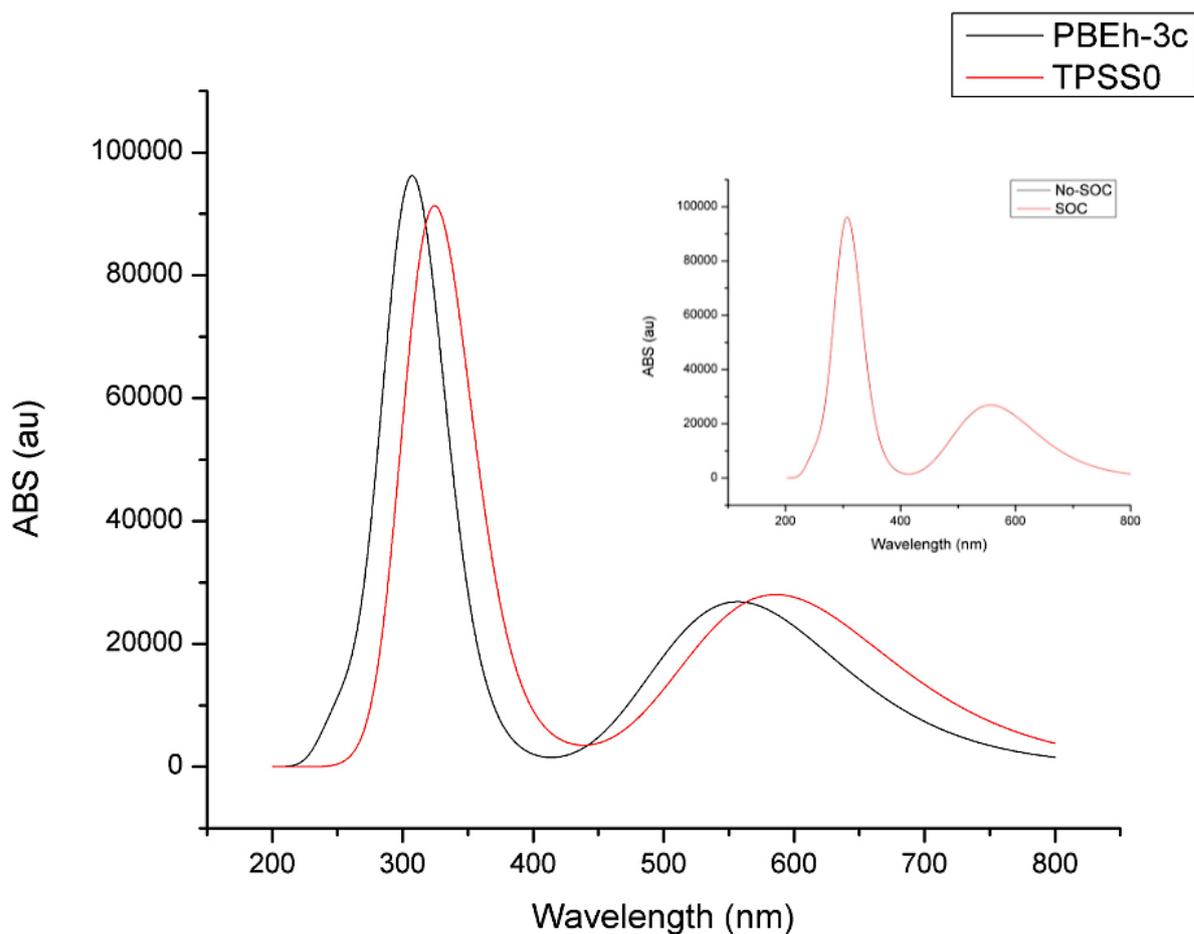


Figura 50 Sovrapposizione degli spettri UV-Vis teorici. Nel riquadro in figura si confrontano due spettri con e senza correzione SOC.

Sono state ottimizzate le geometrie in stato di tripletto per simulare un'eventuale emissione fosforescente. Rispetto alla geometria di singoletto diminuisce il numero di coordinazione a 4, poiché una molecola d'acqua è portata fuori dalla sfera di coordinazione. I dati in *Tabella 20* confermano inoltre che una eventuale emissione fosforescente cadrebbe nel NIR, come per la PCB libera. Ad ulteriore riprova, la *spin density* rimane localizzata sul sistema tetrapirrollico coniugato (*Figura 51*).

Tabella 20 Dati di emissione dallo stato di tripletto.

