



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Scuola Dottorale di Ateneo  
Graduate School

Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche  
Ciclo XXV  
Anno di discussione: 2013

## **MODIFICHE STRUTTURALI DI PIGMENTI ORGANICI E BIOPOLIMERI PER LA REALIZZAZIONE DI MATERIALI INNOVATIVI**

*Settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM/06*

Tesi di Dottorato di Beninatto Riccardo, matricola 797094

Coordinatore del Dottorato  
*Prof. Maurizio Selva*

Tutore del Dottorando  
*Prof. Elisabetta Zendri*

Co-tutori del Dottorando  
*Prof. Ottorino De Lucchi*  
*Prof. Vittorio Lucchini*  
*Dott. Giuseppe Borsato*

# MODIFICHE STRUTTURALI DI PIGMENTI ORGANICI E BIOPOLIMERI PER LA REALIZZAZIONE DI MATERIALI INNOVATIVI

## 1. NUOVI DPP-DERIVATI TRAMITE SUZUKI-MIYAJIMA CROSS-COUPLING

- 1.1. Introduzione
  - 1.1.1. I pigmenti organici e gli *High Performance Pigments* (HPP)
    - a) Proprietà chimiche
    - b) Storia e classificazione
    - c) Utilizzo e diffusione
  - 1.1.2. Il dichetopirrolopirrolo e le sue sintesi
    - a) Storia del DPP
    - b) Sintesi del DPP
    - c) Applicazioni
  - 1.1.3. Proprietà chimico-fisiche del DPP
    - a) Proprietà spettrali
    - b) Fluorescenza
    - c) Cristallinità
    - d) Reattività di base
- 1.2. Scopo della tesi
- 1.3. Sintesi
  - 1.3.1. Precursori
  - 1.3.2. Nuova libreria di pigmenti
- 1.4. Caratterizzazione
  - 1.4.1. Studio delle proprietà ottiche (assorbimento UV-Vis, fluorescenza)
  - 1.4.2. Calcolo del coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ )
  - 1.4.3. Calcolo della resa quantica di fluorescenza ( $\Phi$ )
- 1.5. Conclusioni e prospettive
- 1.6. Parte sperimentale
  - 1.6.1. Strumentazioni, reagenti e solventi
  - 1.6.2. Prodotti e caratterizzazione

Appendice A – Dati inerenti al calcolo di  $\epsilon$

Bibliografia

## 2. DA PIGMENTO A POLIMERO SUPRAMOLECOLARE

- 2.1. Introduzione: i polimeri supramolecolari
  - 2.1.1. Tipologie di polimeri supramolecolari
    - a) Legame a idrogeno
    - b) Interazioni di  $\pi$ - $\pi$  *stacking*
    - c) Coordinazione
  - 2.1.2. Polimerizzazione supramolecolare
    - a) Polimerizzazione supramolecolare isodesmica
    - b) Polimerizzazione supramolecolare cooperativa
- 2.2. Scopo della tesi
- 2.3. Sintesi
  - 2.3.1. *Longchains*-DPP
  - 2.3.2. Mono-*longchains*-DPP
  - 2.3.3. Molecola-modello ad aggregazione limitata
- 2.4. Caratterizzazione del *longchains*-DPP
  - 2.4.1. Spettroscopia di assorbimento UV-Vis e fluorescenza
  - 2.4.2. Esperimenti NMR
    - a) Titolazioni  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{CDCl}_3$
    - b) DOSY
  - 2.4.3. Esperimenti  $^1\text{H}$  NMR a temperatura variabile in  $\text{MCH-}d_3$
  - 2.4.4. Esperimenti di spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile
  - 2.4.5. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)
  - 2.4.6. Analisi di microscopia allo stato solido
    - a) Microscopia elettronica a scansione (SEM)
    - b) Microscopia a epifluorescenza (EFM)
    - c) Microscopia ottica polarizzata (POM)
- 2.5. Caratterizzazione preliminare del mono-*longchains*-DPP
  - 2.5.1. Esperimenti di spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile
  - 2.5.2. Analisi di microscopia allo stato solido (SEM)
- 2.6. Conclusioni e prospettive
- 2.7. Parte sperimentale
  - 2.7.1. Strumentazione, reagenti e solventi
  - 2.7.2. Prodotti e caratterizzazione

Appendice B – Modello di Zhao e Moore

Appendice C – Aggregati H e aggregati J

Appendice D – Dati di polimerizzazione cooperativa

Bibliografia

### 3. IDROGEL DALL'ACIDO IALURONICO PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE

- 3.1. Introduzione
  - 3.1.1. Acido ialuronico: chimica e utilizzo
  - 3.1.2. Idrogel
  - 3.1.3. Biomateriali derivati dall'acido ialuronico
    - a) Reazioni al gruppo carbossilico
    - b) Reazioni al gruppo ossidrilico
    - c) Reazioni di polimerizzazione e fotopolimerizzazione
  - 3.1.4. Applicazioni
  - 3.1.5. Cumarina
    - a) Chimica e classificazione
    - b) Fotoreattività
- 3.2. Scopo della tesi
- 3.3. Sintesi
  - 3.3.1. *Linker*
    - a) Cumarina-PEG-I
    - b) Cumarina-PEG-NH<sub>2</sub>
  - 3.3.2. 7-(bromometil)-cumarina
  - 3.3.3. 7-(idrossi)-PEG-cumarina
  - 3.3.4. HA-PEG-cumarina (estere)
  - 3.3.5. HA-PEG-cumarina (ammide)
  - 3.3.6. HA-cumarina (estere)
- 3.4. Esperimenti di spettroscopia NMR per lo studio dei derivati esterei
- 3.5. Valutazione del grado di derivatizzazione e della cinetica di reazione tramite HPLC
- 3.6. Test di sterilizzazione
- 3.7. Fotopolimerizzazione e stabilità degli idrogel
  - 3.7.1. Gelificazione di HA-PEG-cumarina (estere)
  - 3.7.2. Gelificazione di HA-PEG-cumarina (ammide)
  - 3.7.3. Utilità del PEG nella formazione degli idrogel
  - 3.7.4. Swelling
  - 3.7.5. Degradazione in plasma artificiale
  - 3.7.6. Valutazione della bioadesione tramite gelificazione *in vitro*
- 3.8. Valutazione del crosslinking e misure reologiche
  - 3.8.1. Analisi del grado di crosslinking tramite HPLC-MS
  - 3.8.2. Misure reologiche sugli idrogel
- 3.9. Conclusioni
- 3.10. Parte sperimentale
  - 3.10.1. Strumentazione, reagenti e solventi
  - 3.10.2. Prodotti e caratterizzazione

Appendice E – Metodo HPLC per la stima del grado di derivatizzazione (esteri)

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ABoc	Di- <i>terz</i> -butil dicarbonato
AcOEt	Acetato di etile
AcOH	Acido acetico
AFM	Atomic Force Microscopy
Calc.	Calcolato
CAP	Cellulose Acetate Phthalate
CD	Circular Dichroism
COSY	Correlation Spectroscopy
CP	Covalent Polymer
Cy-Hex	Cyclohexane
DCM	Diclorometano
Dec.	Decomposizione
DMAP	<i>N,N'</i> -dimetilamminopiridina
DME	Dimetossietano
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsolfossido deuterato
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DP	Degree of Polymerization
DPP	3,6-difenil-1,4-dicheto-pirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSSC	Dye Sensitized Solar Cells
DXN	Double-Crosslinked Network
EA	Elementar Analysis
EDG	Electron Donating Group
EFM	Epifluorescence Microscopy
ESI-MS	Electrospray Ionization – Mass Spectrometry
EtOH	Etanolo
EWG	Electron Withdrawing Group
Exp.	Sperimentale
FC	Flash Chromatography
Fluor. Em.	Fluorescence Emission
GAG	Glicosaminoglicano
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HA	Hyaluronic Acid
HAAA	Hyaluronic Acid – Azide Amine
HApA	Hyaluronic Acid – Propargyl Amine
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPP	High Performance Pigments

iPrOH	Isopropanolo
IR	Infrarosso
LC	Liquid Crystal
MCH	Metilcicloesano
MCH- <i>d</i> 8	Metilcicloesano deuterato
mCPBA	Acido <i>meta</i> -cloro perbenzoico
MeOH	Metanolo
Mp	Melting Point
NIRS	Near Infrared Spectroscopy
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidone
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NVOC	4,5-dimetossi-2-nitrobenzilcarbonilcloruro
OFET	Organic Field-Effect Transistor
OPV	Oligo( <i>p</i> -fenilen-vinileni)
PAA	Crosslinked Polyacrylic Acid
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Palladio tetrakis(trifenilfosfina)
PL	Photoluminescence (Spectroscopy)
PLED	Polymer Light-Emitting Diodes
PM	Peso Molecolare
PMMA	Polymetacrylic acid
PNIPAAm	Poly- <i>N</i> -isopropilacrilamide
POM	Polarized Optical Microscopy
P.O.	Pigment Orange
P.R.	Pigment Red
P.Y.	Pigment Yellow
Py	Piridina
ROS	Reactive Oxygen Species
SANS	Small Angle Neutron Scattering
SEC	Size Exclusion Chromatography
sECM	Synthetic Extra-Cellular Matrix
SEM	Scanning Electron Microscopy
SLCP	Self-assembled side-chain Liquid Crystalline Polymers
SP	Supramolecular Polymer
STM	Scanning Tunneling Microscopy
<i>t</i> -Boc	Di- <i>terz</i> -butil dicarbonato
TBAHS	Tetrabuttilammonio Idrogenosolfato
TBuAOH	Tetrabuttilammonio Idrossido
TGA	Thermogravimetric Analysis
THF	Tetraidrofurano
TIPB	Triisopropil borato
UPy	Ureido-pirimidinone

UV	Ultravioletto
Vis	Visibile
VPO	Vapor Pressure Osmometry
$\epsilon$	Coefficiente di estinzione molare
$\lambda_{\max}$	Lunghezza d'onda massima (di assorbimento o emissione)

### Abbreviazioni di composti sintetizzati

DPP-Boc	Di- <i>terz</i> -butil 1,4-diosso-3,6-difenilpirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-2,5(1 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dicarbossilato
DPP-mono-Boc	<i>Terz</i> -butil 1,4-diosso-3,6-bifenil-4,5-diidropirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-2(1 <i>H</i> )-carbossilato
Fenil-DPP	3,6-di(bifenil-4-il)pirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-1,4(2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-dione
<i>Longchains</i> -DPP	3,6-bis(3',4',5'-tri(dodecilossi)bifenil-4-il)pirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-1,4(2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-dione
<i>Longchains</i> -DPP-Boc	Di- <i>terz</i> -butil 1,4-diosso-3,6-bis(3',4',5'-tri(dodecilossi)bifenil-4-il)pirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-2,5(1 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dicarbossilato
Mono-Br-DPP	3-(4-bromfenil)-6-fenilpirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-1,4(2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-dione
Mono-Br-DPP-Boc	Di- <i>terz</i> -butil 3-(4-bromfenil)-1,4-diosso-6-fenilpirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-2,5(1 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dicarbossilato
Mono- <i>longchains</i> -DPP	3-fenil-6-(3',4',5'-tris(dodecilossi)bifenil-4-il)pirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-1,4(2 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-dione
Mono- <i>longchains</i> -DPP-Boc	Di- <i>terz</i> -butil 1,4-diosso-3-fenil-6-(3',4',5'-tris(dodecilossi)bifenil-4-yl)pirrolo[3,4- <i>c</i> ]pirrolo-2,5(1 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dicarbossilato

**1. NUOVI DPP-DERIVATI TRAMITE  
SUZUKI-MIYaura CROSS-COUPling**





## 1.1. Introduzione

Quando si parla di pigmenti ci si riferisce necessariamente al colore che caratterizza questa tipologia di composti. Il colore, secondo una definizione prettamente scientifica, è la percezione visiva generata dai segnali nervosi che i fotorecettori presenti sulla retina dell'occhio inviano al cervello quando assorbono radiazioni elettromagnetiche di determinate lunghezze d'onda e intensità. Prima di effettuare un breve *excursus* sull'impiego dei pigmenti nella storia dell'arte è d'obbligo chiarire un concetto fondamentale, ovvero la differenza tra pigmenti e coloranti.

I pigmenti sono composti colorati, di natura organica o inorganica, insolubili nel legante in cui vengono dispersi, e con indice di rifrazione diverso da esso. Se un pigmento avesse infatti lo stesso indice di rifrazione del legante non si avrebbe il fenomeno di dispersione della luce ed il sistema risulterebbe perfettamente trasparente, per nulla coprente. I coloranti sono invece sostanze di origine organica, generalmente solubili, che conferiscono il colore a determinati substrati. Vengono applicati da soluzione e si legano in maniera stabile con le sostanze da colorare, di solito fibre tessili o materie plastiche, grazie a veri e propri legami chimici. Un pigmento è più stabile di un colorante, in quanto le particelle di colorante sono solvate, e vengono perciò attaccate più facilmente da agenti atmosferici come l'ossigeno dell'aria o la radiazione solare.<sup>1</sup>

I pigmenti naturali fanno il loro ingresso nella storia dell'arte già con la pittura parietale antica (nel Paleolitico), e sono per lo più costituiti da ossidi di ferro e manganese, che originano rispettivamente il rosso e il nero.<sup>2</sup> Nelle pitture parietali egiziane, conservatesi perché collocate quasi sempre al riparo da agenti atmosferici e grazie ad un clima estremamente asciutto, si riscontra invece un'ampia gamma di colori: nero, azzurro, rosso, verde, giallo e bianco. Plinio, riguardo la pittura greca in generale, afferma che questa si affidasse a quattro colori: bianco (terra di *Melos*), giallo (ocra attica), rosso (*sinopis pontica*) e nero (nerofumo).<sup>3</sup> Con le pitture tombali etrusche l'intervallo coloristico si allarga fino a comprendere bianco, giallo, rosa, varie tonalità di rosso, azzurro, verde e nero.<sup>2</sup> È però in epoca romana che si ha, come testimoniato da Vitruvio nel *De Architectura* e da Plinio nel *Naturalis Historia*, un vasto incremento della gamma di pigmenti utilizzati,<sup>4</sup> distinti in *colores floridi* e *colores austeri*, a seconda del loro grado di coprenza. Per quel che riguarda invece i pigmenti utilizzati fino al XIV sec. principalmente per la pittura su tela o tavola, un elenco esaustivo si può trarre dalle ricette cenniniane. Pigmenti di origine naturale, vegetale o animale sono stati impiegati fino al XVIII sec., quando sono stati introdotti i primi pigmenti minerali di sintesi. I pigmenti organici di sintesi invece hanno fatto il loro ingresso nel corso del XX sec., e verranno trattati nel paragrafo 1.1.1.

La “materia” dell'opera d'arte è sempre strettamente correlata al concetto di “restauro”. Premesso che requisito fondamentale per affrontare correttamente un intervento di restauro è la conoscenza dello stato di fatto del manufatto artistico, nonché la massima comprensione delle vicissitudini che l'opera ha subito, la determinazione della natura dei pigmenti utilizzati per la sua realizzazione diventa utile, se non indispensabile, per poter intervenire rispettando uno dei requisiti più dibattuti nel campo della conservazione e del restauro, ovvero la riconoscibilità dell'intervento. Se così non fosse, le parti aggiunte

potrebbero essere assimilate a quelle originali favorendo un'errata lettura artistica dell'opera. È inoltre assolutamente preferibile che l'integrazione sia reversibile, ovvero asportabile senza arrecare alcun danno ai materiali originali costituenti l'opera. Pigmenti sia naturali che di sintesi vengono attualmente impiegati nel restauro di opere d'arte per ricostituire con l'integrazione pittorica l'"unità potenziale" dell'opera d'arte definita da Brandi,<sup>5</sup> unità che ne permette una corretta lettura e fruizione da parte del pubblico, ma che non deve essere riacquisita compiendo un falso artistico o storico. La reintegrazione deve dunque ricostruire il "tessuto figurativo" ristabilendo un collegamento formale e/o cromatico fra le parti di un'opera interrotte da una lacuna, senza attuare una ricostruzione di fantasia della parte mancante.

In anni recenti si è delineata una nuova problematica nel mondo del restauro, ovvero la reintegrazione e il consolidamento di opere d'arte contemporanea. Mentre per manufatti artistici realizzati fino ai primi del '900 esistono materiali e tecniche d'intervento ormai consolidate, descritte in numerosi trattati storico-artistici, per opere d'arte più recenti s'incontrano maggiori difficoltà. Spesso infatti non esistono prodotti e materiali specifici per intervenire rispettando le condizioni prima affrontate, in *primis* riconoscibilità, compatibilità e reversibilità. Lo studio e lo sviluppo di nuovi materiali diventa allora un ambito che bisogna necessariamente esplorare per garantire la corretta conservazione dei manufatti, a noi contemporanei, per le generazioni future.



**Figura 1.1:** Tomba della regina Nefertari (1255 a.C.) e "Autumn Rhythm" di J. Pollock (1950 d.C.).

### 1.1.1. I pigmenti organici e gli *High Performance Pigments* (HPP)

#### a) *Proprietà chimiche*<sup>1</sup>

I pigmenti organici, a differenza di quelli inorganici, presentano un potere colorante e coprente decisamente migliore e tonalità estremamente brillanti e pulite. Le molecole dei pigmenti organici sono generalmente caratterizzate da sistemi coniugati planari cromofori, in cui si trovano ad esempio gruppi funzionali carbonilici ed amminici. Le proprietà e la resistenza del colore sono significativamente influenzate dalle caratteristiche del pigmento allo stato solido (cristallinità, dimensione delle particelle e stato di aggregazione).

Per le loro caratteristiche strutturali, le molecole di pigmento tendono generalmente ad assemblarsi in strutture cristalline molto ordinate. Le principali *driving force* del processo di formazione dei cristalli sono i legami ad idrogeno intra- ed inter- molecolari, le interazioni di *stacking*  $\pi$ - $\pi$  tra molecole planari adiacenti e le interazioni elettrostatiche deboli di van der Waals. L'effetto complessivo delle interazioni qui menzionate porta generalmente alla stabilizzazione del reticolo cristallino attraverso l'abbassamento di energia del sistema. Molti pigmenti organici sono polimorfici: un polimorfo si ha quando molecole aventi stessa costituzione chimica possono arrangiarsi nel reticolo cristallino in vari modi, originando cristalli strutturati in maniera differente. Ciascun polimorfo presenterà una colorazione particolare caratteristica.

I pigmenti organici devono il loro colore alla presenza di particolari funzioni organiche chiamate “gruppi cromofori” (portatori di colore), che possiedono doppi o tripli legami tra atomi di C, N, S e O. Sono gruppi cromofori particolari i sostituenti vinile, fenile, etinile e alcuni gruppi funzionali (carbonile, ossidrile, ammino, azo, nitrile, nitro e immino). Le molecole che contengono gruppi cromofori vengono dette cromogene, ma sono in genere solo debolmente colorate. L'intensificazione del colore si ottiene grazie all'aggiunta di gruppi auxocromi che rinforzano notevolmente l'azione del gruppo cromoforo e determinano sia un aumento d'intensità del colore, sia un “abbassamento” del tono. La presenza di sostituenti in particolari posizioni molecolari è poi responsabile di spostamenti ipsocromici o batocromici nell'assorbimento della radiazione elettromagnetica visibile, che influenzano direttamente la tonalità del pigmento.

#### b) *Storia e classificazione*<sup>1,6</sup>

Il mondo dei pigmenti organici si è sviluppato grazie a due eventi primari: la scoperta del primo colorante all'anilina nel 1856 da parte del diciottenne William Perkin mentre tentava di sintetizzare un farmaco antimalarico, seguita due anni dopo dalla scoperta della reazione di diazotazione di ammine aromatiche ad opera di Peter Griess, sfruttata per rilevare la presenza di nitriti organici. I primi colori di natura completamente sintetica, introdotti sul mercato alla fine del XIX sec., sono stati gli azo-composti (in prevalenza coloranti), con i derivati del  $\beta$ -naftolo come copulanti per la reazione di *coupling* (P.R. 1-3, P.O. 5). Altri ancora, strutturati in maniera simile agli azo-composti, ottenuti dalla precipitazione di azo-coloranti adeguatamente funzionalizzati con formazione di sali, come il P.R. 53 o il P.R. 57,

hanno segnato l'inizio dell'era dei pigmenti organici. Nel 1896 furono scoperti i chinacridoni, che però si affermarono come pigmenti solo dal 1935. In seguito, la sostituzione del naftolo con l'acetarilamide nella reazione di *coupling* ha portato ai primi azo-pigmenti gialli (come il P.Y. 1). Gli azo-pigmenti hanno prevalso nell'industria dei pigmenti organici fino alla comparsa della ftalocianine di rame, nel 1935. Da allora sono state scoperte moltissime strutture organiche, principalmente costituite da cromofori eterociclici, introdotte nel commercio come pigmenti organici.<sup>6a</sup>

I pigmenti organici vengono identificati secondo il loro nome generico, da cui si può trarne la costituzione chimica, o tramite il *Colour Index* (C.I.), standard sviluppato dalla *Society of Dyers and Colourist* del Regno Unito e dall'*American Association of Textile Chemists and Colourists*. Sulla base della diversità di struttura chimica e prestazioni tecniche, i pigmenti organici vengono convenzionalmente classificati in "pigmenti classici" da un lato, e *High Performance Pigments* (**HPP**) dall'altro (vedi Tab. 1.1), classe trattata nel presente lavoro di tesi. Rispetto ai "pigmenti classici" gli **HPP** hanno origine più recente e ottime proprietà di resistenza; presentano una manifattura più costosa e vengono usati in applicazioni molto specializzate, in cui è richiesta una resistenza eccezionale alla luce, alle condizioni climatiche e al calore.<sup>1</sup>

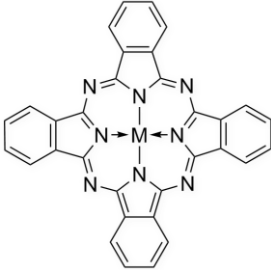
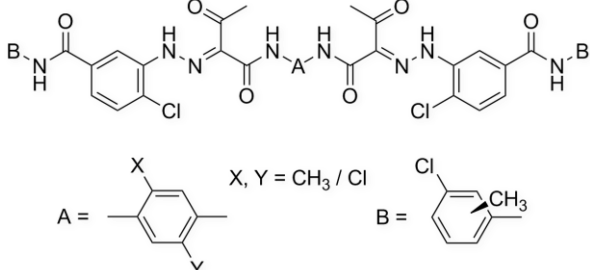
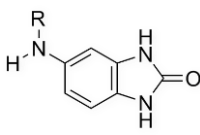
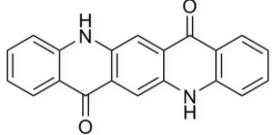
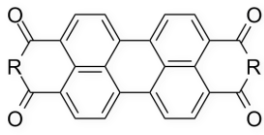
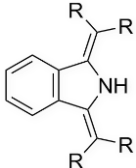
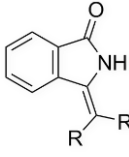
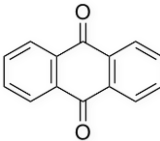
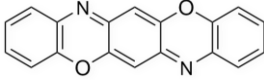
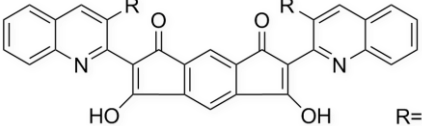
<p>(A) Ftalocianine</p> 	<p>(B) Pigmenti di diazocondensazione</p>  <p>X, Y = CH<sub>3</sub> / Cl</p>	
<p>(C) Benzimidazoloni</p> 	<p>(D) Chinacridoni</p> 	<p>(E) Perileni</p> 
<p>(F) Isoindoline</p> 	<p>(G) Isoindolinoni</p> 	<p>(H) Antrachinoni</p> 
<p>(I) Diossazine</p> 	<p>(J) Chinoftaloni</p>  <p>R = H, OH</p>	

Tabella 1.1: Strutture chimiche di base di alcuni High Performance Pigments.

Le ftalocianine (Tab. 1.1 A), “pigmenti classici” per eccellenza, vengono incluse nella categoria degli **HPP** dal momento che dimostrano ottime forza colorante e durabilità, nonché una resistenza alla luce e agli agenti atmosferici superiori a tutte le altre classi di pigmenti organici.<sup>6a</sup> Le ftalocianine sono costituite da un sistema macrociclico coniugato di elettroni  $\pi$  con uno ione metallico in posizione centrale: la natura dello ione determina la tonalità specifica della ftalocianina, che può andare da un blu intenso ad un tenue verde-giallo.

Gli **HPP** possono venir classificati in due classi chimiche significative: (1) azo-pigmenti e (2) pigmenti policiclici o eterociclici. Gli azo-pigmenti più importanti sono rappresentati dai prodotti di diazocondensazione gialli e rossi (Tab. 1.1 B), dai sali azometallici gialli e dai pigmenti dal giallo al rosso basati sul benzimidazolone (Tab 1.1 C). I più importanti pigmenti eterociclici sono i chinacridoni (vedi Tab. 1.1 D), i perileni (vedi Tab. 1.1 E), ed i recentissimi dichetopirrolopirroli, le cui natura e sintesi verranno discusse ampiamente nel prossimo paragrafo. Particolare attenzione meritano i chinacridoni (Tab. 1.1 D), che presentano il fenomeno già descritto del polimorfismo: i tre anelli aromatici della molecola di partenza, non cristallizzata, sono infatti debolmente coniugati tra loro e originano un tenue colore giallo. La colorazione finale, che varia dal giallo al viola, è data dalla modalità con cui le molecole cristallizzano (esistono tre fasi cristalline principali,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), ovvero dalla tipologia di ponti a idrogeno che si formano (vedi figura 1.2).

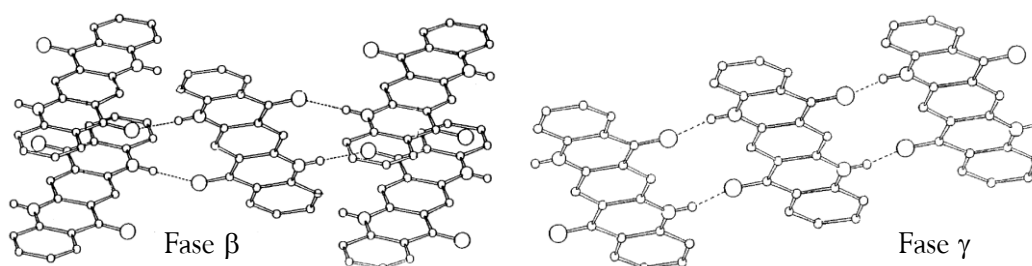


Figura 1.2: Strutture a raggi X delle fasi cristalline  $\beta$  e  $\gamma$  del chinacridone.

Altri pigmenti organici importanti sono i perileni (Tab. 1.1 E), costituiti da anelli aromatici condensati: sono molto stabili e resistono bene a luce e agenti atmosferici. La natura del colore varia a seconda della natura/posizione del sostituito X presente nel gruppo funzionale R, che può essere ad esempio:  $\text{CH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{Ph}$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ . Altri **HPP** che meritano di essere menzionati sono gli isoindolinoni e le isoindoline, gli antrachinoni, le diossazine e i chinofaloni (vedi Tab. 1.1).

### c) Utilizzo e diffusione<sup>1,6a</sup>

I pigmenti commerciali devono soddisfare molti criteri prestazionali, che sono determinati dallo stato solido e molecolare del pigmento stesso, nonché dalle caratteristiche della superficie particellare. Tra le proprietà commerciali rilevanti si ricorda la stabilità al calore, dipendente principalmente dall'energia del reticolo cristallino del pigmento, determinata dalle interazioni elettroniche, atomiche e molecolari esistenti nel reticolo stesso.

Negli ultimi decenni l'utilizzo di pigmenti organici ha subito una rapida crescita, fino a diventare un mercato con potenzialità commerciali rilevanti. Attualmente i pigmenti

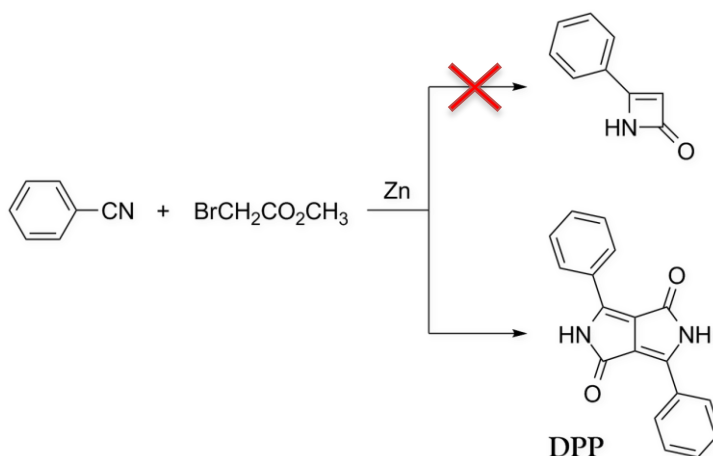
organici sono utilizzati in moltissimi settori industriali e di consumo: nella colorazione di plastiche e fibre sintetiche, nella verniciatura di veicoli e macchine industriali, nel rivestimento di superfici come pitture, nella fabbricazione di inchiostri per la stampa. I pigmenti organici vengono impiegati per soddisfare richieste estetiche, si pensi al mondo dell'arte o della moda, ma anche per rispondere a reali necessità di comunicazione, per differenziare o identificare qualcosa (come rivestimenti di cablature, condotte del gas ed altro). Nel 2011 la produzione globale di *high performance pigments* è stata stimata attorno a 144°000 tonnellate, con un valore monetario di mercato pari a 2770 milioni di euro, e stime recenti hanno previsto un incremento costante fino al 2017, raggiungendo i 3235 milioni di euro.<sup>7</sup>

### 1.1.2. Il dichetopirrolopirrolo e le sue sintesi

#### a) Storia del DPP<sup>1,6a</sup>

Nella quotidianità il colore rosso si ritrova in tutti quegli oggetti che necessitano di un'immediata visibilità, per agire velocemente in situazioni d'emergenza o di pericolo: si pensi ad esempio ai cartelli stradali, agli estintori o alle postazioni delle cassette di sicurezza. Oggi i pigmenti rossi impiegati nella maggior parte delle formulazioni pittoriche appartengono alla classe dei dichetopirrolopirroli, e il "rosso Ferrari" (P.R. 254) ne rappresenta il più comune. Nel presente lavoro di tesi la sigla **DPP** identifica tale dichetopirrolopirrolo, il cui nome esaustivo è 3,6-difenil-1,4-dicheto-pirrolo[3,4-c]pirrolo.

La prima sintesi di un composto avente l'unità cromofora del **DPP** risale al 1974: il tentativo di sintetizzare il 2-azetione (4-fenilazet-2(1H)-one) ha condotto al diaril-derivato del dichetopirrolopirrolo con una resa del 5-20%, in aggiunta ad altri prodotti (schema 1.1).<sup>8</sup> Le proprietà fisiche del **DPP**, come l'elevato punto di fusione (>350 °C), l'alta insolubilità ed il colore rosso, rimasero sconosciute fino a quando i ricercatori della *Ciba-Geigy Specialty Chemicals Co.* ne svilupparono la chimica, considerando le analogie strutturali del **DPP** con altri pigmenti commercialmente conosciuti.



Schema 1.1: Tentativo di sintesi del 2-azetione.

Il primo **DPP** è stato commercializzato nel 1986. Da allora sono stati sviluppati altri pigmenti appartenenti alla famiglia del **DPP**, poi introdotti nel mercato per applicazioni convenzionali, ovvero in colori, plastiche, fibre e inchiostri. I **DPP** attuali coprono un intervallo coloristico che va dall'arancio al rosso azzurrognolo, con dimensioni particellari che permettono colorazioni opache o trasparenti, e con specifiche forme e modificazioni di superficie per inchiostri, pitture, plastiche e fibre.

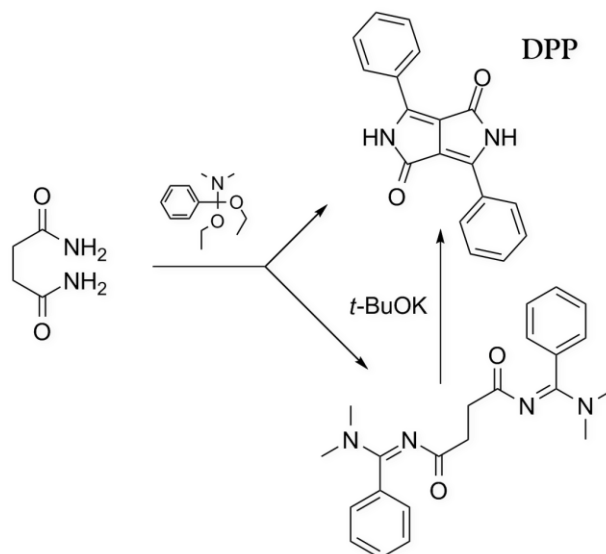
#### b) Sintesi del DPP<sup>1,6a,8,9</sup>

##### Sintesi attraverso succindiammide

Una delle prime sintesi, descritta da Closs e Gompper nel 1987,<sup>10</sup> vede la reazione di succindiammide con un diacetale *N,N'*-dimetilbenzammide-dieterilico (vedi schema 1.2). La



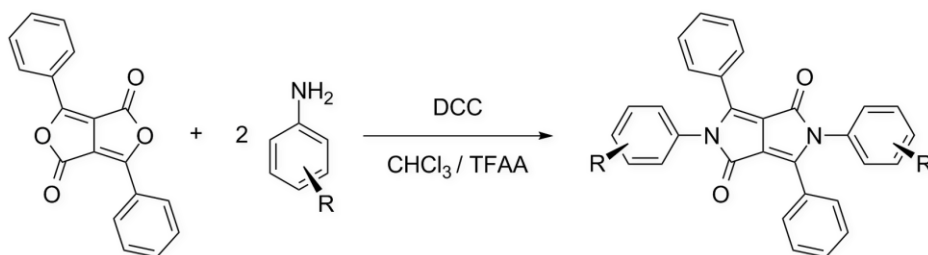
reazione procede fornendo **DPP** con una resa del 30%, ma la succinilbenzamidina può essere isolata dalla miscela di reazione ed esser quindi convertita in **DPP** con resa pressoché quantitativa reagendo con *t*-BuOK in THF. In tal modo si raggiunge una resa globale pari al 60%.



Schema 1.2: Sintesi del **DPP** attraverso succindiammide.

### Sintesi mista

Una strategia differente, proposta dal gruppo di ricerca di Langhals,<sup>11</sup> prevede la condensazione del dichetofurfurano con un'ammina aromatica (come l'anilina) in presenza di dicicloesilcarbodiimmide in acido trifluoroacetico (vedi schema 1.3). L'isolamento del tetrafenil-**DPP** avviene con una resa variabile tra il 35% e il 56% a seconda della natura del gruppo R legato all'anello aromatico dell'ammina (ad esempio H, 4-Me, 2,3-Me<sub>2</sub>, 4-*t*-Bu). Questa metodologia permette di ottenere inoltre l'unico esempio conosciuto di *N,N'*-diaril-**DPP** sostituito asimmetricamente, anche se con resa bassissima (0.3%).<sup>9</sup>

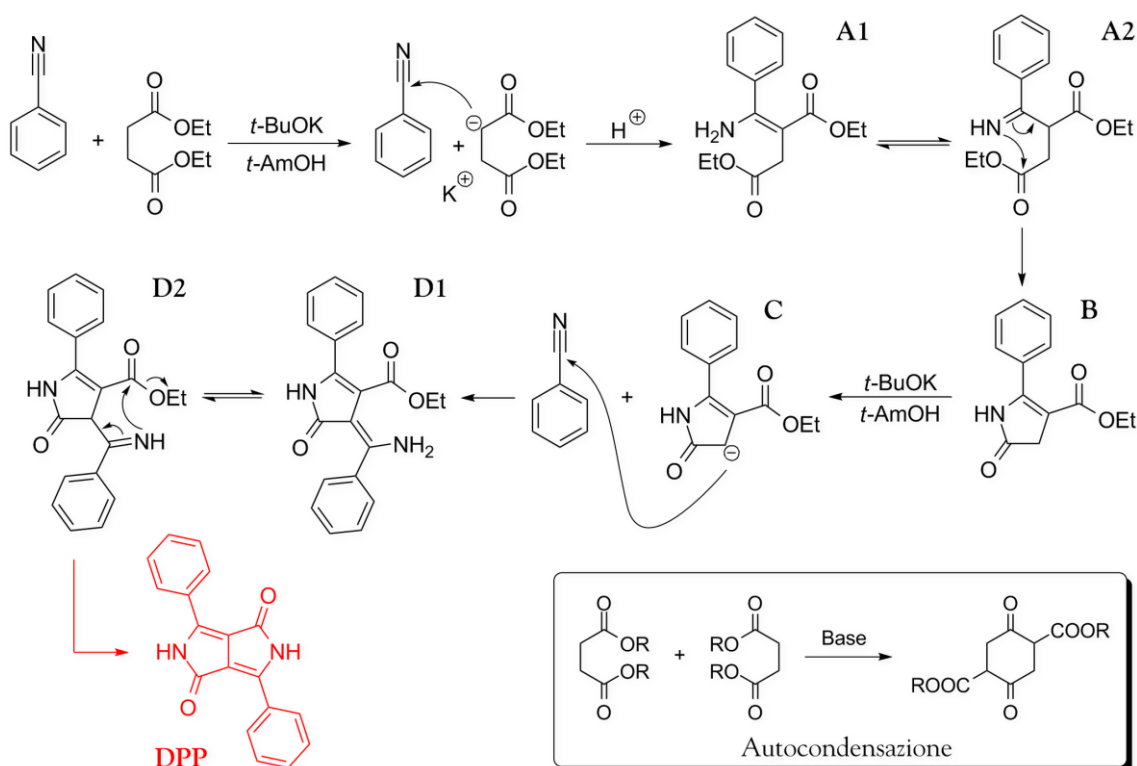


Schema 1.3: Sintesi mista di un diaril-**DPP**.

### Sintesi industriale

I ricercatori della *Ciba-Geigy*, per ottenere il **DPP** con buona resa, hanno proposto tra il 1983 e il 1986 una strada alternativa alla reazione di Reformatsky precedentemente descritta (schema 1.1), partendo da reagenti poco costosi quali benzonitrile e dietil-succinato. Questo viene condensato tramite una condensazione pseudo-Stobbe con il benzonitrile in

presenza di una base forte (tipo *t*-BuOK) e di un solvente protico (tipo *t*-AmOH).<sup>1</sup> Si ritiene che l'unità del **DPP** si formi dall'estere come illustrato nello schema 1.4. Per evitare che l'estere proceda con un'autocondensazione, riducendo notevolmente la resa della reazione, e per minimizzare la formazione di prodotti non voluti, si sono ricercate le condizioni ottimali per la condensazione con il benzonitrile. La velocità di auto-condensazione dell'estere succinico diminuisce all'aumentare dell'ingombro sterico del sostituente alchilico secondo la seguente scala: Me > Et > *i*-Pr > *t*-Bu > *t*-Am. Pertanto i migliori risultati in termini di resa si ottengono impiegando *t*-amil succinato anziché dietil-succinato. Inoltre l'auto-condensazione è un processo bimolecolare, la cui velocità dipende dal quadrato della concentrazione dell'estere. Bisogna perciò mantenere quanto più bassa possibile la concentrazione dell'estere, aggiungendolo molto lentamente dopo il nitrile aromatico.



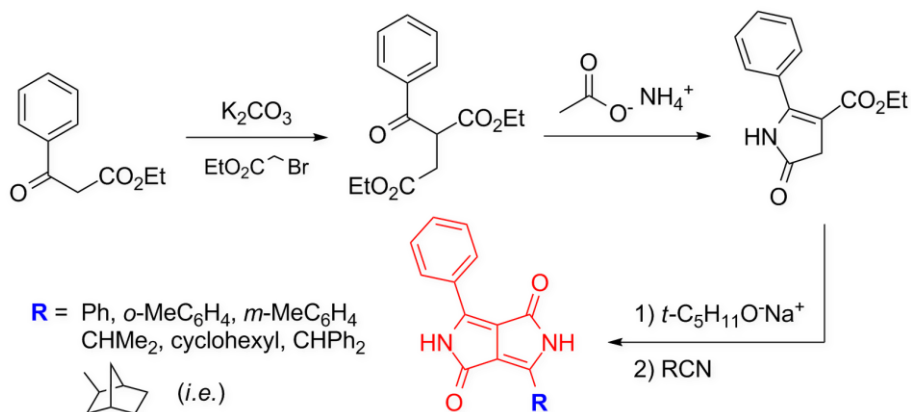
Schema 1.4: Sintesi del **DPP** attraverso l'estere succinico e autocondensazione dell'alchil-succinato.

L'estere deprotonato reagisce con il primo equivalente di benzonitrile, originando l'enammina **A1** in equilibrio tautomerico con l'immina **A2**; la ciclizzazione porta a sua volta all'intermedio **B**, un estere pirrolin-carbossilico. Questo viene deprotonato dal *terz*-amilato di potassio e reagisce con il secondo equivalente di benzonitrile per dare **D1**, in equilibrio tautomerico con **D2**. La seconda ciclizzazione porta infine alla formazione del **DPP**, con una resa media attorno al 50%.<sup>9</sup>

### Sintesi a stadi

Una sintesi del **DPP** a stadi, in grado di generare strutture molecolari asimmetriche, fu introdotta inizialmente dal gruppo di ricerca di Iqbal,<sup>12</sup> e venne ripresa e studiata più

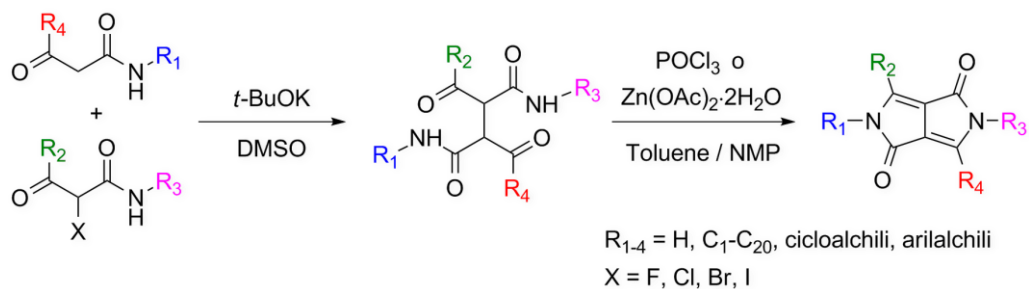
approfonditamente da Morton.<sup>13</sup> Il pigmento in questo caso si ottiene partendo dalla sintesi del dietil-2-benzoilsuccinato, attraverso ripetuta sostituzione nucleofila dell'etil-benzoilacetato con l'estere bromoacetico (vedi schema 1.5). La ciclizzazione con chiusura d'anello viene effettuata con acetato d'ammonio in acido acetico. Infine l'estere reagisce con il nitrile desiderato per produrre **DPP**-derivati in cui uno dei sostituenti in posizione 3- e 6- è il fenile, mentre l'altro può variare.



Schema 1.5: Sintesi a stadi per l'ottenimento di un **DPP** asimmetrico.

#### Sintesi asimmetrica con $\beta$ -chetoammide

Nel 2002 la *SUN Chemical Corporation* ha brevettato una sintesi innovativa per ottenere **DPP** asimmetrici *N*-sostituiti<sup>14</sup> (vedi schema 1.6). Partendo da una coppia di  $\beta$ -chetoammidi, di cui una alogenata, aventi sostituenti  $R_1$ - $R_4$  indipendenti tra loro, si può ottenere una succinammide che in presenza di un acido di Lewis o HCl ciclizza originando il **DPP** desiderato. Il principale vantaggio di tale approccio risiede nell'ampia varietà di **DPP** simmetrici o asimmetrici che si possono sviluppare.



Schema 1.6: Sintesi asimmetrica con  $\beta$ -chetoammide.

#### c) Applicazioni

Come già accennato nel Par. 1.1.2. a, alla fine degli anni '80 i derivati del **DPP** furono introdotti sul mercato per applicazioni convenzionali, ovvero in colori, plastiche, fibre e inchiostri. In anni recenti è cresciuto invece l'interesse del **DPP** per applicazioni non convenzionali (materiali *high-tech*), parallelamente al deposito di numerosi brevetti,<sup>9</sup> come si

può osservare dalla crescita pressoché esponenziale delle pubblicazioni scientifiche (fig. 1.3), che ha raggiunto un apice pari a 111 articoli nel corso del 2012.

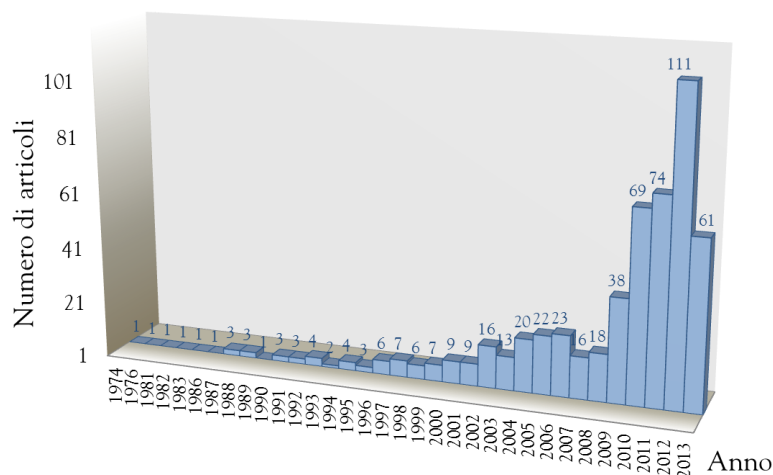


Figura 1.3: Andamento delle pubblicazioni inerenti il DPP dal 1974 ad oggi.

### OPV e DSSC

Negli ultimi cinque anni l'interesse scientifico per lo sviluppo di nuove strutture basate sul DPP ha ricevuto un notevole impulso, rivolgendosi sempre più alle sue proprietà ottiche ed elettroniche.<sup>15</sup> Le applicazioni studiate sono state molteplici, e hanno trovato un ampio riscontro specialmente nel settore delle energie rinnovabili, ovvero nel campo del fotovoltaico organico (OPV)<sup>16</sup> e nei dispositivi per celle solari (DSSC).<sup>17</sup> Materiali OPV (fig. 1.4) abbinano alla produzione di energia altre caratteristiche interessanti, quali peso contenuto e flessibilità, che li rendono dispositivi ideali per le nuove tecnologie (telefonia mobile, notebook, palmari, etc.).

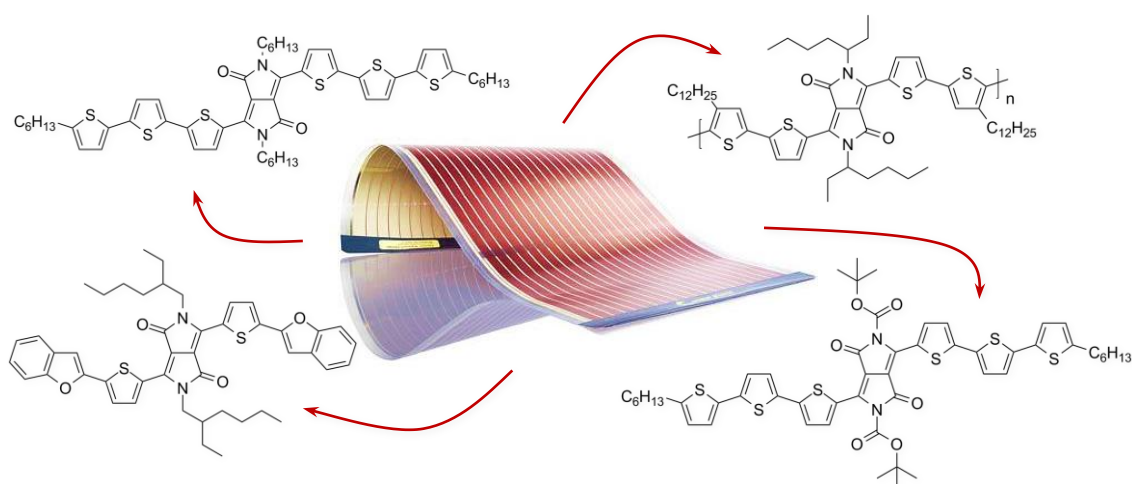


Figura 1.4: Alcune strutture molecolari di DPP-derivati utilizzati nelle OPV.