	PBEh-3c	TPSS0/def2-SVP
Energia del fotone [eV]	0.74	0.77
Lunghezza d'onda [nm]	1667	1621

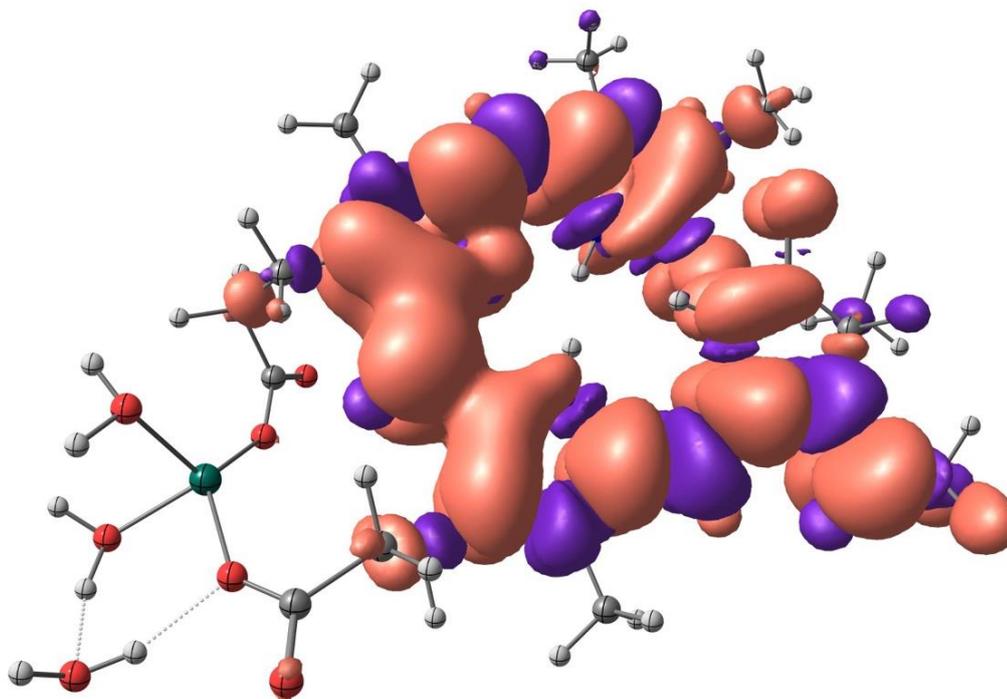


Figura 51 Spin density del complesso $[Zn(PCB)(H_2O)_3]$ -is3. Isovalue: 0.0005 a.u.

Nel caso del derivato di Y(III) la determinazione della geometria di coordinazione e della stechiometria del complesso hanno seguito il medesimo approccio seguito per il derivato di Zn(II). La stechiometria risultante è data dalla formula bruta $[Y(PCB)(H_2O)_5]^+$. Lo studio dei possibili isomeri ha rivelato anche in questo caso la maggior stabilità del complesso con la PCB legata attraverso i gruppi carbossilici, con modi di coordinazione già osservati per l'analogo derivato di Zn(II). Il numero di coordinazione complessivo dell'isomero più stabile è risultato pari a 8. Le geometrie d'equilibrio sono mostrate in *Figura 52*, mentre le energie di Gibbs relative sono riportate in *Figura 53*.