Derivati del DPP vengono utilizzati come sensibilizzatori nelle celle fotovoltaiche ibride di tipo Grätzel, sistemi costituiti da un colorante adsorbito su una matrice di TiO<sub>2</sub>

mesoporoso, immerso in una soluzione elettrolitica di  $I_2/KI$ . Sistemi di questo tipo offrono un rendimento pari al 12.3%,<sup>18</sup> quasi confrontabile con i sistemi in silicio che operano al 15-20%.<sup>19</sup> Per garantire longevità alla cella è necessario usare coloranti caratterizzati da un'elevata stabilità chimica e da uno spettro di assorbimento quanto più ampio possibile, specifiche possedute dal **DPP**. In figura 1.5 vengono rappresentate alcune modifiche strutturali al **DPP** atte a trasformarlo in un colorante sensibilizzatore.<sup>16c</sup>

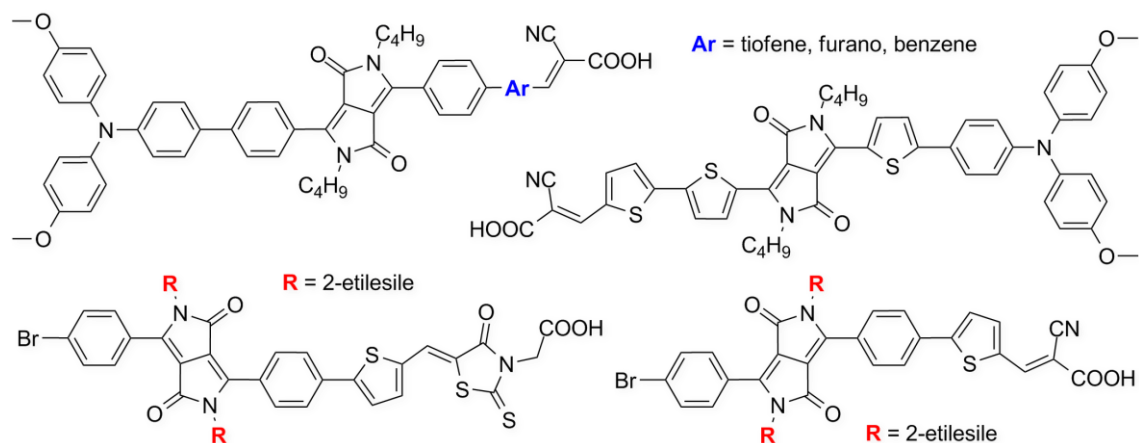


Figura 1.5: Esempi di strutture molecolari derivate dal DPP utilizzate nelle DSSC.

#### OFET, PLED, NIR e chemosensori

La struttura del **DPP** è stata inoltre impiegata nei *transistor* organici (**OFET**),<sup>20</sup> nei laser allo stato solido,<sup>21</sup> nei diodi polimerici ad emissione di luce (**PLED**),<sup>17d,22</sup> o ancora come sensore chimico<sup>23</sup> per la rilevazione di amminoacidi come la cisteina (fig. 1.7) o *probe* nella spettroscopia **NIR** (*near infrared spectroscopy*).<sup>24</sup> In quest'ultimo caso molecole derivate dal **DPP** vengono applicate in campo biomedico, fungendo da vere e proprie sonde molecolari fluorescenti utili per studi *in vivo* (fig. 1.6), dal momento che la radiazione utilizzata è in grado di penetrare gli strati epidermici.<sup>24a,b,d</sup> La **NIR** richiede infatti un struttura molecolare con un elevato coefficiente di estinzione molare, una buona resa quantica, stabile alla luce e, fattore non trascurabile, a bassa tossicità.

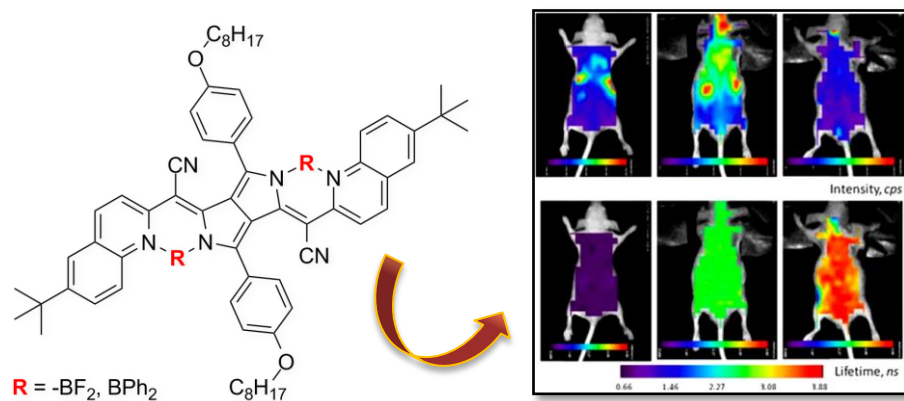


Figura 1.6: Struttura di un DPP-derivato adatto per applicazioni NIR e test *in vivo*.

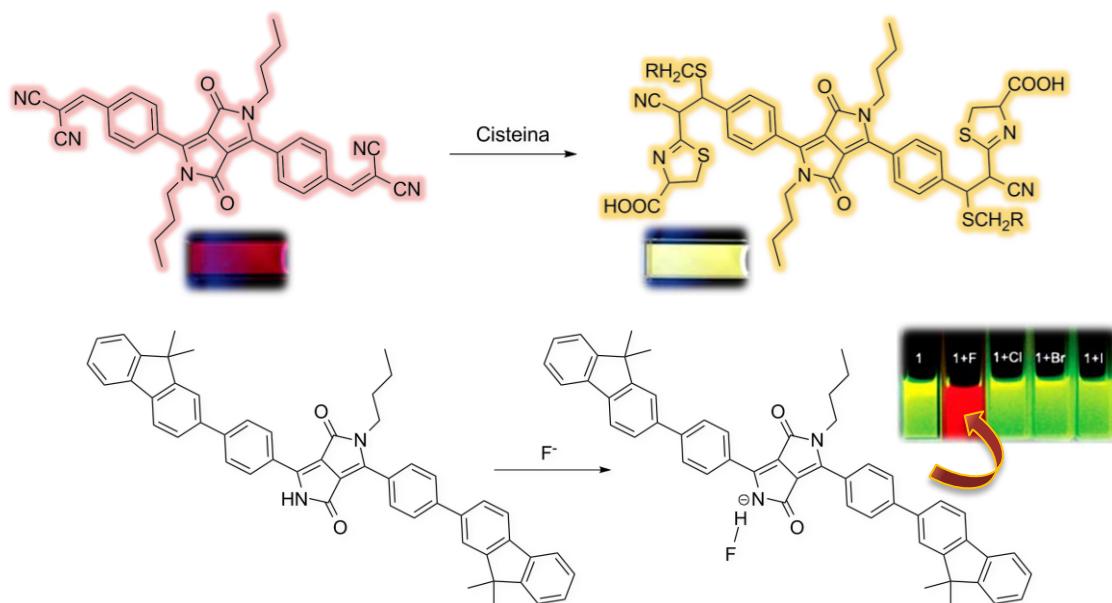


Figura 1.7: Derivati del DPP utilizzati come sensori chimici selettivi (per tioli e fluoruro).<sup>23b,e</sup>

### 1.1.3. Proprietà chimico-fisiche del DPP

Il **DPP** è costituito da un sistema biciclico con otto elettroni  $\pi$  e due unità lattamiche. Le principali caratteristiche fisiche del **DPP** sono l'alto punto di fusione ( $>350$  °C), la bassa solubilità ( $\sim 1.7$  mg/L in DMF a 25 °C)<sup>25</sup> e un assorbimento nella regione del visibile con un coefficiente di estinzione molare pari a 33000 ( $\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ).

Il **DPP** quando disciolto genera soluzioni fluorescenti di color giallo-verde,<sup>26</sup> mentre allo stato solido è di colore rosso vivo. È stata realizzata un'ampia varietà di pigmenti **DPP**-derivati caratterizzati da diverse tonalità, che vanno dal giallo al blu violetto, semplicemente cambiando i sostituenti nelle posizioni *m*- e *p*- degli anelli fenilici dell'unità cromofora. Il livello di resistenza alla luce ed alle condizioni ambientali di tali pigmenti è generalmente ottimo, e ciò li rende molto adatti per rivestimenti automobilistici e industriali. Sono state sintetizzate varie tipologie di **DPP** *N*-alchilati, confrontandone le diverse solubilità.<sup>9</sup> Si è così visto che una semplice di-metilazione incrementa la solubilità del **DPP** in cloroformio di sette ordini di grandezza. La solubilità dei **DPP** di-alchilati è generalmente maggiore rispetto a quelli mono-alchilati; inoltre, più lunga è la catena alchilica, più la solubilità del **DPP** mono-alchilato diventa simile a quella del **DPP** di-alchilato. Anche la solubilità in solventi apolari (esano, toluene) o in solventi poco polari aumenta all'aumentare della lunghezza della catena alchilica.

#### a) Proprietà spettrali

Di seguito vengono riportati gli spettri di assorbimento del **DPP** in soluzione (NMP) e allo stato solido (di un film evaporato).<sup>9</sup>

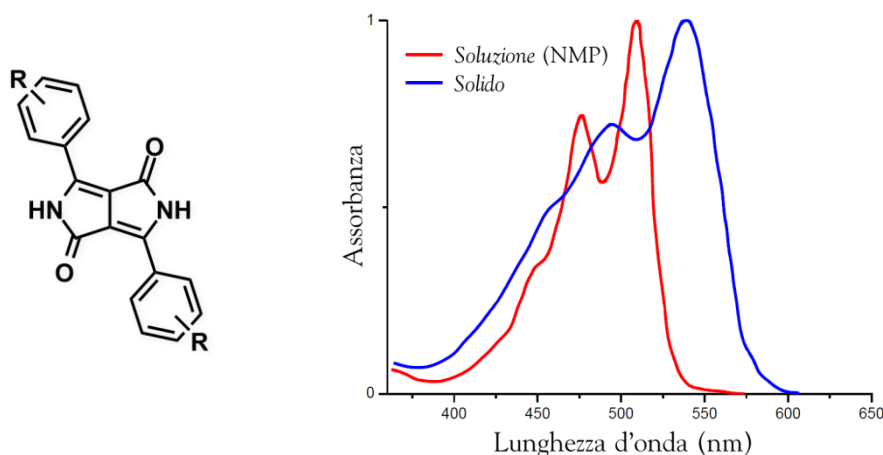


Figura 1.8: Spettri di assorbimento del **DPP** in soluzione (NMP) e allo stato solido.

Come molte altre classi di pigmenti, tutti i pigmenti appartenenti alla famiglia del **DPP** mostrano uno spostamento batocromo del massimo di assorbimento allo stato solido rispetto all'assorbimento massimo in soluzione, dovuto al maggior grado di coniugazione tra molecole. Nel caso del **DPP** è però interessante che il massimo d'assorbimento allo stato solido dipenda fortemente dalla natura e dalla posizione dei sostituenti presenti, perché

direttamente influenzato dall'entità delle interazioni intermolecolari (legami a idrogeno, interazioni di *stacking*  $\pi$ - $\pi$  e di van der Waals) che si vengono a creare (vedi tabella 1.2).

R	Tonalità <sup>a</sup>	$\lambda_{\max}$ (nm)		$\Delta\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$ <sup>c</sup>
		Soluzione <sup>b</sup>	Stato solido		
<i>m</i> -CF <sub>3</sub>	Arancione-giallo	509	518	9	21500
<i>m</i> -Cl	Arancione	512	528	16	27000
H	Giallo-rosso	504	538	34	33000
<i>p</i> -Br	Blu-rosso	515	555	40	35000
<i>p</i> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Viola-blu	554	603	51	81500

Tabella 1.2: Influenza dei sostituenti su tonalità e  $\lambda_{\max}$  del diaril-DPP.<sup>27</sup>

- a) In PVC elasticizzato pigmentato, con il 0.2% di DPP-derivato.  
 b) Misurato in NMP.  
 c) Alla  $\lambda_{\max}$  in soluzione.

### b) Fluorescenza

Come altre classi di pigmenti, anche i pigmenti DPP-derivati danno origine, come già detto, a soluzioni fluorescenti. Gli *Stokes shift* (differenza di lunghezza d'onda tra emissione ed assorbimento massimi) sono compresi tra 10 e 15 nm e la resa quantitativa di fluorescenza è del 60% circa. Mediante una *N*-sostituzione, sia la solubilità che gli *Stokes shift* possono essere aumentati.

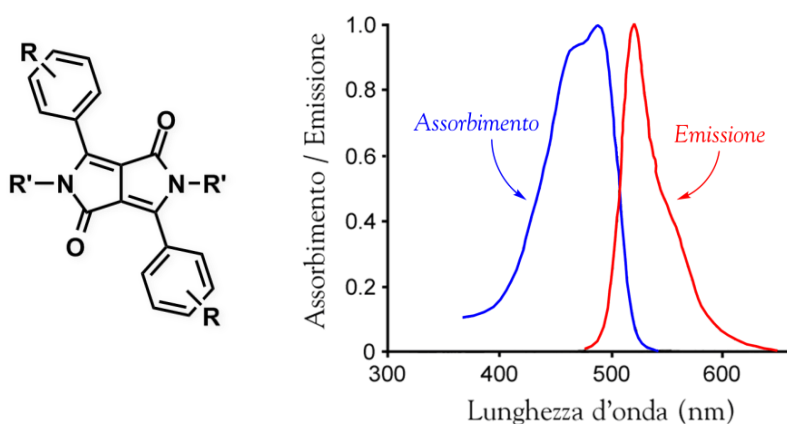
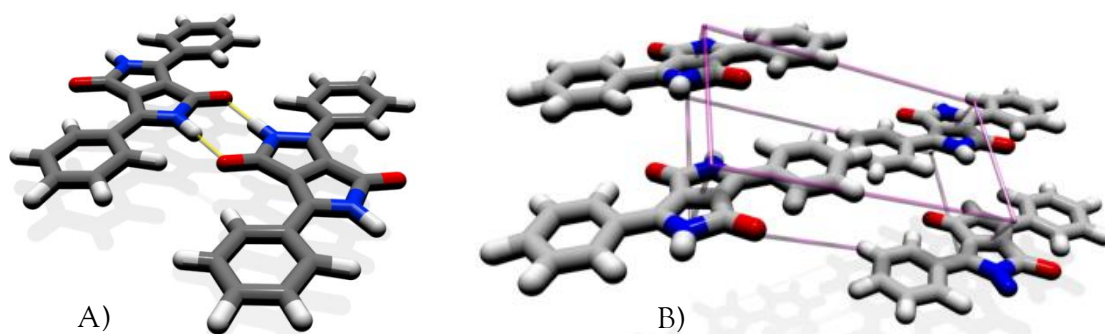


Figura 1.9: Spettri di assorbimento UV-Vis e emissione di fluorescenza del DPP (R=R'=H, soluzioni in CHCl<sub>3</sub>).

### c) Cristallinità

Gli arrangiamenti intra- ed inter- molecolari delle molecole di DPP in forma cristallina sono stati studiati mediante analisi di struttura a raggi X. La molecola di DPP è pressoché planare, dal momento che gli anelli fenilici risultano ruotati rispetto al sistema eterociclico di soli  $7^\circ \pm 1^\circ$ . In figura 1.10 A è riportato il legame intermolecolare a idrogeno tra l'idrogeno del lattame e l'ossigeno del carbonile.



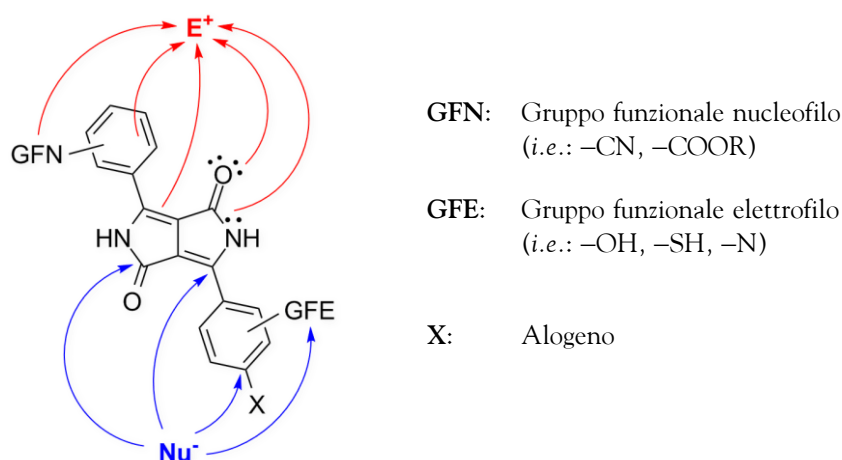


**Figura 1.10:** (A) Struttura a raggi X del DPP con legami a idrogeno intermolecolari (distanza: 1.98 Å)  
 (B) Cella cristallina del DPP, con interazioni di stacking  $\pi$ - $\pi$  tra anelli aromatici (distanza: 3.54 Å).

In figura 1.10 B viene illustrata invece l'interazione di *stacking*  $\pi$ - $\pi$  tra strati di molecole di pigmento, che assieme al legame a idrogeno determina l'impaccamento del cristallo. Le distanze interstrato ottimali tra i piani cromofori (3.36 Å) e tra i piani degli anelli aromatici (3.54 Å) sono abbastanza corte da garantire le interazioni di *stacking*.

#### d) Reattività di base

Un'osservazione qualitativa della molecola di dichetopirrolopirrolo rivela alcuni centri di reattività nella molecola (fig. 1.11), accessibili prevalentemente solo se questa è portata in soluzione.



**Figura 1.11:** Centri di reattività del DPP.

Mentre gli anelli fenilici, propriamente sostituiti, dovrebbero essere in grado di condurre diverse reazioni di sostituzione elettrofila e nucleofila aromatica, l'unità cromofora del lattame biciclico incorpora tre differenti gruppi funzionali, ovvero i doppi legami, i carbonili, e i gruppi ammidici, ciascuno dei quali è potenzialmente disponibile per trasformazioni chimiche. Si è sempre cercato di modificare il DPP mantenendo inalterata l'unità cromofora centrale, per cui gli sforzi sintetici si sono orientati verso la sostituzione elettrofila aromatica, l'*N*-sostituzione elettrofila e le trasformazioni nucleofile del gruppo carbonilico, evitando che queste trasformazioni comportassero una concomitante rottura del nucleo eterociclico (vedi figura 1.12).

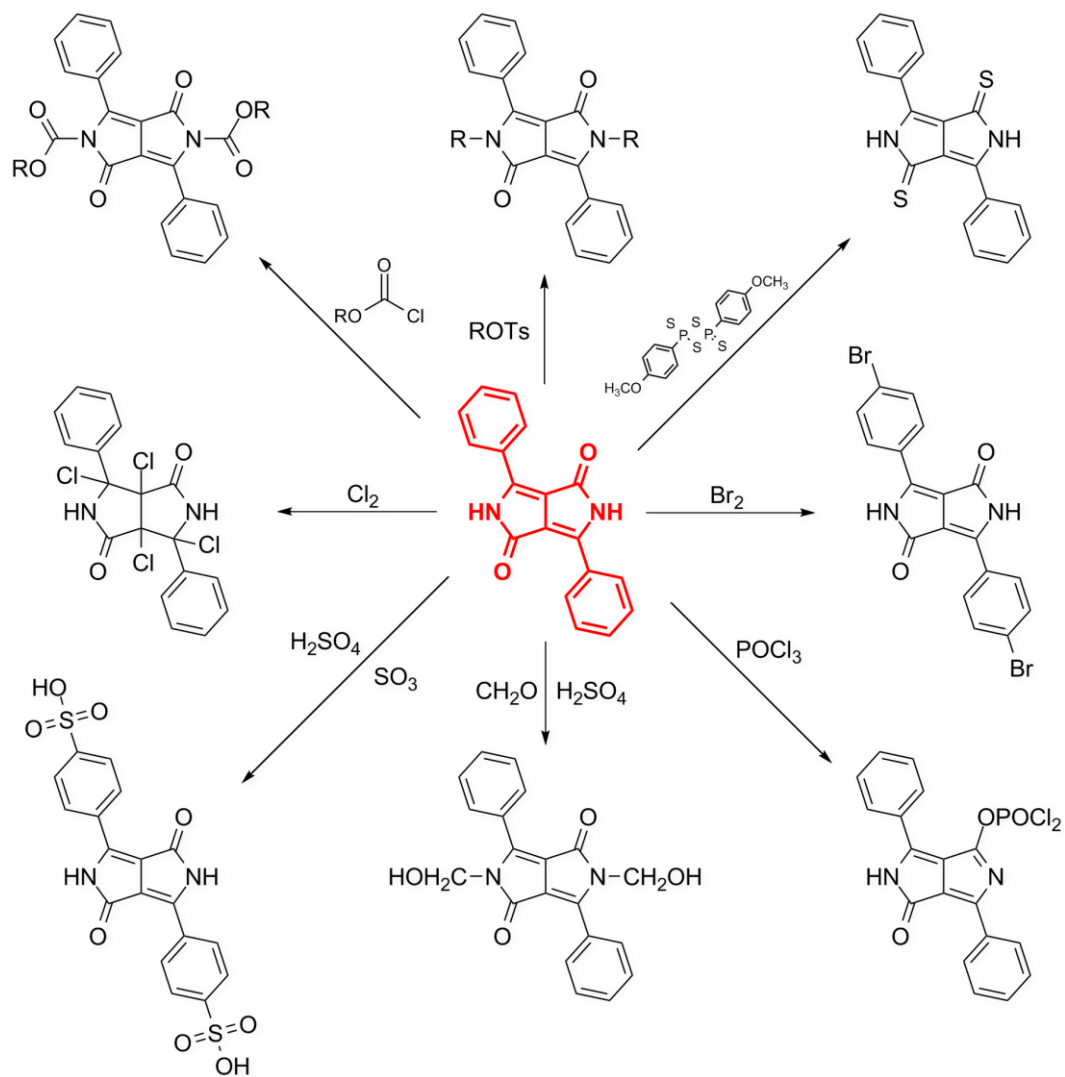


Figura 1.12: Principali reazioni che coinvolgono il DPP.

## 1.2. Scopo della tesi

L'obiettivo di questo primo capitolo di tesi prevede la sintesi di una nuova libreria di coloranti (Boc protetti) e pigmenti derivati dal **DPP**, attraverso l'inserimento di particolari sostituenti in posizione *p*- agli anelli aromatici, tramite *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura. S'intende effettuare uno studio esaustivo sulle condizioni ottimali per la reazione di *cross-coupling*, valutando al meglio la reattività di questo substrato, e gli effetti indotti dai gruppi R periferici sulle proprietà ottiche dei coloranti **1** (fig. 1.13), attraverso misure di assorbimento UV-Vis ed emissione di fluorescenza, calcolando per ciascun derivato il coefficiente di estinzione molare e la resa quantica di fluorescenza. Verrà effettuato uno studio completo anche per i pigmenti insolubili **2** (fig. 1.13), che possiedono la struttura base comune del P.R. 264. Lo scopo di questo studio preliminare è funzionale allo sviluppo dei polimeri supramolecolari, come verrà ampiamente descritto nel Cap. 2, e allo sviluppo di nuove linee di ricerca che sfruttino le proprietà di fluorescenza del **DPP**, come verrà accennato nel Par. 1.5 del presente capitolo (conclusioni e prospettive).

Come già visto nella parte introduttiva (Par. 1.1.3), una delle principali proprietà fisiche dei dichetopirrolopirroli dovuta alle forze intermolecolari che li caratterizzano (legami a idrogeno, interazioni di *stacking*  $\pi$ - $\pi$ ) è la bassa solubilità (<110 mg/L in DMF a 25 °C).<sup>28</sup> Questa caratteristica conferisce ai pigmenti alta stabilità chimica e fisica, ma al contempo ne rende difficile qualsiasi trasformazione chimica. In altre parole, è quasi impossibile usare la struttura del **DPP** tal quale per preparare nuovi pigmenti organici, legando ad essa funzionalità auxocrome. Per superare questa problematica si è pensato di combinare un approccio di tipo “pigmenti latenti”,<sup>1,29</sup> di seguito descritto, con il *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura,<sup>30</sup> per generare allo stesso tempo coloranti solubili e pigmenti insolubili (vedi figura 1.13).

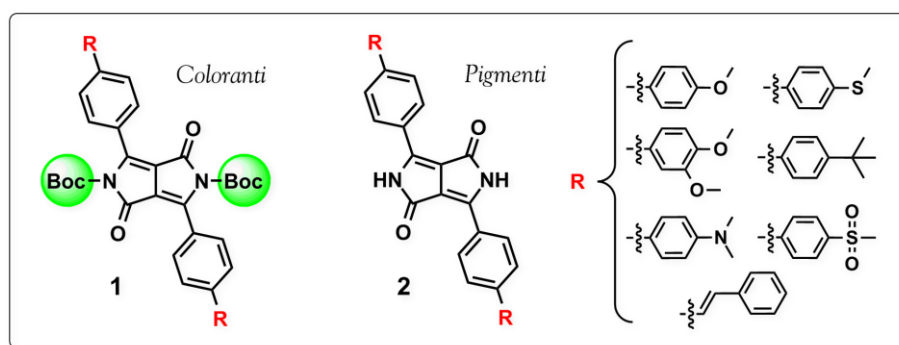
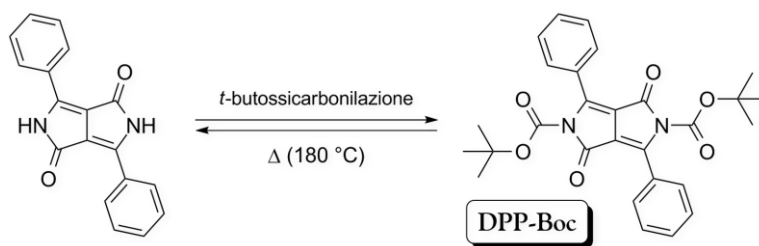


Figura 1.13: Nuovi pigmenti e coloranti DPP-derivati.

I primi a sintetizzare un **DPP** “latente” furono i ricercatori della *Ciba-Geigy*, nel 1997.<sup>31</sup> Partendo dalla considerazione che la forte insolubilità del **DPP** era causata dalle forti interazioni intermolecolari, fu creato un pigmento “latente” privato della possibilità di formare legami ad idrogeno, mediante funzionalizzazione reversibile dei gruppi ammidici del **DPP** con il gruppo protettore *t*-Boc. Questo gruppo presenta infatti due caratteristiche fondamentali: (1) impedisce la formazione dei legami a idrogeno nel **DPP** allo stato solido, originando un derivato solubile e (2) può essere facilmente rimosso mediante trattamento

termico, rigenerando il pigmento di partenza (vedi schema 1.7). Il gruppo *t*-butossicarbonilico viene introdotto simmetricamente nella molecola del **DPP** per azione del di-*terz*-butil dicarbonato a temperatura ambiente in THF o DMF, utilizzando come catalizzatore DMAP.<sup>32</sup>



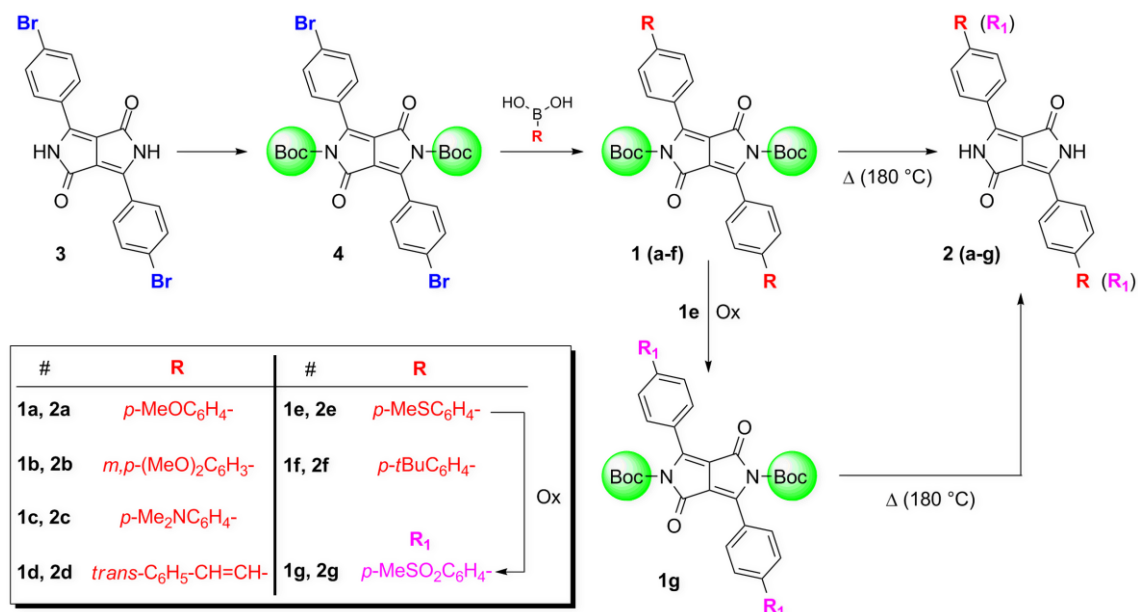
**Schema 1.7:** Protezione reversibile del **DPP** con di-*terz*-butil dicarbonato.

Il DPP-Boc poi, se scaldato a 180 °C, elimina il gruppo protettore rigenerando con rese quantitative il pigmento di partenza puro, con emissione di CO<sub>2</sub> e isobutene gassosi. In accordo con quanto affermato nel Par. 1.1, la formazione del carbammato è accompagnata da un grande spostamento ipsocromo del massimo di assorbimento rispetto allo stato solido, che passa da 540 nm a 439 nm, e la solubilità del pigmento latente supera di parecchi ordini di grandezza la solubilità del pigmento di partenza nei comuni solventi organici.

Rendere latente il **DPP** risulta quindi molto vantaggioso perché si può incrementarne la solubilità e di conseguenza la reattività, realizzando sugli anelli aromatici le modifiche strutturali volute.<sup>33</sup> Al termine della sintesi il gruppo protettore *t*-Boc può essere rimosso in maniera semplice e pulita, mediante trattamento termico o debole trattamento acido. Per operare le modifiche strutturali si è scelto appositamente il *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura perché avviene in blando ambiente basico a temperature relativamente basse, condizioni necessarie per il mantenimento del gruppo protettore *t*-Boc impiegato nella sintesi.

### 1.3. Sintesi

Di seguito si riporta il percorso sintetico generale che s'intende seguire per realizzare la nostra libreria di prodotti:

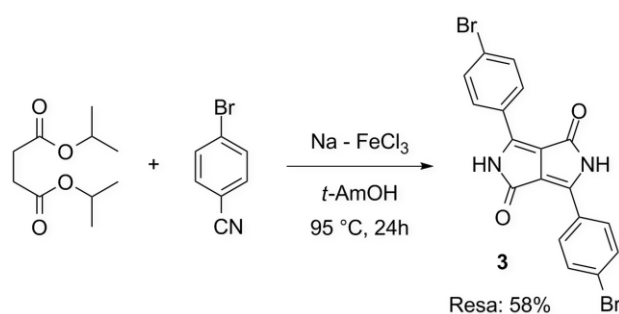


Schema 1.8: Procedura di sintesi per nuovi pigmenti e coloranti basati sul DPP.

Questo tipo di approccio dovrebbe permettere di ottenere nuovi pigmenti DPP-derivati con gruppi elettron-donatori (EDG) in posizione *para*, altrimenti difficili da sintetizzare tramite altre vie con una buona resa.<sup>24c,34</sup> Dallo schema 1.8 si può notare come il prodotto **1g**, con il gruppo metilsolfonico fortemente elettron-attrattore (EWG), venga ottenuto tramite ossidazione diretta del gruppo tiometilico appartenente al composto **1e**.

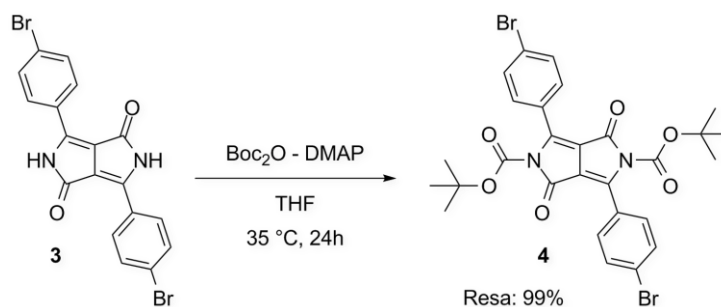
### 1.3.1. Precursori

Il primo stadio consiste perciò nella sintesi del precursore **3** (vedi schema 1.9), seguendo la procedura indicata in letteratura da Guo,<sup>35</sup> con qualche modifica. La reazione procede in *t*-AmOH a 95 °C, utilizzando sodio metallico come base e FeCl<sub>3</sub> anidro in quantità catalitica. Il 4-bromo-benzonitrile viene aggiunto a temperatura ambiente, mentre il di-isopropil succinato è introdotto a 95 °C nell'arco di 7h, per evitarne l'autocondensazione (vedi schema 1.4). Il pigmento, precipitato da acido acetico ed acqua e purificato con lavaggi acquosi e alcolici (CH<sub>3</sub>OH), si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro.



Schema 1.9: Sintesi del Br-DPP.

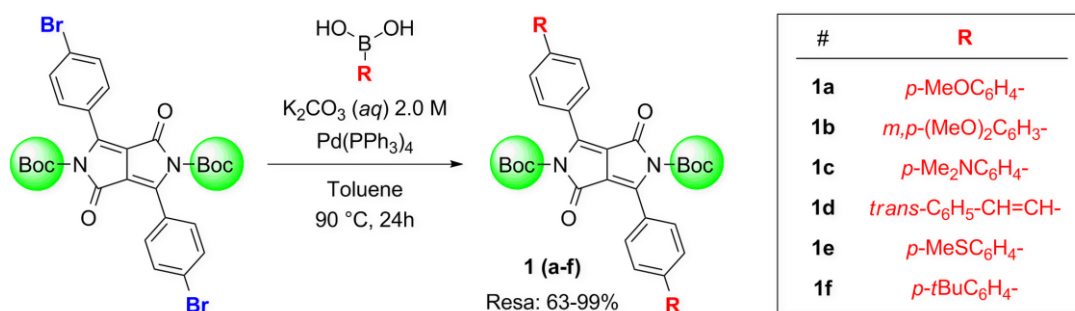
L'inserimento del residuo *t*-butossicarbonilico in **3**, per ottenere il più solubile e reattivo Br-DPP-Boc **4** (schema 1.10), si effettua seguendo la procedura di letteratura riferita al DPP tal quale.<sup>31</sup> La reazione avviene in THF anidro a 35 °C, usando DMAP in quantità catalitica. Al termine il solvente e l'eccesso di *t*-Boc impiegato per favorire la funzionalizzazione vengono rimossi a pressione ridotta. Il prodotto, che non necessita di ulteriore purificazione, si presenta sotto forma di solido polverulento giallo e viene ottenuto con resa quantitativa.



Schema 1.10: Sintesi del Br-DPP-Boc.

### 1.3.2. Nuova libreria di pigmenti

Di seguito viene riportato lo schema di sintesi generico (schema 1.11), con le condizioni di reazione dettagliate, per l'ottenimento dei coloranti *p*-fenil sostituiti Boc-protetti **1 (a-f)**, tramite *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura tra **4** e i rispettivi acidi boronici indicati in tabella. La reazione procede in un sistema bifasico toluene/H<sub>2</sub>O a riflusso, utilizzando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come base e Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> come catalizzatore (1% m/m). I prodotti vengono purificati mediante precipitazione da CH<sub>3</sub>CN e lavaggi acquosi, con rese sempre superiori al 60%. Tutti i composti sono stati compiutamente caratterizzati, e risultano omogenei mediante analisi TLC su allumina con miscele eluenti a differente polarità (vedi Par 1.6.2 – Prodotti e caratterizzazione).



Schema 1.11: Sintesi dei prodotti **1(a-f)**.

La tabella seguente (tab. 1.3) riporta tutti gli acidi boronici utilizzati per la sintesi di questa nuova serie di coloranti, con le rispettive rese per ciascuna reazione.

Prodotto	Acido boronico (5)	Resa (%)
<b>1a</b>		99
<b>1b</b>		84
<b>1c</b>		99
<b>1d</b>		65
<b>1e</b>		98
<b>1f</b>		63
<b>1h</b>		n.d.

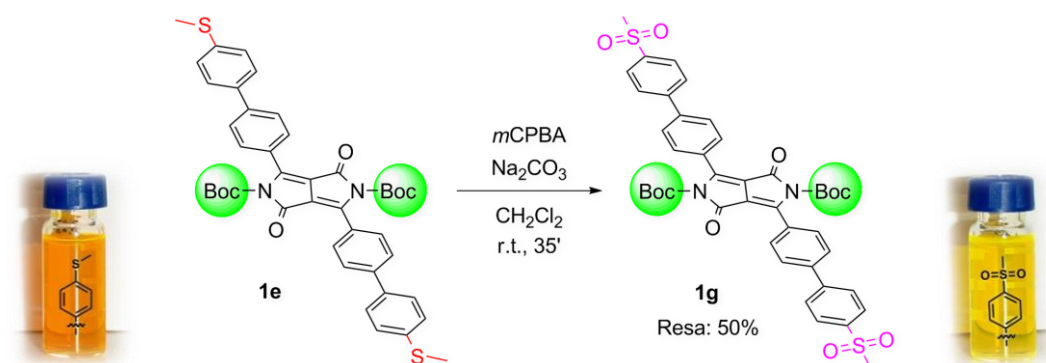
Tabella 1.3: Acidi boronici utilizzati per il cross-coupling di Suzuki-Miyaura.

I primi sei coloranti (**1 a-f**) con gruppi elettron-donatori (EDG) vengono ottenuti attraverso *cross-coupling* diretto tra **4** ed i corrispondenti acidi boronici.

Per poter effettuare uno studio completo degli effetti indotti dai sostituenti in posizione *para* sulle proprietà ottiche del DPP, la serie viene completata con l'introduzione di un EWG. Sfortunatamente l'introduzione diretta di un EWG (*i.e.* NO<sub>2</sub>, acido boronico **1h**) attraverso *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura non risulta possibile nelle condizioni da noi effettuate.

È noto da letteratura che l'impiego di fosfine ingombrate come *t*-Bu<sub>3</sub>P<sup>+</sup>BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, JohnPhos, Cy-JohnPhos, XPhos, PhCy<sub>2</sub>P abbinate al complesso di palladio Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> e l'utilizzo di basi più forti dell'usuale K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o CsF,<sup>36</sup> che favoriscono il processo di transmetallazione dell'acido boronico nel ciclo catalitico, rendono più reattivo il sistema. Purtroppo i tentativi da noi effettuati seguendo questa strategia non hanno portato agli esiti sperati. Si è cercato anche di modificare la velocità di aggiunta dell'acido boronico e di variare il solvente di reazione (diossano, H<sub>2</sub>O invece del sistema bifasico toluene/H<sub>2</sub>O) ma senza ottenere il risultato voluto. L'unico prodotto che si ritrova nel grezzo di reazione è infatti il 4,4'-dinitrobifenile, derivato dall'*homo-coupling* di **1h**, come riportato in letteratura per casi di sistemi poco reattivi come il nostro.<sup>37</sup>

Si è deciso pertanto di ottenere un composto con un gruppo EWG attraverso un'altra via: il composto **1g**, dotato del gruppo EWG metilsolfonico, viene ottenuto per ossidazione diretta con *m*CPBA del gruppo tiometilico appartenente a **1e** (vedi schema 1.12). La reazione procede in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente, ed è ottimizzata fino a una resa del 50% dopo purificazione con lavaggi a base di CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O. Un'introduzione lenta del *m*CPBA (25 mL di soluzione al 70% in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nell'arco di 15') e l'utilizzo di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in eccesso, sono condizioni essenziali per mantenere il pH della soluzione a livelli basici, evitando così la degradazione del gruppo protettore *t*-Boc. Si noti come dopo ossidazione l'assorbimento molecolare del composto in soluzione vari nettamente, con uno *shift* batocromo di λ<sub>max</sub> pari a 18 nm (vedi anche Par. 1.4.1).

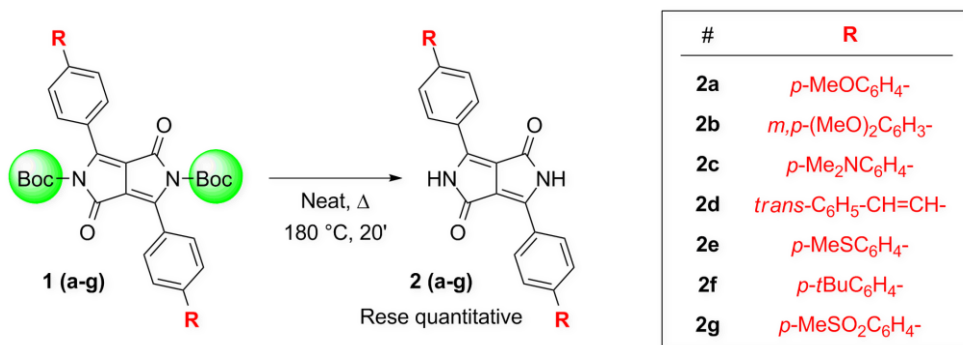


Schema 1.12: Sintesi di **1g** tramite ossidazione di **1e**.

La rimozione del gruppo protettore *t*-Boc per ottenere i pigmenti **2 (a-g)** avviene riscaldando i coloranti a 180 °C per 20 minuti. Inizialmente i composti vengono disciolti in acetone, subito rimosso a bassa pressione mediante evaporatore rotante, per creare un film sottile di colorante sulla superficie del pallone di reazione, favorendo così una reattività



omogenea. I prodotti vengono infine portati a temperatura ambiente in alto vuoto, e si ottengono con resa quantitativa senza necessità di ulteriore purificazione.



Schema 1.13: Sintesi dei prodotti 2(a-g).

I pigmenti organici 2 (a-g) presentano le funzionalità ammidiche nuovamente disponibili per la creazione di interazioni non-covalenti, pertanto possiedono la tipica insolubilità del DPP nei solventi organici, incrementata dalla presenza di un'ulteriore coppia di anelli aromatici capaci di generare *stacking*  $\pi$ - $\pi$  tra molecole adiacenti. La caratterizzazione non può perciò essere effettuata tramite NMR, ma mediante analisi elementare e spettroscopia IR (vedi parte sperimentale).

Nel prossimo paragrafo verranno indagate e discusse le proprietà ottiche (assorbimento UV-Vis, emissione di fluorescenza, resa quantica, *Stokes shift*) di tutti i composti sintetizzati.

## 1.4. Caratterizzazione

### 1.4.1. Studio delle proprietà ottiche (assorbimento UV-Vis, fluorescenza)

Nel settore dei pigmenti e coloranti i parametri opto-elettronici più importanti, che li caratterizzano e ne determinano la possibile applicazione in materiali *high-tech*, sono il coefficiente di estinzione molare, la resa quantica di fluorescenza e il valore di *Stokes shift*. Per indagare dunque gli effetti dei sostituenti sulle proprietà opto-elettroniche dei coloranti solubili **1** derivati dal DPP inizialmente si rilevano gli spettri di assorbimento UV-Vis a diversa concentrazione (per il calcolo del coefficiente di estinzione molare), quindi si registrano i corrispondenti spettri di emissione di fluorescenza per risalire ai valori di *Stokes shift*.<sup>38</sup> Lo *Stokes shift* di un fluoroforo è la differenza tra i suoi massimi di emissione e di assorbimento,  $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ass}$ . La diminuzione di energia è dovuta a numerosi fattori, tra cui il rilassamento rapido ( $10^{-12}$  s) della molecola eccitata al più basso livello vibrazionale di  $S_1$  e il decadimento fluorescente al più alto livello vibrazionale di  $S_0$  (vedi figura 1.14); in questo senso il valore dello *Stokes shift* è una misurazione diretta delle energie vibrazionali della molecola. Anche altri fenomeni fisici contribuiscono ugualmente a definire il valore di *Stokes shift*, come interazioni con il solvente, reazioni allo stato eccitato e trasferimenti di energia.

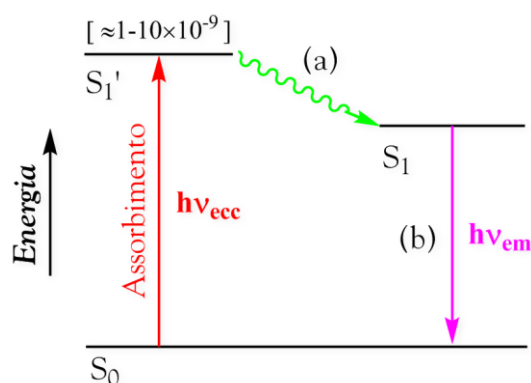


Figura 1.14: Diagramma di Jablonski sulla formazione dello stato eccitato  $S_1'$  ed emissione di fluorescenza.

I valori di resa quantica di fluorescenza  $\Phi$  vengono calcolati impiegando come standard di riferimento fluoresceina e rodamina 101 (per approfondimento vedi Par. 1.4.3). Tutti gli esperimenti vengono effettuati in soluzione di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , con un *cut-off* del solvente<sup>39</sup> pari a 245 nm (al di sotto del *range* d'interesse per le indagini effettuate).

Di seguito vengono riportate due illustrazioni fotografiche (fig. 1.15) relative a *vial* contenenti soluzioni di **1** in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , raccolte utilizzando come sorgente luminosa luce visibile e radiazioni UV, seguite dagli spettri di assorbimento UV-Vis relativi a tutti i composti solubili **1** Boc-protetti (fig. 1.16). I composti in soluzione danno luogo ad un *range* di colori compreso tra il giallo intenso (**1g**) ed il rosso scuro (**1c**), e la loro capacità di fluorescere si percepisce ancor più chiaramente quando vengono irraggiati con una sorgente ultravioletta.

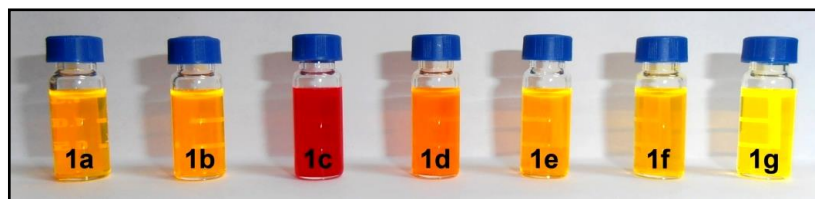


Figura 1.15: Coloranti 1 (a-g) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fotografati con luce visibile e UV.

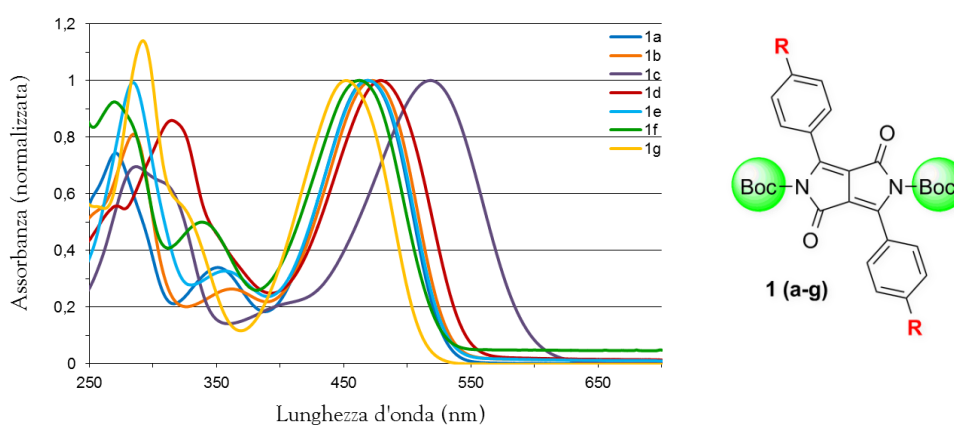


Figura 1.16: Spettri di assorbimento UV-Vis dei coloranti 1 (a-g).

In figura 1.17 si possono osservare, a titolo esemplificativo, gli spettri di assorbimento UV-Vis ed emissione di fluorescenza (con i valori di intensità massima normalizzati) relativi al composto **1a** (per la trattazione completa dei dati vedi figura 1.18).