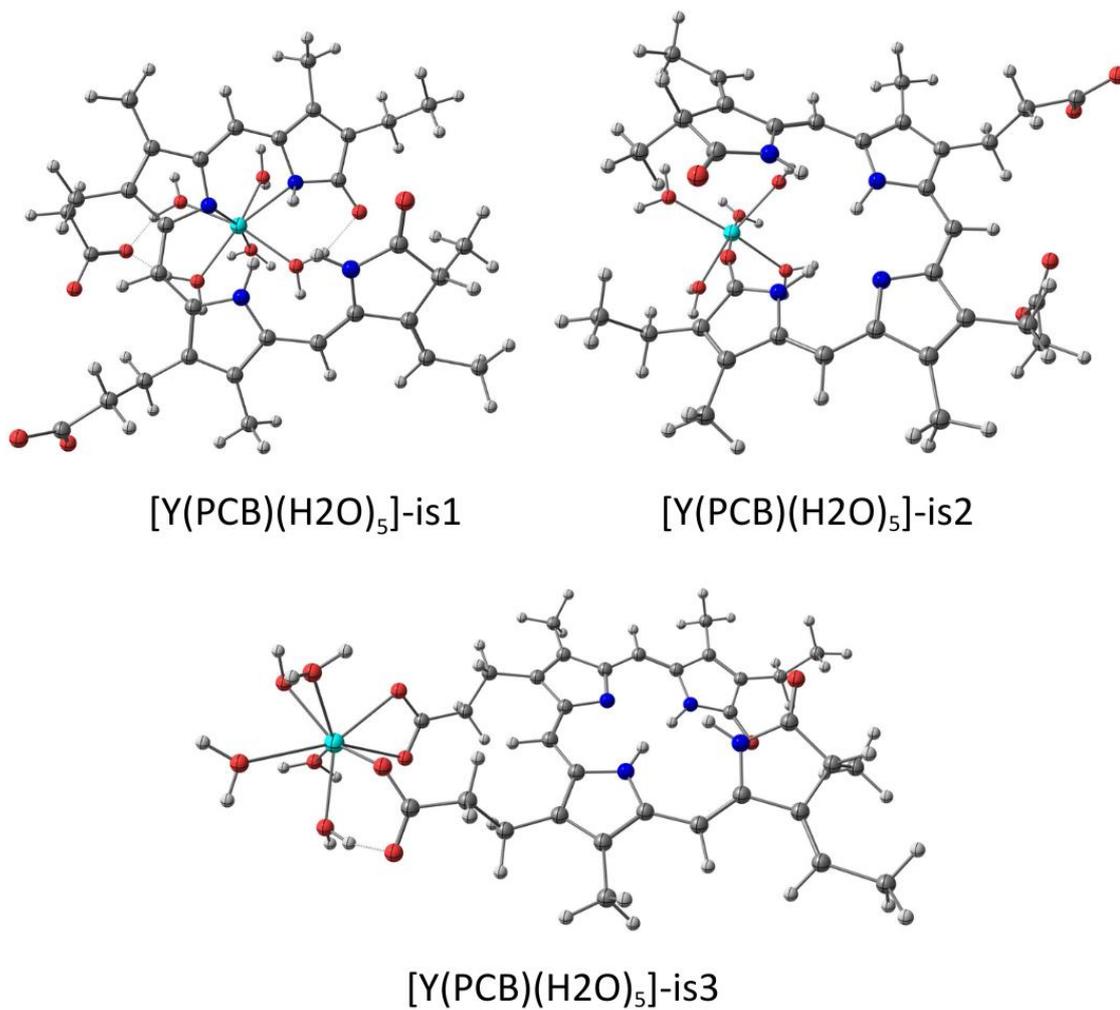


Figura 52 Isomeri di [Y(PCB)(H₂O)₃] ottimizzati a livello TPSS0/def2-SVP.

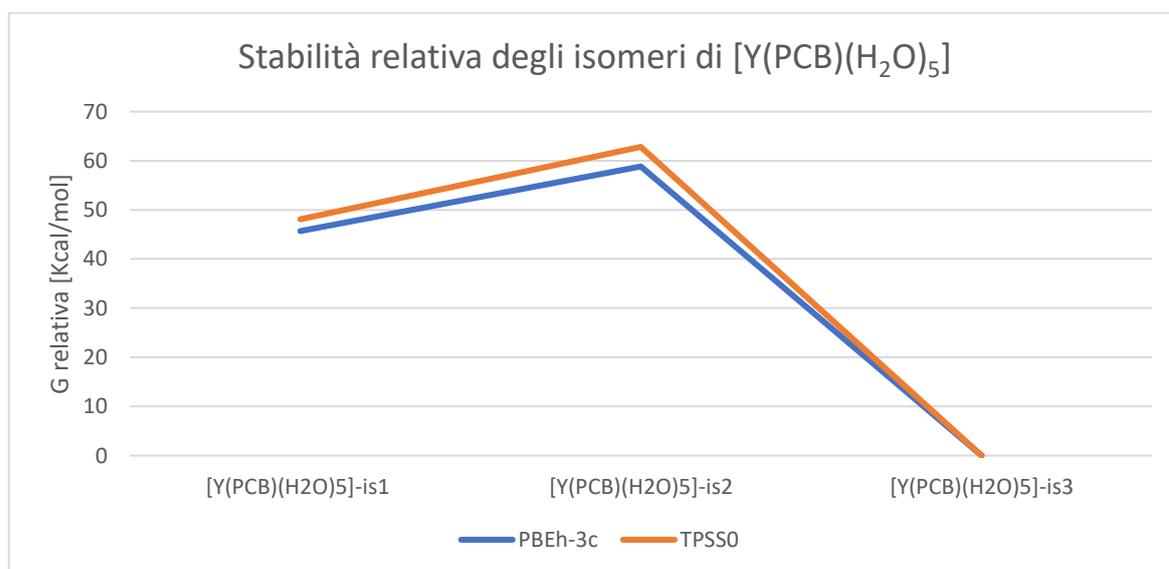


Figura 53 Stabilità termodinamica relativa dei tre isomeri.