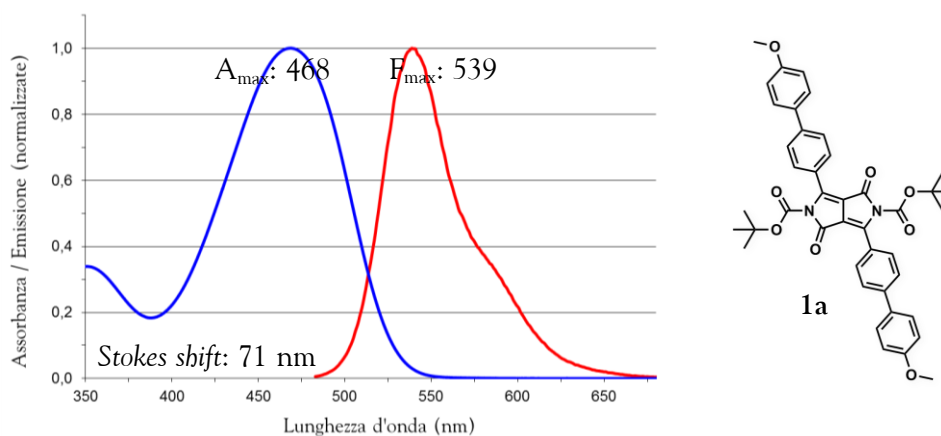


Figura 1.17: Spettro di assorbimento UV-Vis e fluorescenza di **1a**.

Nella tabella sotto riportata (tab. 1.4) vengono riportati tutti i dati ottici rilevati e calcolati per i coloranti solubili **1**.

Prodotto #	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	$F_{\max}$ (nm)	Stokes Shift (nm)	$\Phi$
<b>1a</b>	468	17400	539	71	0.389
<b>1b</b>	472	18500	545	73	0.333
<b>1c</b>	518	15400	642	124	0.005
<b>1d</b>	479	17400	554	75	0.172
<b>1e</b>	469	28700	544	75	0.388
<b>1f</b>	463	34200	531	68	0.482
<b>1g</b>	451	23300	528	77	0.484

Tabella 1.4: Effetto del sostituente sulle proprietà ottiche dei coloranti **1** (soluzioni in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

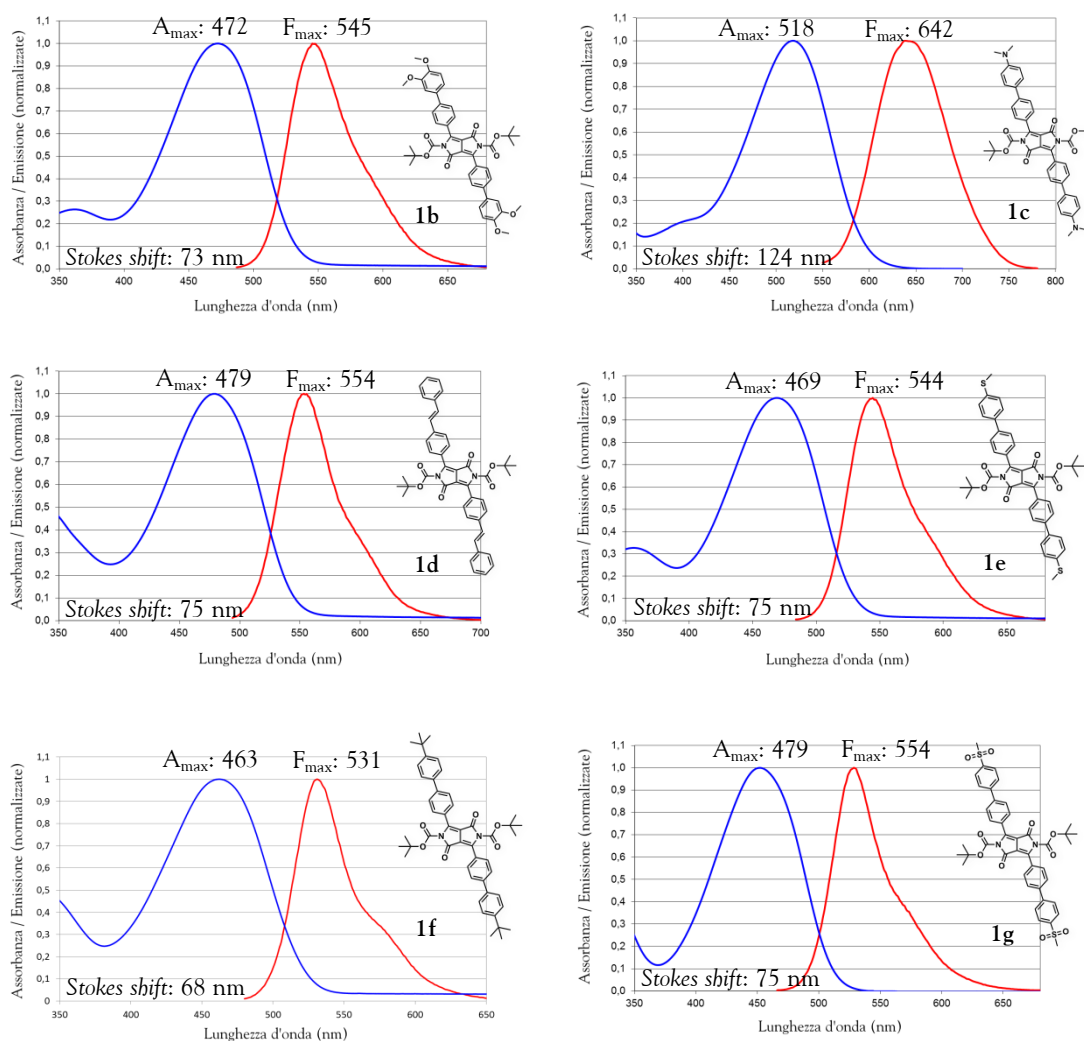


Figura 1.18: Spettri di assorbimento UV-Vis ed emissione di fluorescenza dei coloranti **1** (b-g).

La lunghezza d'onda del massimo di assorbimento ( $\lambda_{\max}$ ) subisce per tutti i prodotti **1** uno *shift* batocromico rispetto al massimo di 424 nm del derivato 2,5-bis-(*t*-butossicarbonilico),<sup>13</sup> e l'effetto maggiore si verifica per il prodotto **1c**. L'assorbimento massimo in soluzione varia tra 451 e 518 nm, e i valori dei coefficienti di estinzione molare sono sempre superiori a 15000 L/(mol·cm). I valori di *Stokes shift* osservati per i coloranti

rientrano mediamente nell'intervallo di 70-80 nm, eccezion fatta per il composto **1c**, caratterizzato da un valore pari a 124 nm. Questo dato indica una differenza di energia minore tra il più basso livello vibrazionale dello stato eccitato  $S_1$  e i livelli vibrazionali dello stato fondamentale, se confrontato con gli altri coloranti.

L'ultima colonna della tabella 1.4 riporta i valori di resa quantica di fluorescenza calcolati ( $\Phi$ ). In questo caso i valori più alti si hanno per il substrato **1g**, dotato del gruppo metilsolfonico elettron-attrattore (EWG), e per il substrato **1f**, con il gruppo *terz*-butilico che previene le interazioni di *stacking*  $\pi$ - $\pi$  tra molecole differenti, presentando i due anelli fenilici ruotati in direzione opposta ed un sistema eterociclico non più planare.<sup>40</sup>

Per indagare gli effetti dei sostituenti sulle proprietà opto-elettroniche dei pigmenti insolubili **2** si rilevano, in maniera analoga a quanto appena descritto per i composti **1**, gli spettri di assorbimento UV-Vis a diversa concentrazione (per il calcolo del coefficiente di estinzione molare), quindi i corrispondenti spettri di emissione di fluorescenza per risalire ai valori di *Stokes shift*. Tutti gli esperimenti vengono effettuati in soluzione di DMSO, con un *cut-off* del solvente<sup>39</sup> pari a 330 nm (al di sotto del *range* d'interesse per le indagini effettuate). Di seguito vengono riportati gli spettri di assorbimento UV-Vis relativi a tutti i pigmenti insolubili DPP-derivati **2** (fig. 1.19).

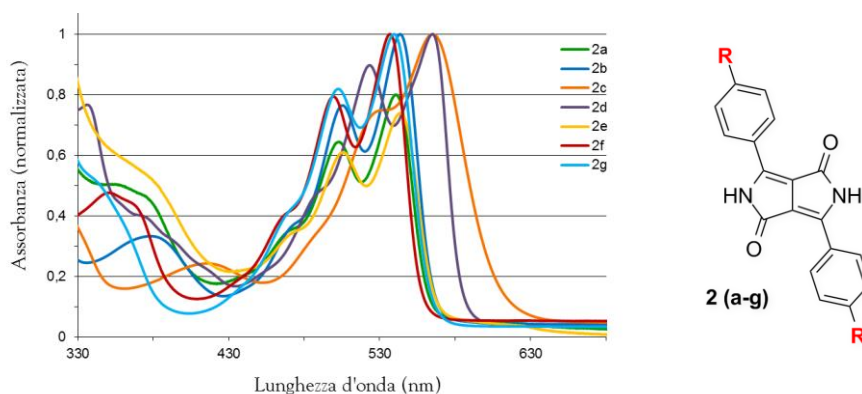


Figura 1.19: Spettri di assorbimento UV-Vis dei pigmenti **2** (a-g).

In figura 1.20 si possono osservare, a titolo esemplificativo, gli spettri di assorbimento UV-Vis ed emissione di fluorescenza (con i valori di intensità massima normalizzati) relativi al composto **2a** (per la trattazione completa dei dati vedi figura 1.21).

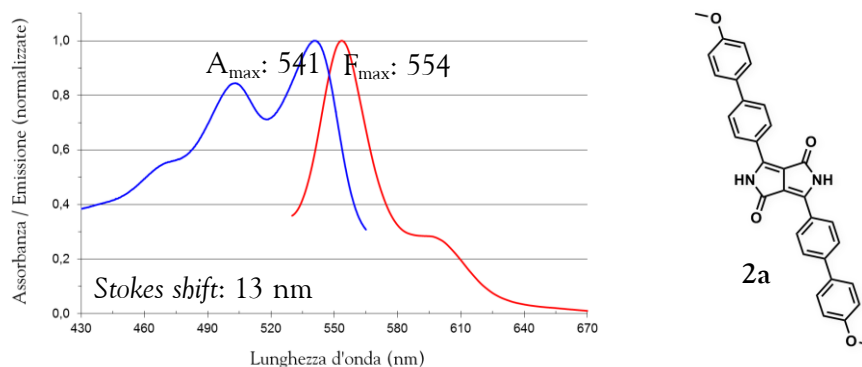


Figura 1.20: Spettro di assorbimento UV-Vis e fluorescenza di **2a**.

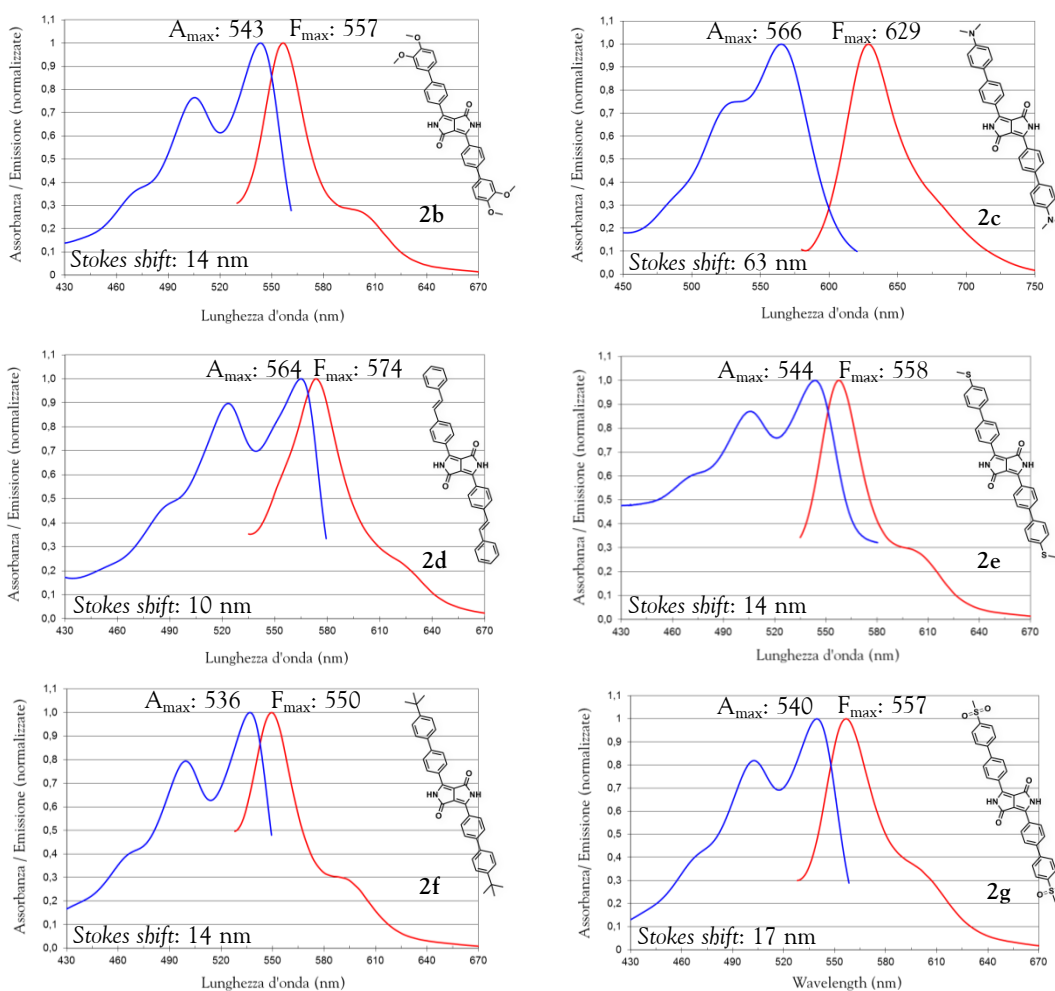
Nella tabella seguente (tab. 1.5) vengono riportati tutti i dati ottici rilevati e calcolati per i pigmenti insolubili **2**.

Prodotto #	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	F <sub>max</sub> (nm)	Stokes Shift (nm)
2a	541	n.d.	554	13
2b	543	15300	557	14
2c	566	31200	629	63
2d	564	35800	574	10
2e	544	n.d.	558	14
2f	536	47600	550	14
2g	540	46400	557	17

**Tabella 1.5:** Effetto del sostituito sulle proprietà ottiche dei pigmenti **2** (soluzioni in DMSO).

\*I valori di  $\epsilon$  per i composti **2a** e **2e** non vengono calcolati a causa della scarsa solubilità dei substrati.

Tutti i pigmenti **2** sono caratterizzati da una lunghezza d'onda del massimo di assorbimento spostata batocromicamente rispetto a 496 nm, massimo di assorbimento del P.R. 255. Anche in questo caso, la differenza maggiore nella serie si osserva per il prodotto **2c**, con il gruppo elettron-donatore (EDG) dimetilammino, che presenta allo stesso tempo anche il valore di Stokes shift più elevato (63 nm).



**Figura 1.21:** Spettri di assorbimento UV-Vis ed emissione di fluorescenza dei pigmenti **2** (b-g).

### 1.4.2. Calcolo del coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ )

Il calcolo del coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  prevede, per ciascun composto in esame, la realizzazione di cinque soluzioni a concentrazione differente. Come solvente si utilizza  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per i coloranti Boc-protetti **1**, DMSO per i pigmenti deprotetti **2**. Di seguito (fig. 1.22) si riportano a titolo esemplificativo gli spettri di assorbimento UV-Vis relativi al composto **1a** a 25 °C (per la trattazione completa dei dati vedi figura 1.24). Le concentrazioni vanno da  $1.57 \times 10^{-5}$  M a  $5.76 \times 10^{-5}$  M, in maniera che l'assorbimento massimo rientri sempre nell'intervallo di linearità secondo la legge di Lambert-Beer.

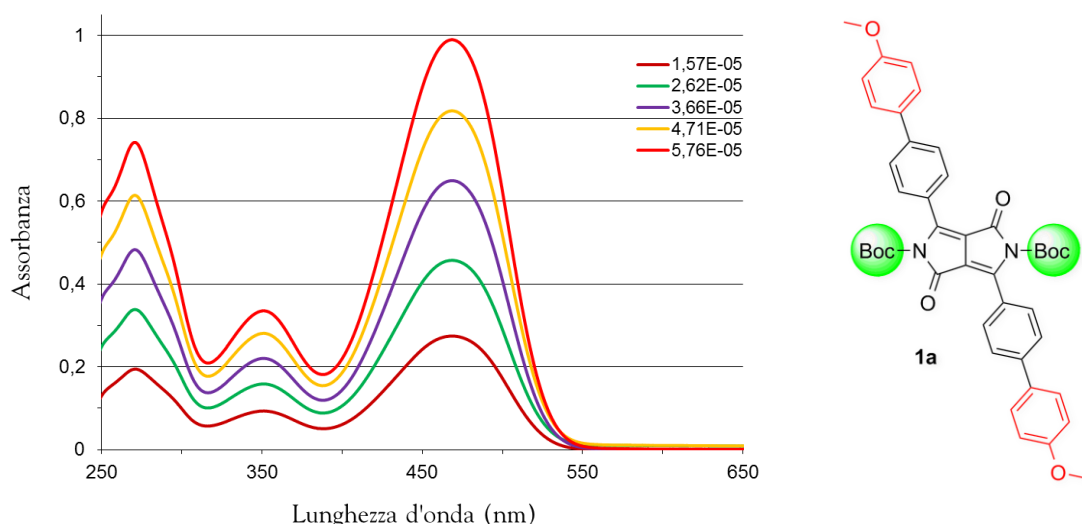
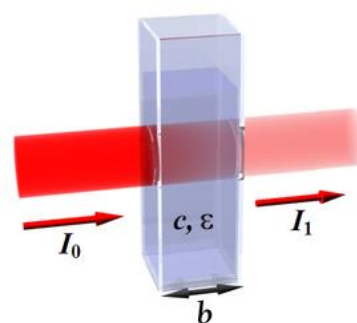


Figura 1.22: Spettri di assorbimento UV-Vis a concentrazione variabile di **1a**.

Dopo aver individuato la lunghezza d'onda del massimo di assorbimento  $\lambda_{\text{max}}$  (in questo caso pari a 468 nm), si dispongono in un grafico i valori di assorbanza alla  $\lambda_{\text{max}}$  contro i valori di concentrazione delle soluzioni (in mol/L) cui si riferiscono. Si ricordi che, secondo la legge di Lambert-Beer, vale:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c$$

T: trasmittanza  
 $I_0$ : fascio incidente     $I$ : fascio trasmesso  
 A: assorbanza  
 $\epsilon$ : coefficiente di estinzione molare [ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]  
 b: spessore della cuvetta [cm]  
 c: concentrazione [mol/L]



Dal momento che per tutte le misure si utilizzano cuvette in quarzo spesse 1.0 cm, il coefficiente di estinzione molare, espresso in  $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ , sarà pari al coefficiente angolare della retta interpolante i punti sperimentali nel grafico sottostante, passante per l'origine (in questo caso  $\epsilon = 17372$ , fig. 1.23).

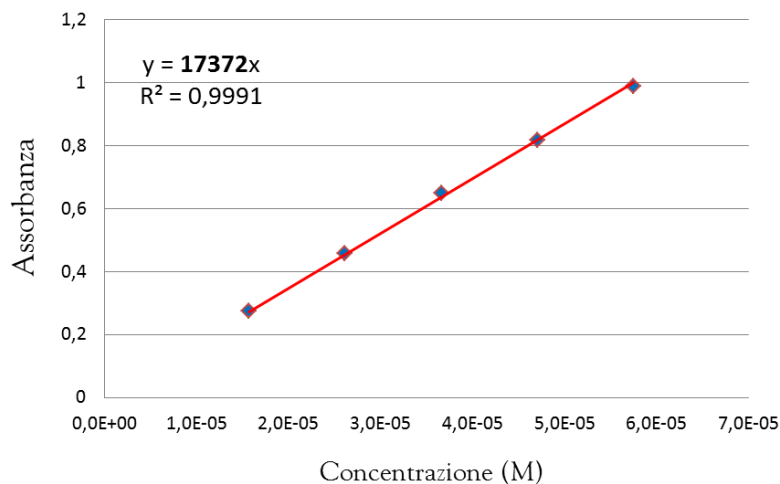
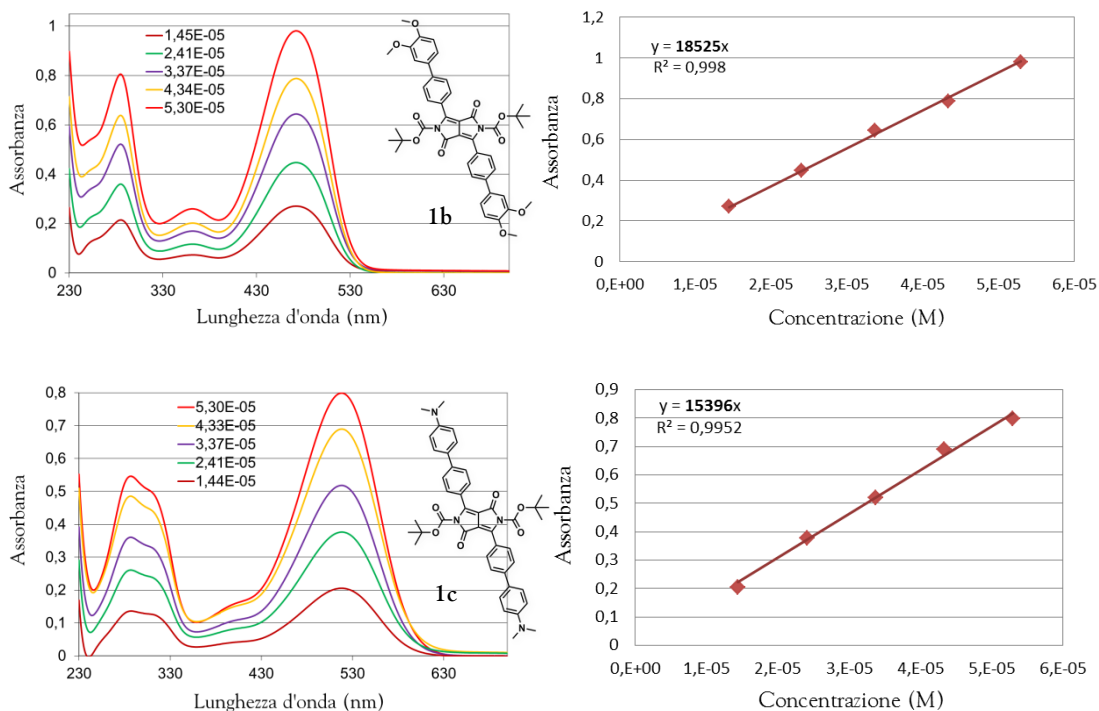