Dal momento che il complesso è cationico è stata calcolata la prima pK_a per verificare una ulteriore deprotonazione a pH fisiologico. Calcoli preliminari su possibili isomeri hanno indicato che il sito preferenziale di deprotonazione dovrebbe corrispondere al pirrolone terminale contenente il doppio legame esociclico. I valori di pK_a sono stati stimati pari a -0.31 a livello PBEh-3c e 1.71 a livello TPSS0/def2-SVP. Nonostante la diversità dei risultati, il confronto con i dati ottenuti per la PCB libera indicano un notevolissimo aumento di acidità, e suggeriscono che il complesso a pH fisiologico debba presentarsi in forma neutra, con la PCB coordinata formalmente trianionica. Come osservabile in *Figura 54*, l'interazione con Y(III) della PCB rimane esclusivamente a carico dei gruppi carbossilato, nonostante il cambio di carica formale. Gli orbitali di frontiera risultano localizzati esattamente come nel modello di complesso cationico descritto in precedenza. Il *gap* HOMO-LUMO di questa specie risulta ancora inferiore rispetto a quello del complesso neutro di Zn(II), con conseguente *red-shift* della transizione a più bassa energia. Gli spettri di assorbimento simulati sono mostrati in *Figura 55*. Non è stato possibile applicare la correzione per lo *spin-orbit coupling* dato che il *basis set* per il centro di ittrio include un ECP.

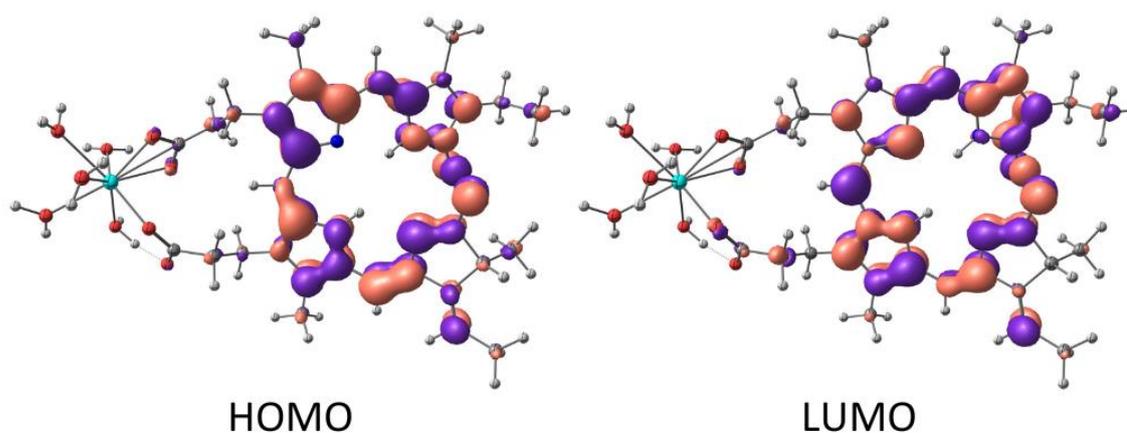


Figura 54 HOMO e LUMO calcolati a livello TPSS0. Isovalue: 0.03

Tabella 21 Dati relativi alla transizione $S_1 \leftarrow S_0$.

	PBEh-3c	TPSS0/def2-SVP
H-L gap [eV]	3.12	2.27
Energia del fotone [eV]	2.07	1.99
Lunghezza d'onda [nm]	600	624
HOMO \leftarrow LUMO %	96.2	96.7

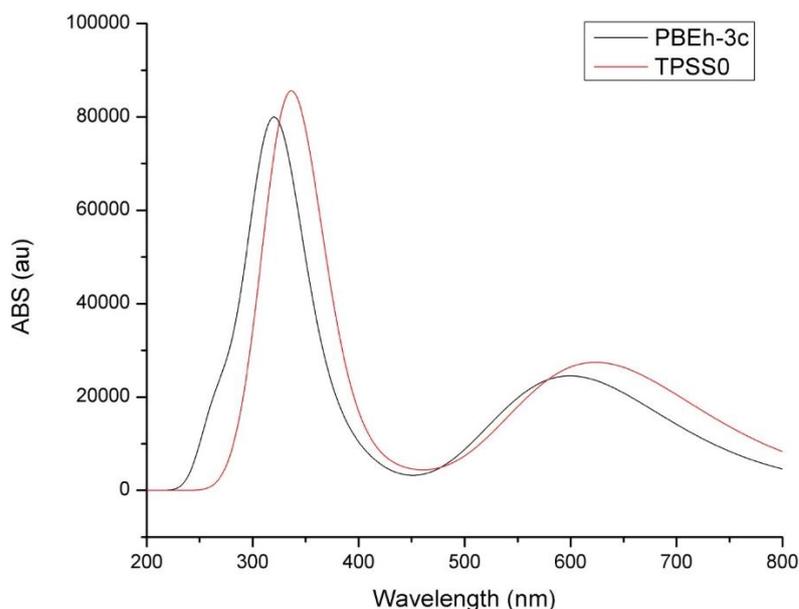


Figura 55 Spettri UV-Vis simulati per il complesso $[Y(PCB)(H_2O)_5]$.