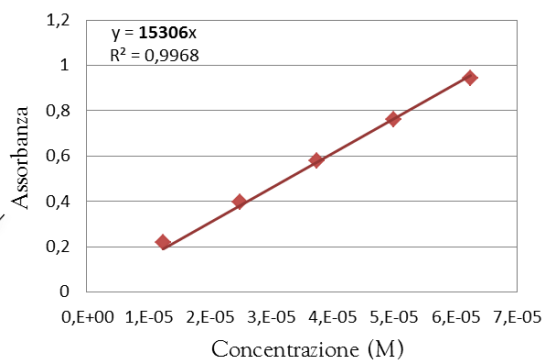
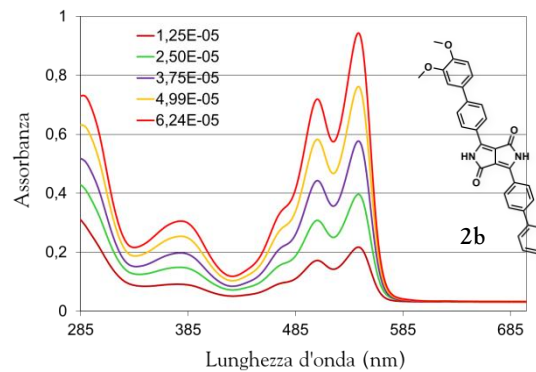
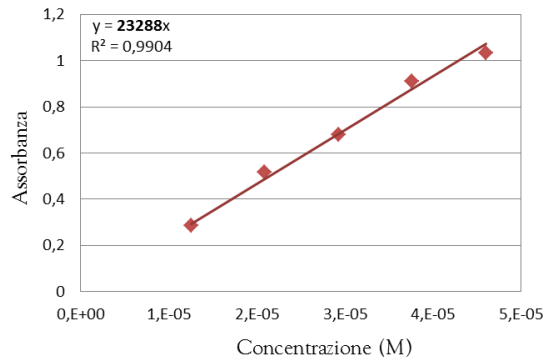
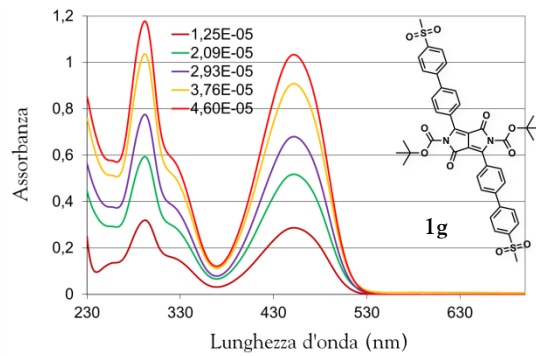
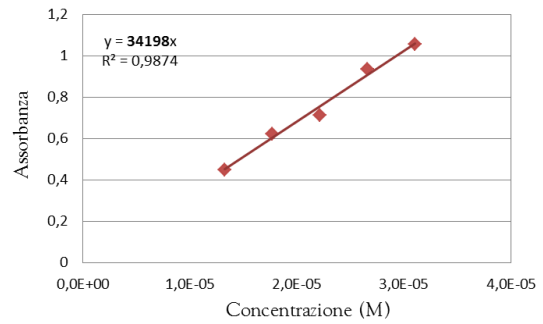
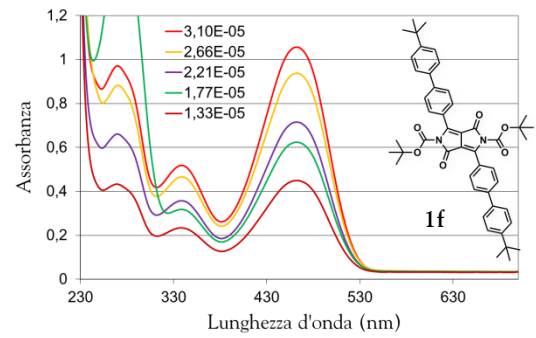
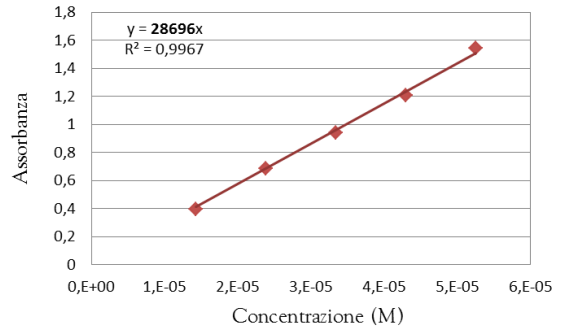
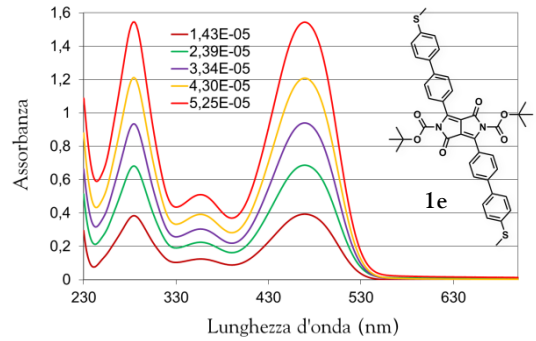
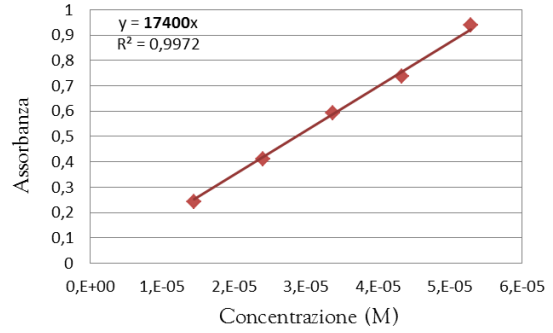
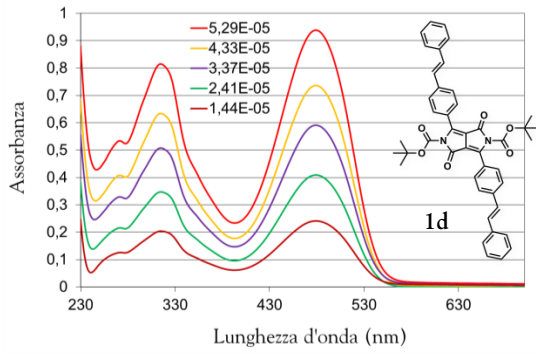
Figura 1.23: Retta interpolante per il calcolo di  $\epsilon$  relativo al composto 1a.

I valori dei coefficienti di estinzione molare, a causa del livello di accuratezza del metodo utilizzato, vengono infine arrotondati alle centinaia di unità. Pertanto in questo caso il valore di  $\epsilon$  finale che si considera è 17400 L/(mol·cm). Tutte le misurazioni sono caratterizzate da un valore approssimato del coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) maggiore o uguale a 0,99, indicativo di una corretta stima dei valori attribuiti ai coefficienti di estinzione. Di seguito si riportano gli spettri di assorbimento UV-Vis a concentrazione variabile accompagnati dalle rette interpolanti per il calcolo di  $\epsilon$  relativi a tutti i composti sintetizzati (1 b-g, 2 a-g).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Vedi Appendice A – Dati inerenti al calcolo di  $\epsilon$ .





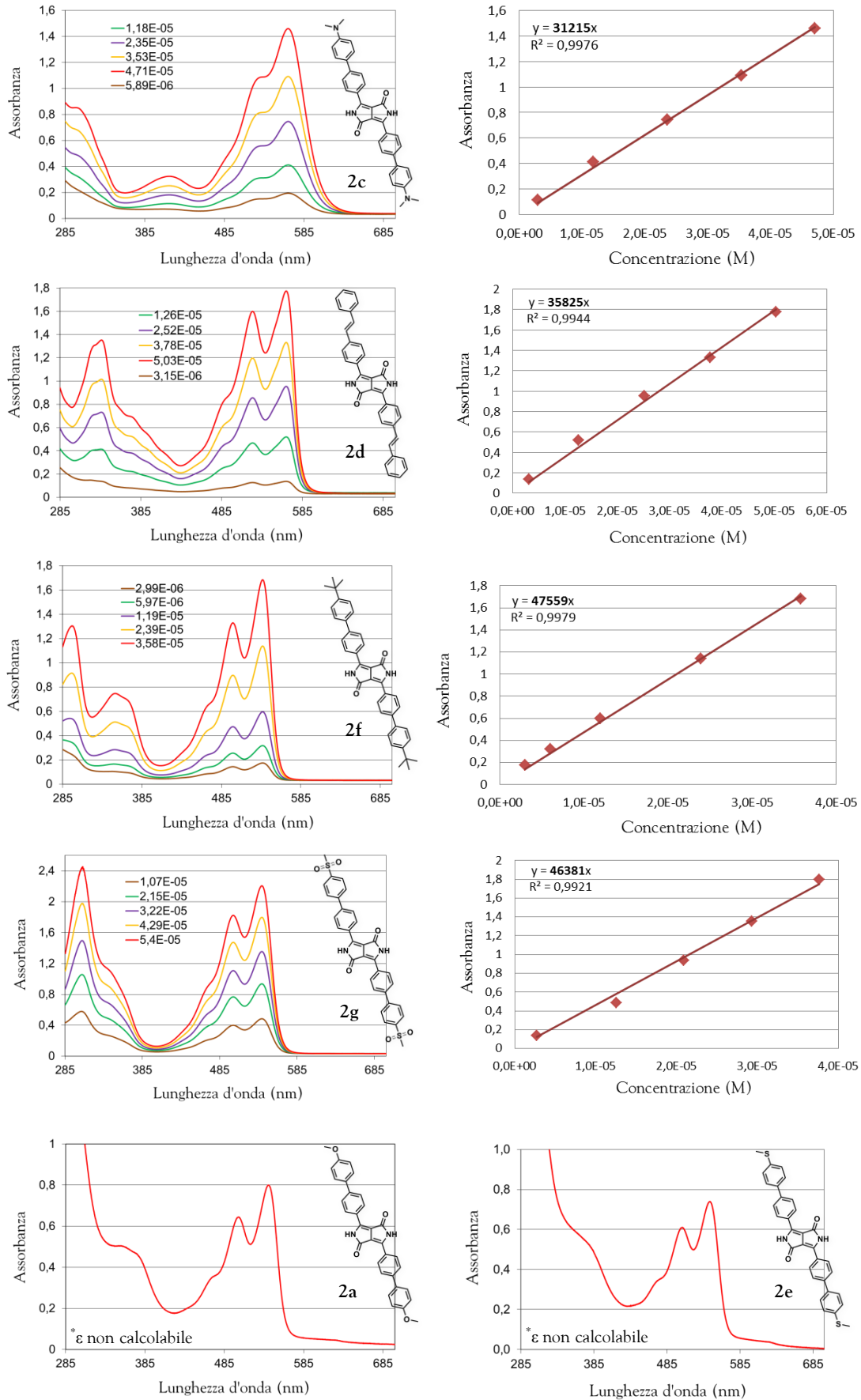


Figura 1.24: Spettri di assorbimento UV-Vis a diversa concentrazione e calcolo di  $\epsilon$  per i prodotti 1 e 2.

### 1.4.3. Calcolo della resa quantica di fluorescenza ( $\Phi$ )

La resa quantica di fluorescenza ( $\Phi$ ) è il rapporto tra il numero di molecole che fluorescono ed il numero di fotoni assorbiti (per unità di volume e di tempo).<sup>41</sup> In altre parole la resa quantica di fluorescenza è un numero che caratterizza l'efficienza di un fluoroforo in emissione: il fluoroforo ideale emette esattamente lo stesso numero di fotoni che ha assorbito, producendo una resa quantica pari a 1, anche se in realtà l'energia dei fotoni emessi è sempre inferiore rispetto all'energia dei fotoni assorbiti, a causa dei processi di rilassamento. Un buon fluoroforo dovrebbe possedere un valore di  $\Phi$  quanto più possibile vicino all'unità, ma almeno maggiore di 0.1. Viene calcolata seguendo un metodo di letteratura, che prevede l'uso di standard con valori noti di  $\Phi$ .<sup>41</sup> In particolare si utilizza una soluzione di fluoresceina in NaOH<sub>(aq)</sub> 0.1 M ( $\eta = 1.334$ ) come standard di riferimento per i composti **1a**, **1b**, **1d**, **1e**, **1f** e **1g**, ed una soluzione di rodamina 101 in EtOH ( $\eta = 1.360$ ) come standard di riferimento per il prodotto **1c**, considerando i valori di  $\Phi$  rispettivamente  $\Phi_{\text{Fluoresceina}} = 0.79$  e  $\Phi_{\text{Rodamina}} = 1.00$ .<sup>42</sup> Gli standard vengono eccitati con le seguenti lunghezze d'onda, vicine ai valori di  $\lambda_{\text{max}}$  di assorbimento:  $\lambda_{\text{Fluoresceina}} = 435$  nm,  $\lambda_{\text{Rodamina}} = 565$  nm.

Dal momento che si utilizza una cuvetta spessa 10 mm, per minimizzare quanto più possibile gli effetti di ri-assorbimento<sup>43</sup> le concentrazioni dei campioni vengono tarate avendo cura che i valori di assorbanza non superino mai lo 0.1 per la lunghezza d'onda di eccitazione scelta.<sup>44</sup> Oltre questo valore si possono avere infatti fenomeni di non-linearità a causa di "effetti filtro" interni, con conseguente errore nel calcolo di  $\Phi$ . Le rese quantiche di fluorescenza (*single spot*) sono quindi calcolate attraverso l'equazione classica:

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_{\text{abs}}} = \frac{F_X A_S}{F_S A_X} \Phi_S \left( \frac{\eta_X^2}{\eta_S^2} \right)$$

$A_S, A_X$ : assorbanza dello standard e del campione  
(allo stesso valore di  $\lambda$  usato per le misure)

$F_S, F_X$ : intensità integrata delle bande di fluorescenza dello standard e del campione (spettri registrati nelle stesse condizioni).

Di seguito viene riportata la tabella riassuntiva con i valori di assorbanza ( $A$ ), intensità integrata delle bande di fluorescenza ( $F$ ) e indici di rifrazione delle soluzioni ( $\eta$ ) calcolati, relativi sia al campione che agli standard.

Prodotto	$\Phi_{\text{Std}}$	$A_{\text{Std}}$	$A_X$	$F_{\text{Std}}$	$F_X$	$\eta_{\text{Std}}$	$\eta_X$	$\Phi (\pm 10\%)$
<b>1a</b>	0.79	0.01075	0.03185	9.97E+05	1.28E+06	1.334	1.424	0.389
<b>1b</b>	0.79	0.01075	0.04494	9.97E+05	1.54E+06	1.334	1.424	0.333
<b>1c</b>	1.00	0.05543	1.33066	7.86E+05	8.41E+04	1.360	1.424	0.005
<b>1d</b>	0.79	0.01075	0.08609	9.97E+05	1.53E+06	1.334	1.424	0.172
<b>1e</b>	0.79	0.01075	0.03256	9.97E+05	1.30E+06	1.334	1.424	0.388
<b>1f</b>	0.79	0.01075	0.02802	9.97E+05	1.39E+06	1.334	1.424	0.482
<b>1g</b>	0.79	0.01075	0.03000	9.97E+05	1.50E+06	1.334	1.424	0.484

**Tabella 1.6:** Dati per l'ottenimento di  $\Phi$  per i coloranti **1 (a-g)**.

<sup>41</sup> La resa quantica esprime quindi la probabilità che la molecola passi dallo stato eccitato a quello fondamentale attraverso la fluorescenza, e non attraverso altri meccanismi non radioattivi.

### 1.5. Conclusioni e prospettive

Il protocollo di sintesi riportato in questo lavoro di tesi è stato ottimizzato per funzionalizzare gli anelli aromatici del **DPP** in posizione *para* mediante una reazione di *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura, modificandone la struttura molecolare e di conseguenza le proprietà opto-elettroniche come l'assorbimento molecolare in soluzione. I sette differenti coloranti solubili **DPP**-derivati **1**, sintetizzati attraverso tale protocollo, vengono trasformati in una nuova serie di pigmenti insolubili **2** per rimozione termica del gruppo protettore *t*-Boc, che avviene con rese e gradi di purezza molto elevati.

Tutti i coloranti **1** rispetto all'assorbimento molecolare del **DPP** tal quale presentano uno *shift* batocromico, a prescindere dalla natura del sostituente introdotto. Gli alti valori di *Stokes shift* calcolati, indicativi di un'emissione del fluoroforo traslata a lunghezze d'onda maggiori, facilitano la distinzione tra il segnale di fluorescenza e lo *scattering* (Rayleigh) e aumentano il rapporto segnale-rumore,<sup>45</sup> dal momento che i fenomeni di riassorbimento da parte della sostanza colorante sono notevolmente diminuiti. Infatti per alti valori di *Stokes shift* gli spettri di assorbimento e di emissione risultano meno sovrapposti, prevenendo così fenomeni di *self-quenching* del fluoroforo.<sup>9</sup> Si tratta di risultati importanti per l'applicazione di questi composti come *probe* molecolari in tecniche di *imaging* microscopiche.

I valori di *Stokes shift* calcolati per ciascun composto sono sempre superiori rispetto al valore tipico richiesto per le applicazioni laser (50 nm),<sup>46</sup> ed inoltre le bande di assorbimento e luminescenza rilevate dimostrano un'elevata simmetria, con forma pressoché speculare.

Lo studio delle proprietà opto-elettroniche di derivati del **DPP** ottenuti tramite *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura, contenuto in questo primo capitolo di tesi, ha portato nel 2013 ad una pubblicazione<sup>47</sup> in *Dyes and Pigments*, rivista di riferimento per la sintesi di nuovi pigmenti e coloranti.

A seguito dell'ossidazione del reagente **1e**, la lunghezza d'onda del massimo di emissione di fluorescenza passa da 544 nm a 528 nm. Questa caratteristica rende il prodotto **1e**, a seguito di opportune modifiche per incrementarne la solubilità, un ottimo substrato utile come chemosensore per il rilevamento di agenti S-ossidanti. Tale risultato ha aperto una linea di ricerca parallela che sfrutta le proprietà di fluorescenza del **DPP**, per lo sviluppo di *probe* per specie ossigeno reattive (**ROS**) presenti in ambito biologico. La nostra ricerca in quest'ambito si sta focalizzando sulla sintesi di un nuovo *probe* ON/OFF basato sul **DPP**, che manifesti fluorescenza a seguito d'interazione con il radicale  $\cdot\text{OH}$  (vedi figura 1.25), specie ROS altamente dannosa.

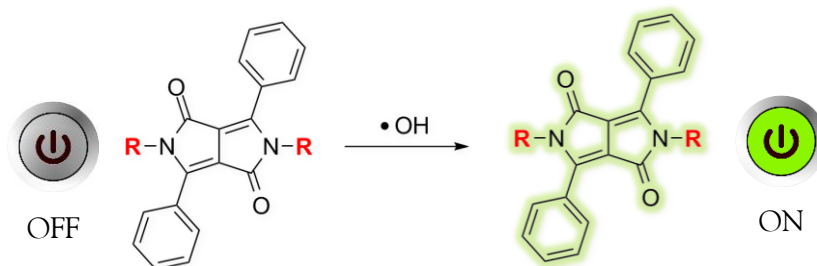


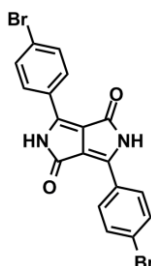
Figura 1.25: Probe ON/OFF per il radicale ossidrilico basato sul DPP.

## 1.6. Parte sperimentale

### 1.6.1. Strumentazioni, reagenti e solventi

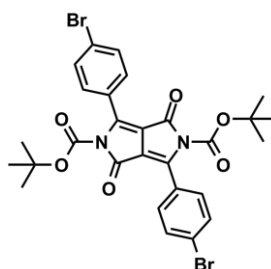
Le reazioni vengono seguite attraverso TLC POLYGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub> di 0.25 mm di spessore. Le cromatografie flash sono effettuate utilizzando gel di silice MERK 60, 0.04-0.063 mm/230-400 mesh, secondo le metodologie e le strumentazioni descritte da Still.<sup>48</sup> Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR vengono registrati con uno spettrometro VARIAN UNITY 400 MHz, utilizzando tetrametilsilano come riferimento interno. Gli spettri NMR COSY sono ottenuti con la usuale sequenza di impulsi. Le trasformazioni lungo t1 e t2 sono pesate con le opportune *non-shifted sine functions* e fasate con la tecnica *absolute value*. Gli spettri NMR NOESY vengono ottenuti con la normale sequenza di impulsi e con un *mixing time* di 1.8 secondi. La massima sensibilità si ottiene non applicando alcuna funzione lungo t2 e con una *non shifted gaussian function* lungo t1. Gli spettri eterocorrelati sono ottenuti con la tecnica *reverse detection*. Lo spettro eterocorrelato HMQC permette di rilevare le correlazioni dirette <sup>1</sup>J<sub>CH</sub>, mentre lo spettro *multiple bond* HMBC fornisce le correlazioni a più lungo raggio <sup>n</sup>J<sub>CH</sub> (con in genere n = 2, 3). In un tipico esperimento sono state effettuate 256 misure lungo t1 con il metodo di acquisizione *phase sensitive*, con 16 (HMQC) o 32 (HMBC) scansioni per ogni valore di t1. Il ritardo per il filtro BIRD è tarato su un valore medio <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 140 Hz, mentre il ritardo per il rilevamento delle correlazioni *multiple bond* è basato su <sup>n</sup>J<sub>CH</sub> = 5 Hz. La trasformazione lungo t2 è effettuata su FID pesati da una funzione gaussiana, la trasformazione lungo t1 è preceduta dall'applicazione di una funzione gaussiana e da *zero filling*. Gli spettri HMBC sono in genere deturpati da elevato rumore lungo t1. Il rumore è rimosso mediante l'applicazione a ogni traccia (punti lungo la direzione orizzontale nello spettro) di una maschera formata dai valori massimi e minimi delle tracce raccolte in un intervallo privo di segnali. I valori positivi (negativi) di ogni traccia sono sottratti ai valori positivi (negativi) della maschera, o azzerati se nell'operazione il segno del valore cambia. Gli spettri di massa vengono acquisiti con un sistema HPLC AGILENT 1100 SERIES con rilevatore DAD, abbinato ad uno spettrometro di massa AGILENT LC/MSD Trap SL, con ionizzazione API (Electrospray) e modalità *Flow Injection Analysis*. Gli spettri UV allo stato solido sono registrati con un PERKIN ELMER LAMBDA 35 UV/VIS SPECTROMETER, mentre quelli allo stato liquido (in soluzioni di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> o DMSO) con un PERKIN ELMER LAMBDA 40 UV/VIS SPECTROMETER con un Perkin Elmer PTP 6 Peltier *temperature programmer* impostato a 25 °C. Gli spettri di fluorescenza vengono registrati con un PERKIN ELMER LS55 FLUORESCENCE SPECTROMETER. Gli spettri IR sono acquisiti con un PERKIN ELMER SPECTRUM ONE FT-IR SPECTROMETER. I punti di fusione vengono rilevati con uno STUART SCIENTIFIC MELTING POINT APPARATUS SMP3. Tutti i reagenti e i solventi commerciali vengono impiegati senza ulteriori purificazioni, salvo diversamente specificato. I solventi definiti "anidri" vengono purificati secondo procedure riportate in letteratura<sup>49</sup> (eventualmente conservati qualche giorno su setacci molecolari); in particolare THF viene anidrificato con sodio e benzofenone. Il toluene impiegato per i *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura viene degasato mediante flusso d'argon in un bagno a ultrasuoni per 15 minuti.

### 1.6.2. Prodotti e caratterizzazione



**3,6-bis(4-bromofenil)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (3)**<sup>22,29,50</sup>

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon s'introduce *t*-AmOH (40.0 mL), sodio metallico (0.758 g, 32.96 mmol) e FeCl<sub>3</sub> in quantità catalitica. Si innalza la temperatura fino a 80 °C per favorire la completa dissoluzione del sodio, quindi si riporta la miscela a temperatura ambiente. S'introduce 4-bromo-benzonitrile (3.00 g, 16.48 mmol), si porta la temperatura a 95 °C e s'introduce una soluzione di di-isopropil-succinato (1.667 g, 8.24 mmol) in *t*-AmOH (10 mL) nell'arco di 7h tramite *syringe-pump*. Si lascia procedere la reazione sotto agitazione a 95 °C per 17h, quindi si raffredda a 60 °C, e si aggiunge lentamente una soluzione di H<sub>2</sub>O (100 mL) e acido acetico (7 mL). Si filtra la miscela su imbuto Büchner lavando il precipitato con H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>OH fino a che le acque madri risultino incolori. Il prodotto ottenuto viene essiccato in pompa meccanica a 60 °C per 24h, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro (2.138 g, resa: 58%). EA (calc.): C, 48.46; H, 2.26; Br, 35.82; N, 6.28; O, 7.17 / (exp.): C, 48.23; H, 2.09; N, 6.32. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 400 MHz), δ (ppm): 8.40 (4H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.82 (4H, d, *J* = 8.1 Hz). <sup>13</sup>C non determinato a causa dell'elevata insolubilità del campione. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3434 (w, b), 3131 (w), 3075 (w), 3025 (w), 2969 (w), 2829 (w), 1636 (vs), 1600 (vs), 1552 (m), 1490 (s), 1437 (m), 1390 (m), 1317 (m), 1275 (w), 1191 (m), 1135 (m), 1071 (m), 1029 (w), 1006 (m), 833 (w), 816 (m), 746 (m), 693 (m), 620 (w), 469 (m). PM (C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 446.09 u.