Un' eventuale emissione fosforescente dalla geometria di tripletto (Figura 56) è stata simulata nella regione del NIR, esattamente come per il complesso con lo zinco. I valori ottenuti, intorno a 0.77 eV, suggeriscono che lo stato di tripletto sia ad energia significativamente inferiore rispetto al livello risonante $^2F_{5/2}$ di Yb(III), lasciando presumere che non ci possa essere efficiente trasferimento energetico dalla PCB a questo centro metallico. L'assenza di significative interazioni tra sistema tetrapirrolico e PCB giustifica l'osservazione sperimentale di emissione fluorescente anche dopo aver fatto reagire la PCB con un precursore di Yb(III).

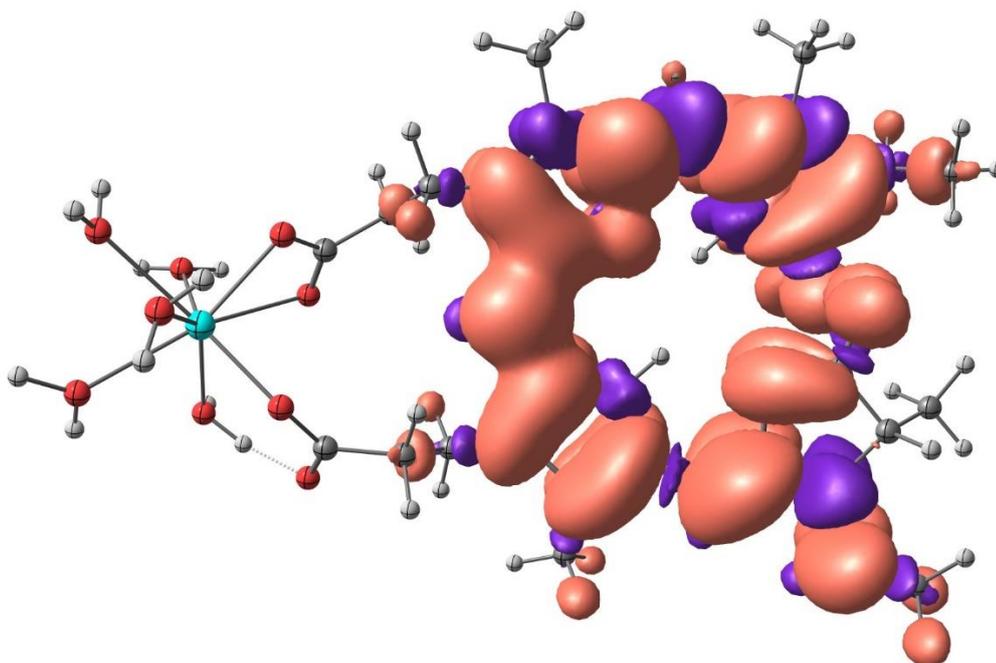


Figura 56 Spin density del complesso. Isovalue: 0.0005 a.u.

6 Conclusioni

Il lavoro di tesi ha permesso di ottimizzare la procedura di estrazione della PCB da campioni commerciali di alga spirulina. Nonostante le esigue quantità ottenute, è stato possibile osservare la debole fluorescenza di questa molecola in soluzione di metanolo e verificare la sua capacità di interazione con selezionati centri metallici attraverso lo studio degli spettri di assorbimento ed emissione. Il dato sperimentalmente più promettente è l'aumento di resa quantica di fluorescenza causato dall'interazione con Zn(II), probabilmente dovuto ad una riduzione dei fenomeni di decadimento non radiativo. Ulteriori studi futuri saranno necessari per verificare se questo approccio possa portare all'ottenimento di materiali luminescenti biocompatibili.

I modelli computazionali, nonostante i limiti specifici legati alla scelta dei metodi di calcolo, hanno portato alla conclusione che il principale assorbimento nel visibile e l'emissione siano sostanzialmente a carico degli orbitali di frontiera della PCB, indipendentemente dal conformero considerato e dalla presenza di ioni metallici. I calcoli suggeriscono inoltre che una eventuale popolazione di stati eccitati di tripletto avrebbe come conseguenza più probabile lo spegnimento della luminescenza. L'influenza degli ioni metallici sui livelli energetici coinvolti nelle transizioni è stata confermata dalle simulazioni, nonostante la coordinazione sembri coinvolgere *in primis* i sostituenti carbossilici non direttamente coniugati con il frammento tetrapirrolico.

7 Riferimenti bibliografici

1. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer New York, 2006).
2. Schulman, S. G., Di, Q., Juchum, J. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, 2040-2046 (Academic Press, 1999).
3. Berezin, M. Y., Achilefu, S. *Chem Rev*, 110(5), 2641-2684 (2010).
<https://doi.org/10.1021/cr900343z>
4. Goltsev, V., Chernev, P., Zaharieva, I. et al. *Photosynth Res* 84, 209–215 (2005).
DOI:10.1007/s11120-004-6432-2.
5. Krause, G. H., Weis, E. *Ann Rev of Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 313-349 (1991). DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
6. Xiong, Y. et al. *New J Chem* 45, 15180–15194 (2021). DOI: 10.1039/D1NJ02230J.
7. Falk, J. E. *Porphyrins and metalloporphyrins*. (Elsevier Scientific, 1975).
8. Guo, M., Chen, Y. *Rev Environ Sci Biotechnol* 17, 259–284 (2018).
9. Nobel, P. S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, 259–307 (Academic Press, 2020).
10. Gillbro, T., Cogdell, R. J. *Chem Phys Lett* 158, 312–316 (1989). DOI: 10.1016/0009-2614(89)87342-7
11. Björkman O, Demmig B. *Planta*, 170(4), 489-504 (1987).
DOI: 10.1007/BF00402983
12. Butler, W. L. *Photosynthesis I*, 149–167 (Springer, 1977). DOI:10.1007/978-3-642-66505-9_8.
13. Butler, W. L. *Annu Rev Plant Physiol* 29, 345–378 (1978). DOI: 10.1146/annurev.pp.29.060178.002021
14. Connolly, J. S., Janzen, A. F., Samuel, E. B. *Photochem Photobiol* 36, 559–563 (1982).
DOI: 10.1111/j.1751-1097.1982.tb04416.x
15. Fu, E., Friedman, L., Siegelman, H. W. *Biochem. J* vol. 179, 1-6 (1979). DOI: 10.1042/bj1790001.
16. Cole, W. J., Chapman, D. J., Siegelman, H. W. *Biochem* 7(8), 2929–2935 (1968). DOI: 10.1021/bi00848a033

17. Schram, B. L., Kroes, H. H. *Eur J Biochem* 19, 581–594 (1971). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01352.x
18. Singh, N. K., Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Madamwar, D. *EXCLI J* 14, 268–289 (2015). DOI: 10.17179/excli2014-723
19. Yan, SG., Zhu, LP., Su, HN. et al. *J Appl Phycol* 23, 1–6 (2011). DOI: 10.1007/s10811-010-9525-7
20. Kirk, J. T. O. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. (Cambridge University Press, 1994). DOI:10.1017/CBO9780511623370.
21. Celltechgen technology, H. (TX). Spectrum of C-PC.
22. Morrissey, J., Sumich, J. L., Pinkard-Meier, D. R. *Introduction to the Biology of Marine Life*, 11th edition. (Jones & Bartlett Learning, 2016).
23. Jones, G. A., Bradshaw, D. S. *Front Phys* 7, 100 (2019). DOI: 10.3389/fphy.2019.00100
24. Benedetti, S., Benvenuti, F., Scoglio, S., Canestrari, F. *J Med Food* 13, 223–227 (2010). DOI: 10.1089/jmf.2008.0257
25. Li, Y. *J Immunol Res* 2022, 1-8 (2022) DOI: 10.1155/2022/4008991 (2022).
26. Romay C, Armesto J, Ramirez D, González R, Ledon N, García I. *Inflamm Res* 47, 36–41 (1998). DOI: 10.1007/s000110050256
27. Piniella-Matamoros, B., Marín-Prida, J., Pentón-Rol, G. *J Biosci* 46, 42 (2021). DOI:10.1007/s12038-021-00161-7
28. Bhat, V. B., Madyastha, K. M. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 20–25 (2000). DOI: 10.1006/bbrc.2000.3270
29. McCarty, M. F. & Lerner, A. *Int J Mol Sci* 21, 3624 (2020). DOI: 10.3390/ijms21103624
30. McCarty, M. F., Barroso-Aranda, J. & Contreras, F. *Med Hypotheses* 74, 601–605 (2010). DOI: 10.1016/j.mehy.2008.09.061
31. Romay, C., Ledón, N., Gonzalez, R. *Arzneimittel-Forschung* 50, 1106–1109 (2011). DOI: 10.1055/s-0031-1300340
32. Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D. & Rimbau, V. *Curr Protein Pept Sci* 4, 207–216 (2003). DOI: 10.2174/1389203033487216
33. Thangam, R., Suresh, V., Asenath Princy, W., Rajkumar, M., Senthilkumar, N., Gunasekaran, P., Rengasamy, R., Anbazhagan, C., Kaveri, K., & Kannan, S. *Food Chem* 140, 262–272 (2013). DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.060