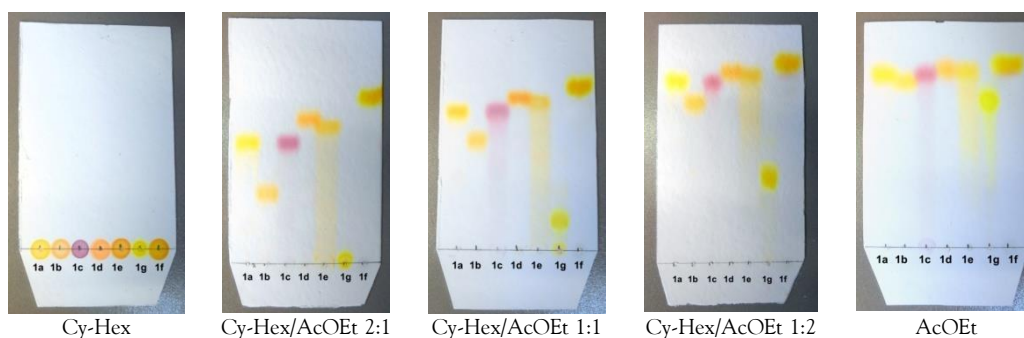


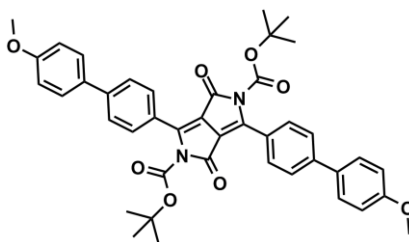
**Di-*tert*-butil 3,6-bis(4-bromofenil)-1,4-diossopirrolo [3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (4)**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio e flusso d'argon s'introduce Br-DPP 3 (0.748 g, 1.68 mmol), DMAP in quantità catalitica e THF anidro (120 mL). Si lascia procedere la reazione a temperatura ambiente sotto agitazione per 15', quindi si aggiunge di-*tert*-butil dicarbonato (Boc<sub>2</sub>O) (0.867 mL, 3.77 mmol) e si lascia procedere la reazione sotto agitazione a 35 °C per 24h. Si effettua il work-up rimuovendo il

solvente e il Boc<sub>2</sub>O in eccesso a bassa pressione (evaporatore rotante, 45 °C). Si ottiene un composto solido polverulento di colore giallo (1.083 g, resa: 99%). EA (calc.): C, 52.03; H, 4.05; Br, 24.73; N, 4.33; O, 14.85 / (exp.): C, 51.89; H, 3.87; N, 4.28. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.64-7.59 (8H, m), 1.44 (18H, s). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 159.2, 148.1, 145.4, 131.9, 130.0, 127.1, 126.4, 112.7, 85.9, 27.7. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3434 (w, b), 2985 (vw), 2929 (vw), 1753 (vs), 1714 (vs), 1625 (s), 1583 (w), 1482 (w), 1474 (w), 1457 (vw), 1398 (w), 1370 (w), 1325 (w), 1289 (s), 1261 (s), 1211 (w), 1144 (vs), 1104 (s), 1057 (s), 1006 (m), 892 (vw), 875 (w), 847 (w), 822 (w), 800 (vw), 760 (w), 735 (m), 713 (vw), 685 (vw), 646 (vw), 615 (vw), 489 (vw). PM (C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>): 646.32 u. MS (ESI) m/z: 669 (M<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>, 100%).

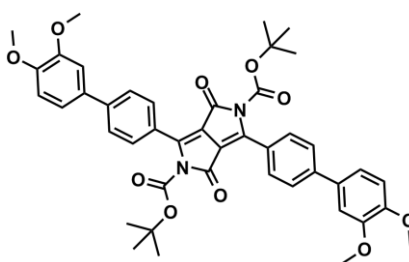
**A) Procedura generica per l'ottenimento dei coloranti DPP-derivati tramite Suzuki-Miyaura cross-coupling (1 a-f).** In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon s'introduce toluene (30 mL) e K<sub>2</sub>CO<sub>3(aq)</sub> 2.0 M (9.2 mL di soluzione, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 2.549 g, 18.44 mmol), quindi si degasa la miscela gorgogliando argon e sonicando contemporaneamente per 15'. S'introduce l'acido boronico **5** (0.200 g, 0.31 mmol) e Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in quantità catalitica (1% m/m), quindi si porta la miscela a riflusso (90 °C), e si lascia procedere sotto agitazione per 24h. Si raffredda e si rimuove il solvente a bassa pressione (evaporatore rotante, 80 °C), quindi si fa precipitare il prodotto da CH<sub>3</sub>CN, che viene purificato mediante lavaggi acquosi. Tutti i composti così ottenuti vengono caratterizzati tramite EA, Mp, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR e MS (ESI), e dimostrano un comportamento omogeneo se analizzati mediante TLC con miscele eluenti a differente polarità.





**Di-terz-butil 3,6-bis(4'-metossibifenil-4-il)-1,4-diossopirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1a)**

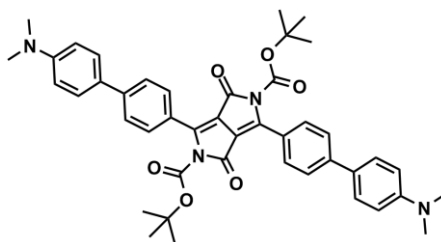
Il composto **1a** viene preparato secondo la procedura generica A, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso brillante (216 mg, resa: 99%). Mp: 190-192 °C (dec.). EA (calc.): C, 71.98; H, 5.75; N, 4.00; O, 18.26 / (exp.): C, 71.76; H, 5.62; N, 4.06. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.83 (4H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.68 (4H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.60 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.00 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), 3.87 (6H, s), 1.46 (18H, s). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 160.1, 159.8, 148.5, 145.9, 144.1, 143.1, 136.2, 132.5, 129.3, 128.4, 126.5, 114.6, 112.3, 85.4, 55.5, 27.8. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3400 (w, vb), 3193 (m, b), 2974 (w), 2834 (vw), 1765 (s), 1742 (s), 1706 (s), 1600 (vs), 1496 (vs), 1476 (vs), 1448 (vs), 1370 (vs), 1283 (vs), 1250 (vs), 1205 (m), 1177 (s), 1144 (vs), 1060 (vs), 1037 (m), 998 (w), 878 (w), 822 (s), 797 (w), 772 (w), 704 (w), 671 (w), 601 (w). PM (C<sub>42</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>): 700.78 u. MS (ESI) *m/z*: 701 (M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>, 100%).



**Di-terz-butil 3,6-bis(3',4'-dimetossibifenil-4-il)-1,4-diossopirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1b)**

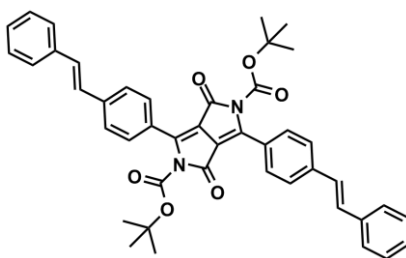
Il composto **1b** viene preparato secondo la procedura generica A, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso (198 mg, resa: 84%). Mp: 184-186 °C (dec.). EA (calc.): C, 69.46; H, 5.83; N, 3.68; O, 21.03 / (exp.): C, 69.31; H, 5.98; N, 3.64. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.84 (4H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.68 (4H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.22 (2H, dd, *J* = 8.4 Hz), 7.16 (2H, s, *J* = 2.0 Hz), 6.98 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 3.98 (6H, s), 3.95 (6H, s), 1.48 (18H, s). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 159.7, 149.6, 148.6, 145.9, 144.3, 140.2, 133.0, 132.0, 129.2, 126.7, 119.9, 112.4, 111.7, 110.5, 85.5, 56.2, 27.8. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3422 (w, vb), 3215 (w, b), 2974 (w), 2929 (w), 2834 (vw), 1751 (s), 1700 (s), 1613 (m), 1597 (s), 1524 (m), 1502 (vs), 1462 (s), 1398 (m), 1367 (s), 1331 (m), 1289 (s), 1275 (vs), 1253 (vs), 1219 (m), 1174 (m), 1144 (vs), 1060 (s), 1026 (m), 881 (w), 833 (m), 802 (m), 766 (w), 741 (w), 704 (w), 651 (w), 618 (w). PM (C<sub>44</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>): 760.83 u. MS (ESI) *m/z*: 762 (M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>, 100%).





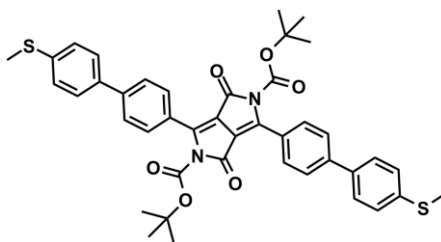
**Di-terz-butil 3,6-bis(4'-(dimetilammino)bifenil-4-il)-1,4-diossopirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1c)**

Il composto **1c** viene preparato secondo la procedura generica A, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore viola scuro (224 mg, resa: 99%). Mp: 188-190 °C (dec.). EA (calc.): C, 72.71; H, 6.38; N, 7.71; O, 13.21 / (exp.): C, 72.75; H, 6.29; N, 7.66. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.81 (4H, d, J = 8.5 Hz), 7.67 (4H, d, J = 8.5 Hz), 7.58 (4H, d, J = 8.8 Hz), 6.80 (4H, d, J = 8.8 Hz), 3.03 (12H, s), 1.46 (18H, s). <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 159.9, 150.7, 148.7, 145.8, 144.4, 129.3, 128.0, 127.6, 125.8, 122.6, 112.8, 112.0, 89.5, 85.3, 40.6, 27.7. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3437 (vw, b), 3019 (vw), 2952 (vw), 2829 (vw), 1597 (w), 1586 (w), 1485 (s), 1460 (w), 1437 (w), 1412 (vw), 1345 (s), 1325 (m), 1295 (m), 1208 (m), 1163 (vs), 1088 (m), 1071 (vs), 1048 (m), 1018 (w), 984 (m), 970 (w), 872 (vw), 808 (w), 744 (w), 707 (s), 654 (w), 573 (vs), 537 (w). PM (C<sub>44</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>): 726.86 u. MS (ESI) m/z: 727 (M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>, 21%), 364 (M<sup>+</sup>/2+H<sup>+</sup>, 79%).



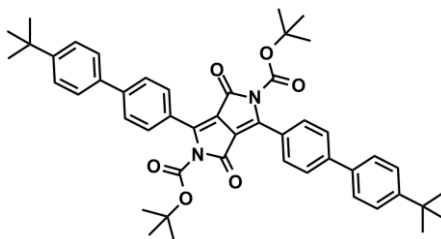
**Di-terz-butil 1,4-diosso-3,6-bis(4-stirilfenil)pirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1d)**

Il composto **1d** viene preparato secondo la procedura generica A, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro (138 mg, resa: 65%). Mp: 167-169 °C (dec.). EA (calc.): C, 76.28; H, 5.82; N, 4.04; O, 13.86 / (exp.): C, 76.04; H, 5.69; N, 4.01. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.79 (4H, d, J = 8.4 Hz), 7.62 (4H, d, J = 8.4 Hz), 7.55 (4H, d, J = 7.3 Hz), 7.39 (4H, t, J = 7.5 Hz), 7.30 (2H, t, J = 7.3 Hz), 7.18 (2H, d, J = 16.4 Hz), 7.14 (2H, d, J = 16.4 Hz), 1.46 (18H, s). <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, 60 °C), δ (ppm): 187.6, 182.5, 159.7, 152.1, 148.6, 141.0, 137.2, 129.3, 129.0, 127.5, 127.0, 126.5, 123.4, 112.6, 85.5, 46.6, 27.9. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3422 (m, b), 3025 (w), 2980 (w), 2924 (w), 1734 (vs), 1717 (s), 1611 (s), 1600 (s), 1544 (w), 1507 (w), 1490 (w), 1448 (m), 1393 (m), 1370 (s), 1337 (m), 1278 (vs), 1255 (s), 1202 (w), 1141 (vs), 1046 (s), 1006 (w), 973 (w), 895 (vw), 869 (w), 830 (m), 819 (w), 774 (w), 752 (w), 696 (m), 665 (w), 640 (w), 623 (vw), 587 (vw), 520 (vw). PM (C<sub>44</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>): 692.80 u. MS (ESI) m/z: 693 (M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>, 100%).



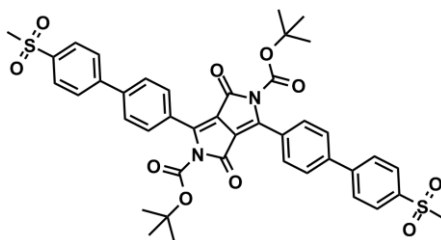
**Di-terz-butil 3,6-bis(4'-(metiltio)bifenil-4-il)-1,4-diossopirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1e)**

Il composto **1e** viene preparato secondo la procedura generica A, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore marrone (225 mg, resa: 99%). Mp: 190-192 °C (dec.). EA (calc.): C, 68.83; H, 5.50; N, 3.82; O, 13.10; S, 8.75 / (exp.): C, 68.70; H, 5.38; N, 3.87.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.84 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.69 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.58 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.34 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 2.54 (6H, s), 1.46 (18H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 162.2, 159.7, 157.7, 148.5, 145.9, 143.8, 139.2, 136.7, 129.3, 127.6, 126.7, 112.5, 109.6, 85.5, 27.8, 15.8. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (w, b), 2980 (w), 2918 (vw), 1737 (vs), 1714 (vs), 1619 (m), 1591 (m), 1482 (m), 1454 (w), 1429 (w), 1393 (w), 1365 (m), 1337 (w), 1317 (w), 1286 (vs), 1272 (s), 1255 (s), 1208 (w), 1141 (vs), 1096 (m), 1060 (vs), 1001 (w), 967 (vw), 892 (vw), 872 (vw), 844 (w), 813 (m), 777 (w), 758 (w), 727 (w), 707 (w), 671 (vw), 651 (vw), 492 (vw). PM ( $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ ): 732.91 u. MS (ESI)  $m/z$ : 733 ( $\text{M}^+ + \text{H}^+$ , 100%).



**Di-terz-butil 3,6-bis(4'-(metiltio)bifenil-4-il)-1,4-diossopirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1f)**

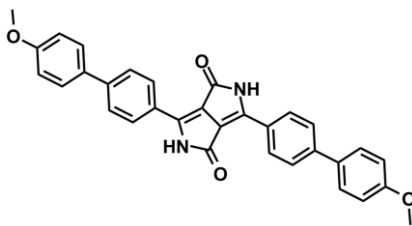
Il composto **1f** viene preparato secondo la procedura generica A, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro (147 mg, resa: 63%). Mp: 189-191 °C (dec.). EA (calc.): C, 76.57; H, 6.96; N, 3.72; O, 12.75 / (exp.): C, 76.39; H, 6.90; N, 3.65.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.84 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.72 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.60 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.50 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz), 1.45 (18H, s), 1.37 (18H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 159.8, 151.6, 148.5, 146.0, 144.3, 141.8, 137.2, 129.2, 127.0, 126.9, 126.1, 112.4, 85.4, 34.8, 31.5, 27.7. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (w, b), 2963 (m), 2868 (w), 1748 (s), 1714 (s), 1616 (s), 1605 (s), 1496 (m), 1474 (w), 1457 (w), 1393 (m), 1367 (m), 1334 (w), 1289 (s), 1278 (s), 1255 (s), 1205 (w), 1146 (vs), 1110 (m), 1057 (s), 1001 (w), 897 (vw), 872 (vw), 822 (s), 772 (w), 758 (w), 732 (vw), 699 (vw), 570 (vw). PM ( $\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_6$ ): 752.94 u. MS (ESI)  $m/z$ : 754 ( $\text{M}^+ + \text{H}^+$ , 100%).



**Di-terz-butil 3,6-bis(4'-(metilsolfonil)bifenil-4-il)-1,4-diossopirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (1g)**

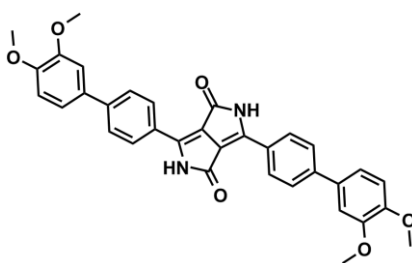
In un pallone ad un collo dotato di agitazione magnetica s'introduce **1e** (101 mg, 0.14 mmol),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (73 mg, 0.69 mmol) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL), quindi si aggiunge una soluzione di *m*CPBA 70% (136 mg, 0.55 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL) gocciolandola nell'arco di 15', a temperatura ambiente. Dopo 20' si effettua il work-up estraendo due volte con  $\text{H}_2\text{O}$ , seccando la fase organica su  $\text{MgSO}_4$ , infine rimuovendo il solvente a bassa pressione. Il prodotto viene purificato mediante lavaggi successivi con  $\text{CH}_3\text{CN}$  ed  $\text{H}_2\text{O}$ , e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore giallo (55 mg, resa: 50%). Mp: 182-184 °C (dec.). EA (calc.): C, 63.30; H, 5.06; N, 3.52; O, 20.08; S, 8.05 / (exp.): C, 63.08; H, 4.92; N, 3.55.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 8.05 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.89 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.83 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.75 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz), 3.11 (6H, s), 1.49 (18H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 159.4, 148.4, 145.8, 145.4, 142.2, 140.2, 129.5, 128.5, 128.3, 128.2, 127.5, 113.0, 109.6, 85.8, 44.8, 27.8. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3428 (w, b), 2980 (vw), 2924 (vw), 1745 (s), 1703 (s), 1613 (w), 1594 (w), 1516 (vw), 1488 (vw), 1393 (vw), 1367 (w), 1339 (w), 1306 (s), 1261 (w), 1213 (w), 1149 (vs), 1110 (w), 1065 (m), 1004 (w), 956 (w), 948 (w), 875 (vw), 830 (m), 777 (w), 744 (w), 721 (vw), 676 (vw), 556 (w), 539 (w), 517 (vw), 492 (vw), 447 (vw). PM ( $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$ ): 796.90 u. MS (ESI)  $m/z$ : 797 ( $\text{M}^+\text{H}^+$ , 100%).

**B) Procedura generica per l'ottenimento dei pigmenti DPP-derivati tramite irraggiamento termico(2 a-g).** In un pallone ad un collo dotato di bagno ad olio s'introduce il colorante Boc-protetto **1** (60 mg), che viene disciolto nel minor volume possibile di acetone. Questo viene subito rimosso a bassa pressione mediante evaporatore rotante, al fine di ottenere un film sottile di colorante sulla superficie del pallone. Si innalza la temperatura a 180 °C per 20', quindi si raffredda il composto a temperatura ambiente collegando il pallone ad una linea d'alto vuoto per 30'. Tutti i prodotti **2** vengono ottenuti con resa quantitativa. L'alta insolubilità di questa nuova serie di pigmenti rende impossibile una loro caratterizzazione mediante NMR, pertanto vengono riportati i dati di EA e di spettroscopia IR. Tutti i punti di fusione dei pigmenti **2** sono oltre i 350 °C.



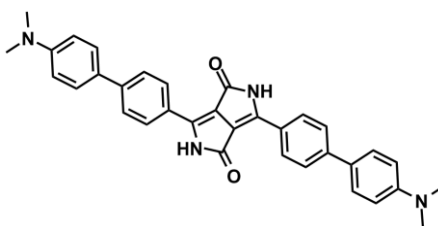
**3,6-bis(4'-metossibifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2a)**

Il composto **2a** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 76.78; H, 4.83; N, 5.60; O, 12.79 / (exp.): C, 76.53; H, 4.68; N, 5.64. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3422 (s, vb), 3126 (m), 1641 (vs), 1600 (vs), 1499 (m), 1437 (s), 1418 (s), 1250 (m), 1197 (w), 1177 (w), 1144 (w), 1032 (vw), 998 (vw), 850 (vw), 825 (m), 797 (w), 746 (w), 710 (w), 632 (vw), 595 (w). PM ( $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ ): 500.54 u.



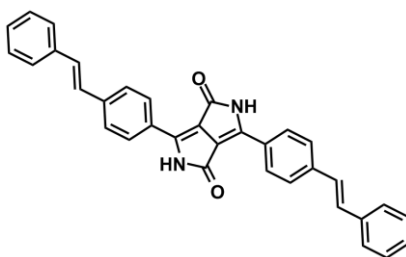
**3,6-bis(3',4'-dimetossibifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2b)**

Il composto **2b** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 72.84; H, 5.03; N, 5.00; O, 17.12 / (exp.): C, 72.93; H, 4.91; N, 5.06. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3406 (vs, vb), 1639 (vs), 1602 (s), 1502 (m), 1404 (vs, b), 1253 (w), 1219 (vw), 1200 (vw), 1141 (w), 1051 (vw), 1023 (vw), 1006 (vw), 878 (vw), 830 (w), 813 (w), 763 (w), 707 (w), 612 (w). PM ( $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ ): 560.60 u.



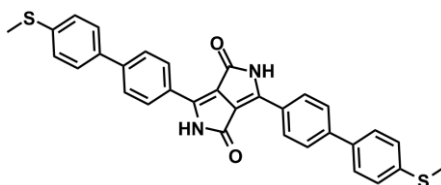
**3,6-bis(4'-(dimetilammino)bifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2c)**

Il composto **2c** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 77.54; H, 5.74; N, 10.64; O, 6.08 / (exp.): C, 77.31; H, 5.61; N, 10.48. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3400 (vs, vb), 1636 (vs), 1588 (vs), 1538 (m), 1502 (s), 1437 (vs), 1401 (vs), 1365 (vs), 1295 (w), 1197 (w), 1166 (w), 1141 (w), 1060 (vw), 1043 (vw), 1006 (vw), 945 (vw), 847 (vw), 811 (m), 769 (w), 746 (w), 699 (w), 632 (w), 581 (w). PM ( $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2$ ): 526.63 u.



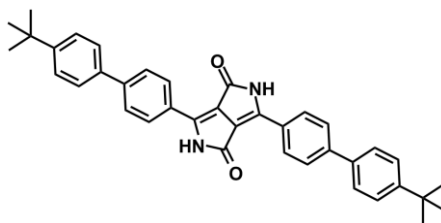
**3,6-bis(4-stirilfenil)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2d)**

Il composto **2d** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 82.91; H, 4.91; N, 5.69; O, 6.50 / (exp.): C, 82.99; H, 4.84; N, 5.77. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (m, vb), 3131 (w), 3025 (w), 2840 (w), 1636 (vs), 1597 (vs), 1546 (w), 1513 (w), 1490 (w), 1448 (m), 1406 (m), 1331 (w), 1194 (w), 1141 (w), 1068 (vw), 1034 (vw), 962 (w), 951 (w), 864 (vw), 822 (w), 800 (w), 755 (w), 688 (w), 660 (w), 626 (w), 573 (w), 525 (w), 436 (vw). PM ( $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ ): 492.57 u.



**3,6-bis(4'-(metiltio)bifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2e)**

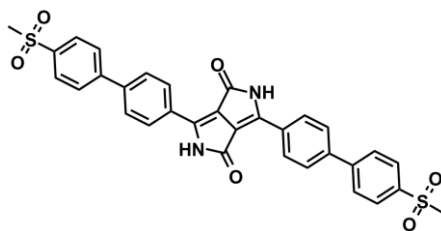
Il composto **2e** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 72.15; H, 4.54; N, 5.26; O, 6.01; S, 12.04 / (exp.): C, 71.93; H, 4.42; N, 5.17. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3428 (w, b), 3120 (w), 2974 (w), 2840 (w), 1639 (vs), 1602 (vs), 1516 (w), 1482 (m), 1437 (s), 1406 (m), 1317 (w), 1197 (w), 1141 (m), 1093 (w), 1040 (vw), 998 (w), 850 (w), 813 (m), 758 (w), 744 (w), 721 (w), 674 (w), 632 (vw), 520 (w), 433 (vw). PM ( $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ ): 532.68 u.