34. Hao, S., Yan, Y., Li, S., Zhao, L., Zhang, C., Liu, L., Wang, C. *Mar Drugs* 16, 178 (2018). DOI: 10.3390/md16060178
35. Koničková, R., Vaňková, K., Vaníková, J., Váňová, K., Muchová, L., Subhanová, I., Zadinová, M., Zelenka, J., Dvořák, A., Kolář, M., Strnad, H., Rimpelová, S., Ruml, T., J Wong, R., Vítek, L. *Ann Hepatol* 13, 273–283 (2014). PMID: 24552870
36. Heocha, C. Ó. *Biochem* 2, 375–382 (1963). DOI: 10.1021/bi00902a034
37. Suresh, M., Mishra, S. K., Mishra, S. & Das, A. *Chemical Communications* 2496 (2009) DOI: 10.1039/b821687h.
38. Magde, D., Wong, R. & Seybold, P. G. *Photochem Photobiol* 75, 327–334 (2007). DOI: 10.1562/0031-8655(2002)075<0327:fqyatr>2.0.co;2
39. Göller, A. H., Strehlow, D. & Hermann, G. *ChemPhysChem* 2, 665–671 (2001). DOI: 10.1002/1439-7641(20011119)2:11<665::AID-CPHC665>3.0.CO;2-O
40. Engquist B, ed. *Encyclopedia of Applied and Computational Mathematics*. (Springer, 2015). DOI: 10.1007/978-3-540-70529-1.
41. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models Second Edition* (Wiley, 2004).
42. Schlegel, H. B. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 1, 790–809 (2011) DOI: 10.1002/wcms.34
43. Bannwarth, C., Ehlert, S., Grimme, S. *J Chem Theory Comput* 15, 1652–1671 (2019). DOI: 10.1021/acs.jctc.8b01176
44. Neese, F., Wennmohs, F., Becker, U.L, Riplinger, C. *J Chem Phys* 152, (2020). DOI: 10.1063/5.0004608
45. Hohenberg, P., Kohn, W. *Phys Rev* 136, B864–B871 (1964). DOI: 10.1103/PhysRev.136.B864
46. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry 2nd edition*. (Wiley, 2007)
47. Bortoluzzi, M. *Approccio qualitativo alla chimica computazionale*. (Aracne editrice, 2009).
48. Löwdin, P.O. *Int J Quantum Chem* 28, 19–37 (2009). DOI:10.1002/QUA.560280805
49. Calbo, J., Ortí, E., Sancho-García, J. C., Aragó, J. *Annual Reports in Computational Chemistry* 37–102 (2015). DOI: 10.1016/bs.arcc.2015.09.002.
50. Kohn, W., Sham, L. *J Phys Rev* 140, A1133–A1138 (1965). DOI: 10.1103/PhysRev.140.A1133

51. Barhoumi, M. *The Density Functional Theory and Beyond: Example and Applications*. (IntechOpen, 2022). DOI: 10.5772/intechopen.100618
52. Grimme, S. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* 1, 211–228 (2011). DOI: 10.1002/wcms.30
53. Perdew, J. P., Chevary, J. A., Vosko, S. H., Jackson, K. A., Pederson, M. R., Singh, D. J., Fiolhais, C. *Phys. Rev. B* 46, 6671 (1992). DOI: 10.1103/physrevb.46.6671
54. Grimme, S., Brandenburg, J. G., Bannwarth, C., Hansen, A. *J Chem Phys* 143, (2015). DOI: 10.1063/1.4927476
55. Perdew, J. P., Burke, K., Ernzerhof, M. *Phys Rev Lett* 77, 3865–3868 (1996). DOI: 10.1103/PhysRevLett.77.3865
56. Tao, J., Perdew, J. P., Staroverov, V. N., Scuseria, G. E. *Phys Rev Lett* 91, 146401 (2003). DOI: 10.1103/PhysRevLett.91.146401
57. Staroverov, V. N., Scuseria, G. E., Tao, J., Perdew, J. P. *Journal of Chemical Physics* 119, 12129–12137 (2003). DOI: 10.1063/1.1626543
58. Weigend, F., Ahlrichs, R. *Phys Chem Chem Phys* 7, 3297–3305 (2005). DOI: 10.1039/b508541a
59. Sun, J., Ruzsinszky, A., Perdew, J. *Phys Rev Lett* 115, 036402 (2015). DOI: 10.1103/PhysRevLett.115.036402
60. Bartók, A. P., Yates, J. R. *J Chem Phys* 150, 161101 (2019). DOI: 10.1063/1.5094646
61. Furness, J. W., Kaplan, A. D., Ning, J., Perdew, J. P. & Sun, *J Phys Chem Lett* 11, 8208–8215 (2020). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.0c02405
62. Grimme, S., Hansen, A., Ehlert, S. & Mewes, J. M. *J Chem Phys* 154, 064103 (2021). DOI: 10.1063/5.0040021
63. Yang, Y., Yu, H., York, D., Cui, Q. & Elstner, M. *J Phys Chem A* 111, 10861–10873 (2007). DOI: 10.1021/jp074167r
64. Bannwarth, C, Caldeweyher, E, Ehlert, S, Grimme, S. et al. *WIREs Comput Mol Sci*. 11, e1493 (2021). DOI: 10.1002/wcms.1493
65. Grimme, S., Bannwarth, C. & Shushkov, P. *J Chem Theory Comput* 13, 1989–2009 (2017). DOI: 10.1021/acs.jctc.7b00118
66. Ehlert, S., Stahn, M., Spicher, S., Grimme, S. *J Chem Theory Comput* 17, 4250–4261 (2021). DOI: 10.1021/acs.jctc.1c00471

67. Sigalov, G., Fenley, A., Onufriev, A. *J Chem Phys* 124, 124902 (2006). DOI: 10.1063/1.2177251
68. Sigalov, G., Scheffel, P., Onufriev, A. *J Chem Phys* 122, 094511 (2005). DOI: 10.1063/1.1857811
69. Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G. & Barone, V. *J Comput Chem* 24, 669–681 (2003). DOI: 10.1002/jcc.10189
70. Klamt, A., Schuurmann, G. Klamt, A., & Schüürmann, G. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* 799-805 (1993). DOI: 10.1039/P29930000799
71. Ullrich, Carsten A. *Time-Dependent Density-Functional Theory*. (Oxford University Press, 2012)
72. Schreckenbach, G. Ziegler, T. J. *Phys. Chem.* 99, 606–611 (1995). DOI: 10.1021/j100002a024
73. Ditchfield, R. *Mol Phys* 27, 789–807 (1974). DOI: 10.1080/00268977400100711
74. Malkin, V. G., Malkina, O. L., Eriksson, L. A. & Salahub, D. R. *Theoretical and Computational Chemistry* 2, 273–347 (1995). DOI: 10.1016/S1380-7323(05)80039-1.
75. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. *J Comput Chem* 25, 1605–1612 (2004). DOI: 10.1002/jcc.20084
76. Nield, J., Rizkallah, P. J., Barber, J. & Chayen, N. E. *J Struct Biol* 141, 149–155 (2003). DOI: 10.1016/s1047-8477(02)00609-3
77. Halgren, T. A. *J Comput Chem* 17, 490–519 (1996). DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P
78. <https://www.chemcraftprog.com>. Chemcraft - graphical software for visualization of quantum chemistry computations
79. Lu, T., Chen, F. *J Comput Chem* 33, 580–592 (2012). DOI: 10.1002/jcc.22885
80. Liu, Z., Lu, T., Chen, Q. *Carbon N Y* 165, 461–467 (2020). DOI: 10.1016/j.carbon.2020.05.023.
81. Sastre, S., Casanovas, R., Muñoz, F. & Frau, J. *Phys Chem Chem Phys* 18, 11202–11212 (2016). DOI: 10.1039/C5CP07053H
82. Tsoraev, G. V., Protasova, E. A., Klimanova, E. A., Ryzhykau, Y. L., Kuklin, A. I., Semenov, Y. S., Ge, B., Li, W., Qin, S., Friedrich, T., Sluchanko, N. N., Maksimov, E. G. *Struct Dyn* 9, 054701 (2022). DOI: 10.1063/4.0000164

83. B Bünzli, J.-C. G., Eliseeva, S. V. *Journal of Rare Earths* 28, 824–842 (2010). DOI: 10.1016/S1002-0721(09)60208-8