**3,6-bis(4'-terz-butilbifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2f)**

Il composto **2f** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 82.58; H, 6.57; N, 5.07; O, 5.79 / (exp.): C, 82.39; H, 6.35; N, 5.00. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (b, w), 3137 (w), 2957 (s), 2901 (w), 2862 (w), 1639 (vs), 1602 (vs), 1499 (m), 1446 (w), 1409 (w), 1384 (w), 1362 (w), 1323 (w), 1267 (vw), 1194 (w), 1141 (w), 1110 (w), 1043 (vw), 1001 (vw), 853 (vw),

819 (s), 755 (w), 682 (w), 626 (vw), 567 (vw), 514 (vw), 467 (vw). PM ( $C_{38}H_{36}N_2O_2$ ): 552.70 u.



**3,6-bis(4'-(metilsolfonil)bifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (2g)**

Il composto **2g** viene preparato secondo la procedura generica B, e si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso scuro. EA (calc.): C, 64.41; H, 4.05; N, 4.69; O, 16.09; S, 10.75 / (exp.): C, 64.53; H, 3.96; N, 4.71. IR (KBr),  $cm^{-1}$ : 3434 (w, b), 3131 (w), 3014 (w), 2924 (w), 2845 (vw), 1641 (vs), 1605 (s), 1572 (w), 1521 (w), 1488 (w), 1446 (w), 1409 (w), 1300 (m), 1200 (vw), 1146 (vs), 1090 (w), 1040 (vw), 1001 (vw), 965 (w), 822 (m), 780 (s), 744 (w), 674 (w), 629 (vw), 562 (m), 545 (w), 514 (w), 483 (vw). PM ( $C_{32}H_{24}N_2O_6S_2$ ): 596.67 u.

## Appendice A – Dati inerenti al calcolo di $\epsilon$

Le tabelle seguenti riportano, per ciascun composto sintetizzato, la concentrazione delle varie soluzioni analizzate per l'estrapolazione di  $\epsilon$ , i valori di assorbanza registrati alla  $\lambda_{\max}$  ed i valori di  $\epsilon$  ricavati mediante estrapolazione con il relativo coefficiente di determinazione  $R^2$ .

Prodotto #	$\lambda_{\max}$ (nm)	c (mol/L)	A (nm)	$\epsilon$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	$R^2$
1a	468	1.57E-05	0.2743	17372 ~ 17400	0.9991
		2.62E-05	0.4571		
		3.66E-05	0.6495		
		4.71E-05	0.8181		
		5.76E-05	0.9898		
1b	472	1.45E-05	0.2708	18525 ~ 18500	0.9980
		2.41E-05	0.4474		
		3.37E-05	0.6441		
		4.34E-05	0.7881		
		5.30E-05	0.9812		
1c	518	1.44E-05	0.2058	15396 ~ 15400	0.9952
		2.41E-05	0.3766		
		3.37E-05	0.5183		
		4.33E-05	0.6898		
		5.30E-05	0.7992		
1d	479	1.44E-05	0.2413	17400 ~ 17400	0.9972
		2.41E-05	0.4091		
		3.37E-05	0.5912		
		4.33E-05	0.7364		
		5.29E-05	0.9386		
1e	469	1.43E-05	0.3934	28696 ~ 28700	0.9967
		2.39E-05	0.6868		
		3.34E-05	0.9401		
		4.30E-05	1.2084		
		5.25E-05	1.5441		
1f	463	1.33E-05	0.44908	34198 ~ 34200	0.9874
		1.77E-05	0.62374		
		2.21E-05	0.71513		
		2.66E-05	0.93781		
		3.10E-05	1.05632		
1g	451	1.25E-05	0.2872	23288 ~ 23300	0.9904
		2.09E-05	0.5179		
		2.93E-05	0.6802		
		3.76E-05	0.9087		
		4.60E-05	1.0337		

Tabella A1: Dati relativi al calcolo di  $\epsilon$  per i coloranti **1 (a-g)**.

Prodotto #	$\lambda_{\max}$ (nm)	c (mol/L)	A (nm)	$\epsilon$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
2a	541	4.69E-06	0.11449	n.d.	n.d.
		9.39E-06	0.16387		
		1.41E-05	0.21546		
		1.88E-05	0.25957		
		2.35E-05	0.27742		
2b	543	1.25E-05	0.21761	15306 ~ 15300	0.9968
		2.50 E-05	0.39662		
		3.75E-05	0.57734		
		4.99E-05	0.76234		
		6.24E-05	0.94383		
2c	566	2.94E-06	0.11363	31215 ~ 31200	0.9976
		1.18E-05	0.41131		
		2.35E-05	0.74560		
		3.53E-05	1.09191		
		4.71E-05	1.46030		
2d	564	3.15E-06	0.13768	35825 ~ 35800	0.9944
		1.26E-05	0.51978		
		2.52E-05	0.95430		
		3.78E-05	1.33210		
		5.03E-05	1.77428		
2e	544	2.80 E-06	0.09540	n.d.	n.d.
		5.59E-06	0.11034		
		8.39E-06	0.12686		
		1.12E-05	0.14050		
		1.40 E-05	0.15867		
2f	536	2.99E-06	0.17422	47.559 ~ 47600	0.9979
		5.97E-06	0.31736		
		1.19E-05	0.59641		
		2.39E-05	1.13843		
		3.58E-05	1.68429		
2g	540	2.68E-06	0.14175	46381 ~ 46400	0.9921
		1.25E-05	0.48413		
		2.09E-05	0.93663		
		2.93E-05	1.35457		
		3.76E-05	1.79871		

Tabella A2: Dati relativi al calcolo di  $\epsilon$  per i pigmenti 2 (a-g).



## BIBLIOGRAFIA

- 1 Hao, Z.; Iqbal A. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 203-213.
- 2 Baccheschi, E.; Dufour Bozzo, C.; Franchini Guelfi, F.; Gallo Colonna, G.; Gavazza, E.; Giubbini, G.; Leva Pistoì, M.; Parma Armani, E.; Pesenti, F. R.; Sborgi, F. "Le Tecniche Artistiche", ed. Mursia, Milano, **1973**, 309-335.
- 3 Plinio "Naturalis Historia", XXXV, 7, 50; ed. Teubner.
- 4 Vitruvio "De Architectura", VII, 7 e sgg., ed. Teubner.
- 5 Brandi C. "Teoria del Restauro", ed. Einaudi, Roma, **1963**, 1-20.
- 6 (a) Smith H. M. (editor) "High Performance Pigments", ed. Wiley-VCH, Weinheim (Germany), **2002**, 127-308. (b) <http://www.handprint.com/HP/WCL/pigmt1d.html>
- 7 <http://www.european-coatings.com/Markets-Companies/Raw-Materials-Market/High-performance-pigments-a-global-market-forecast>
- 8 Farnum, D. G.; Mehta, G.; Moore, G. G. I.; Siegal, F. P. *Tetrahedron Letters* **1974**, 29, 2549-2552.
- 9 Semyonov, A. N. "Design Synthesis and Characterization of Fluorescent Dyes and Liquid Crystal Semiconductors", Kent State University, **2006**, 1-115.
- 10 Closs, F.; Gompper, R. *Angew. Chem.* **1987**, 26(6), 552-554.
- 11 Langhals, H.; Grundei, Th.; Potrawa, Th.; Polborn, K. *Liebigs Ann.* **1996**, 679-682.
- 12 (a) Pfenninger, J.; Iqbal, A.; Rochat, A. C.; Wallquist, O. *US Patent* **1986**, PN: 4778899. (b) Pfenninger, J.; Iqbal, A.; Rochat, A. C. *US Patent* **1986**, PN: 4749795.
- 13 Morton, C. J. H.; Gilmour, R.; Smith, D. M.; Loghtfoot, P.; Slawin, A. M. Z.; MacLean, E. J. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5547-5565.
- 14 Chamberlain, T. R.; Thornley, C. *US Patent* **2002**, PN 6388093.
- 15 (a) Gendron, D.; Leclerc, M. *Energy & Environmental Science* **2011**, 4, 1225-1237. (b) Walker, B.; Kim, C.; Nguyen, T. Q. *Chem. Mater.* **2011**, 23, 470-482.
- 16 (a) Zhou, E.; Wei, Q.; Yamakawa, S.; Zhang, Y.; Tajima, K.; Yang, C.; Hashimoto, K. *Macromolecules* **2010**, 43, 821-826. (b) Sharma, S. S.; Sharma, G. D.; Mikroyannidis, J. A. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2011**, 95, 1219. (c) Zhang, G.; Fu, Y.; Xie, Z.; Zhang, Q. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2011**, 95, 1168. (d) Zhao, G.; He, Y.; He, C.; Fan, H.; Zhao, Y.; Li, Y. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2011**, 95, 704. (e) Qu, S.; Tian, H. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3039. (f) Lee, W.-H.; Son, S. K.; Kim, K.; Lee, S. K.; Shin, W. S.; Moon, S.-J.; Kang, I.-N. *Macromolecules* **2012**, 45, 1303-1312. (g) Bronstein, H.; Chen, Z.; Ashraf, R. S.; Zhang, W.; Du, J.; Durrant, J. R.; Tuladhar, P. S.; Song, K.; Watkins, S. E.; Geerts, Y.; Wienk, M. M.; Janssen, R. A. J.; Anthopoulos, T.; Sirringhaus, H.; Heeney, M.; McCulloch, I. J. *Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3272-3275. (h) Karsten, B. P.; Bijleveld, J. C.; Janssen, R. A. J. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, 31, 1554-1559. (i) Ripaud, E.; Demeter, D.; Rousseau, T.; Boucard-Cétol, E.; Allain, M.; Po, R.; Leriche, P.; Roncali, J. *Dyes Pigment.* **2012**, 95, 126-133.
- 17 (a) Guo, F.; Qu, S.; Wu, W.; Li, J.; Ying, W.; Hua, J. *Synth. Met.* **2010**, 160, 1767-1773. (b) Qu, S. Y.; Wu, W. J.; Hua, J. L.; Kong, C.; Long, Y. T.; Tian, H. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 1343-1349. (c) Murphree, S. S. in *Progress in Heterocyclic Chemistry* **2011**, 22, 21. (d) Zhou, E.; Yamakawa, S.; Tajima, K.; Yang, C.; Hashimoto, K. *Chem. Mater.* **2009**, 21, 4055-4061. (e) Zou, Y.; Gendron, D.; Neagu-Plesu, R.; Leclerc, M. *Macromolecules* **2009**, 42, 6361-6365. (f) Warnan, J.; Favereau, L.; Pellegrin, Y.; Blart, E.; Jacquemin, D.; Odobel, F. J. *Photochem. Photobiol. A* **2011**, 226, 9-15. (g) Tang, J.; Qu, S.; Hu, J.; Wu, W.; Hua, J. *Sol. Energy* **2012**, 86, 2306-2311.
- 18 <http://www.zeroemission.eu/portal/news/topic/Ricerca/id/14946/Fotovoltaiico-lefficienza-della-cella-di-Gr%C3%tzel-schizza-al-123>
- 19 [http://www.expo clima.net/focus/aziende/tecnologia\\_delle\\_celle\\_pluto\\_il\\_fotovoltaiico\\_di\\_nuova\\_generazione.htm](http://www.expo clima.net/focus/aziende/tecnologia_delle_celle_pluto_il_fotovoltaiico_di_nuova_generazione.htm)
- 20 (a) Bijleveld, C.; Karsten, B. P.; Mathijssen, S. G. J.; Wienk, M. M.; de Leeuw, D. M.; Janssen, R. A. J. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 1600-1606. (b) Chen, L.; Xu, H.; Yang, L. G.; Zhang, G. Q.; Li, Y.; Wang, M.; Chen, H. Z. *Journal of Physics D, Applied Physics* **2011**, 44. (c) Li, Y. N.; Sonar, P.; Singh, S. P.; Soh, M. S.; van Meurs, M.; Tan, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 2198-2204. (d) Mei, J. G.; Graham, K. R.; Stalder, R.; Tiwari, S. P.; Cheun, H.; Shim, J.; Yoshio, M.; Nuckolls, C.; Kippelen, B.; Castellano, R. K.; Reynolds, J. R. *Chem. Mater.* **2011**, 23, 2285-2288. (e) Zhang, Y.; Kim, C.; Lin, J.; Nguyen, T. Q. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 22, 97-105. (f) Wang, X.; Luo, H.; Sun, Y.; Zhang, M.; Li, X.; Yu, G.; Liu, Y.; Li, Y.; Wang, H. J. *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2012**, 50, 371-377. (g) Qiao, Y.; Guo, Y.; Yu, C.; Zhang, F.; Xu, W.; Liu, Y.; Zhu, D. J. *Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4084-4087. (h) Chen, Z.; Lee, M. J.; Shahid Ashraf, R.; Gu, Y.;

- Albert-Seifried, S.; Meedom Nielsen, M.; Schroeder, B.; Anthopoulos, T. D.; Heeney, M.; McCulloch, I.; Sringhaus, H. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 647-652.
- 21 (a) Fukuda, M.; Kodama, K.; Yamamoto, H.; Mito, K. *Dyes Pigm.* **2002**, *53*, 67-72. (b) Fukuda, M.; Kodama, K.; Yamamoto, H.; Mito, K. *Dyes Pigm.* **2004**, *63*, 115-125.
- 22 (a) Qiao, Z.; Peng, J.; Jin, Y.; Liu, Q.; Weng, J.; He, Z.; Han, S.; Cao, D. *Polymer* **2010**, *51*, 1016-1023. (b) Wu, Z.; Fan, B.; Li, A.; Xue, F.; Ouyang, J. *Org. Electron.* **2011**, *12*, 993. (c) Cao, D.; Liu, Q.; Zeng, W.; Han, S.; Peng, J.; Liu, S. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 2395-23405. (d) Kuehne, A. J. C.; Mackintosh, A. R.; Pethrick, R. A.; Tieke, B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4722-4724. (e) Qiao, Z.; Cao, D. R.; Liu, Q. L.; Weng, J. N.; He, Z. C.; Han, S. H.; Peng, J. B. *Sci. China, Ser. B Chem.* **2009**, *52*, 2038-2042.
- 23 (a) Mizuguchi, J.; Imoda, T.; Takahashi, H.; Yamakami, H. *Dyes Pigm.* **2006**, *68*, 47-52. (b) Qu, Y.; Hue, J. L.; Tian, H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3320-3323. (c) Kuwabara, J.; Yamagata, T.; Kanbara, T. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3736-3741. (d) Yamagata, T.; Kuwabara, J.; Kanbara, T. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 1596-1599. (e) Deng, L.; Wu, W.; Guo, H.; Zhao, J.; Ji, S.; Zhang, X.; Yuan, X.; Zhang, C. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*(22), 9294-9304.
- 24 (a) Fischer, G. M.; Isomäki-Kron Dahl, M.; Göttker-Schnetmann, I.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4857-4864. (b) Fischer, G. M.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1406-1409. (c) Fischer, G. M.; Ehlers, A. P.; Zumbusch, A.; Daltrozzo, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3750-3753. (d) Wiktorowski, S.; Fischer, G. M.; Winterhalder, M. J.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*(8), 2921-2928.
- 25 Mollet, H.; Grunbenmann, A. "Formulation Technology: Emulsions, Suspensions, Solid Forms", ed. Wiley-VCH, **2001**, 399-420.
- 26 Tieke, B.; Rabindranath, A. R.; Zhang, K.; Zhu, Y. *J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 830-845.
- 27 Smith H. M. (editor) "High Performance Pigments", ed. Wiley-VCH, Weinheim (Germany), **2002**, 127-308.
- 28 Wallquist, O. *Diketopyrrolopyrrole (DPP) pigments* in "High Performance Pigments", ed. Wiley-VCH, Weinheim (Germany), **2002**, 159-184.
- 29 Zambounis, J. S.; Hao, Z.; Iqbal, A. *European Patent* "Pyrrolo[3,4-c]pyrroles" **1995**, EP0648770.
- 30 Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- 31 Zambounis, J. S.; Hao, Z.; Iqbal, A. *Nature* **1997**, *388*, 131.
- 32 (a) Zambounis, J. S.; Hao, Z.; Iqbal, A. *European Patent* "Pyrrolo[3,4-c]pyrroles" **1996**, U.S. Patent 5484943. (b) Zambounis, J. S.; Hao, Z.; Iqbal, A. "Pyrrolo[3,4-c]pyrrole synthesis" **1997**, U.S. Patent 5616725. (c) Basel, Y.; Hassner, A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6368-6380 (per una trattazione dettagliata sul meccanismo di reazione tra ammine secondarie e sistema Boc<sub>2</sub>O-DMAP).
- 33 Ichimura, K.; Arimitsu, K.; Tahara, M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1164-1172.
- 34 Fukuda, M.; Kodama, K.; Yamamoto, H.; Mito, K. *Dyes Pigm.* **2004**, *63*, 115-125.
- 35 Guo, E. Q.; Ren, P. H.; Zhang, Y. L.; Zhang, H. C.; Yang, W. J. *Chem. Commun.* **2009**, 5859-5861.
- 36 Littke, A. F.; Fu, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3387-3388.
- 37 (a) Wong, M. S.; Zhang, X. L. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 4087-4089. (b) Operamolla, A.; Omar, O. H.; Babudri, F.; Farinola, G. M.; Naso, F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 10272-10275.
- 38 Stokes, G. G. *Phil. Tans. R. Soc. London* **1852**, *142*, 463-562.
- 39 (a) Friedel, R. A.; Orchin, M. "Ultraviolet spectra of aromatic compounds", ed. Wiley, New York, **1951**. (b) Hirayama, K. "Handbook of UV & visible absorption spectra of organic compounds", Plenum Press, **1967**. (c) Sadtler "Handbook of UV spectra", Heyden, London, **1979**. (d) Scott, A. J. "Interpretation of UV spectra of natural products", Pergamon Press, London, **1964**. (e) Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1123. (f) Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 72.
- 40 Mizuguchi J. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1817-1821.
- 41 (a) Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller, J. N. *Analyst* **1983**, *108*, 1067. (b) Crosby, G. A.; Demas, J. N. *J. Phys. Chem. Review.* **1971**, *75*(8), 991-1024.
- 42 (a) Umberger, J. Q.; Lamer, V. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 1099-1109. (b) Karstens, T.; Kobs, K. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1871.
- 43 Dhami, S.; de Mello, A. J.; Rumbles, G.; Bishop, S. M.; Phillips, D.; Beeby, A. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 341.
- 44 (a) Yang, Z.-C.; Wang, M.; Yong, A. M.; Wong, S. Y.; Zhang, X.-H.; Tan, H.; Chang, A. Y.; Li, X.; Wang, J. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 11615-11617. (b) Colonna, G.; Pilati, T.; Rusconi, F.; Zecchi, G. *Dyes Pigm.* **2007**, *75*, 125-129.
- 45 Kapanidis, A. N.; Weiss, S. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10953.

- 46 Rochat, A. C.; Wallquist, O.; Iqbal, A.; Mizuguchi, J. *Eur. Pat.* **1990**, EP353184A.
- 47 Beninatto, R.; Borsato, G.; De Lucchi, O.; Fabris, F.; Lucchini, V.; Zendri, E. *Dyes Pigm.* **2013**, *96*, 679-685.
- 48 Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
- 49 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- 50 (a) Guo, E. Q.; Ren, P. H.; Zhang, Y. L.; Zhang, H. C.; Yang, W. J. *Chem. Commun.* **2009**, 5859-5861. (b) Cao, D.; Liu, Q.; Zeng, W.; Han, S.; Peng, J.; Liu, S. *Macromolecules* **2006**, *39*, 8347-8355. (c) Rabindranath, A. R.; Zhu, Y.; Heim, I.; Tieke, B. *Macromolecules* **2006**, *39*, 8250-8256.

## 2. DA PIGMENTO A POLIMERO SUPRAMOLECOLARE



## 2.1. Introduzione: i polimeri supramolecolari<sup>1</sup>

Wallace H. Carothers nel suo storico articolo intitolato “*Polymerization*”, in *Chemical Reviews* del 1931, espresse le sue brillanti idee sulla rapida diffusione dei polimeri di sintesi.<sup>2</sup> Solo qualche anno dopo l'accettazione della teoria di Hermann Staudinger, secondo cui le sostanze polimeriche sono lunghe catene di piccole unità molecolari ripetenti legate tramite legami covalenti,<sup>3</sup> Carothers classificò le macromolecole a seconda del tipo di composti che erano capaci di polimerizzare, e a seconda del tipo di polimerizzazione.

Con l'aumentare delle tipologie di polimeri sintetizzate, anche le interazioni tra le macromolecole sono diventate ugualmente importanti per spiegare le proprietà di un materiale a livello molecolare. La coscienza dell'importanza delle interazioni supramolecolari nella scienza dei polimeri risale ai primi polimeri di sintesi, come ad esempio il *nylon* (vedi figura 2.1), le cui proprietà derivano principalmente dalla formazione di legami a idrogeno.

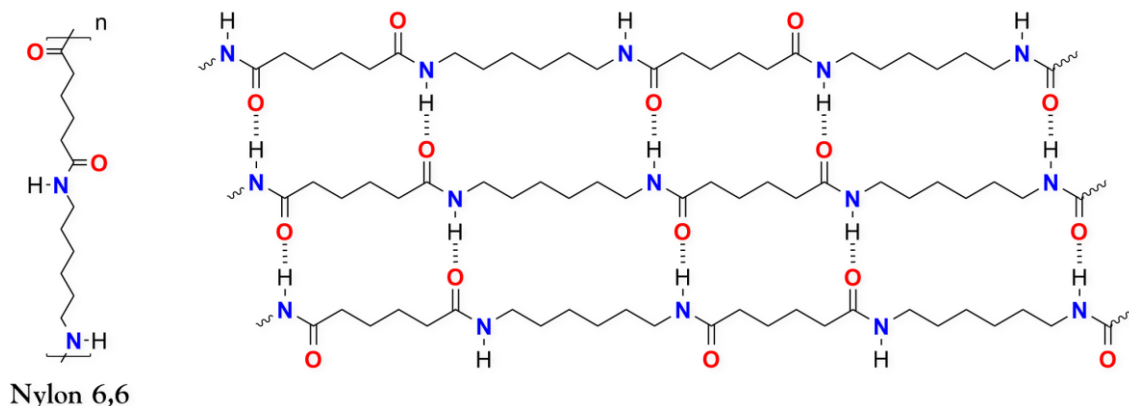
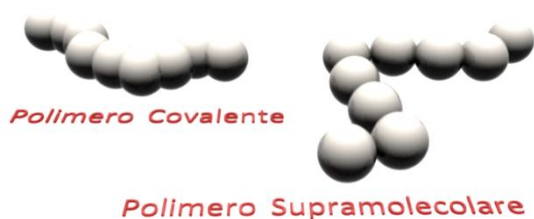


Figura 2.1: Struttura monomerica del Nylon e formazione delle interazioni a idrogeno.

Dalla letteratura recente si possono ricavare numerosi esempi di strutture in grado di costituire architetture polimeriche sulla base di combinazioni d'interazioni supramolecolari.<sup>4</sup> Solo dopo un'accurata progettazione di monomeri legati tramite interazioni non covalenti multiple si sono ottenuti sistemi aventi caratteristiche polimeriche sia in soluzione che allo stato solido. Oggi i polimeri supramolecolari si sono affermati come un nuovo paradigma nel campo della scienza dei polimeri.

Per quanto sopra premesso, i polimeri supramolecolari (SP) sono una classe di polimeri che si distingue da quella dei polimeri covalenti (CP), poiché le unità monomeriche sono tenute assieme da interazioni secondarie direzionali e reversibili, come legame a idrogeno, interazioni di *stacking*  $\pi$ - $\pi$ , interazioni idrofobiche o interazioni di tipo metallo-legante. In figura 2.2 viene rappresentata simbolicamente la principale differenza fra le due tipologie di macromolecole descritte. Un polimero supramolecolare acquista le proprietà chimico-fisiche tipiche di una macromolecola covalente quando i legami covalenti che tengono unite insieme le unità monomeriche vengono sostituiti da interazioni non-covalenti altamente direzionali e molto forti. Se queste sono in grado di generare polimeri ad alto peso molecolare, allora un meccanismo generico di *self-assembly* viene chiamato più propriamente “polimerizzazione supramolecolare”.<sup>1a</sup>



**Figura 2.2:** Rappresentazione schematica di un CP e di un SP.

La natura del legame che tiene assieme le unità monomeriche si riflette anche sul meccanismo di formazione di CP e SP. Nel primo caso le reazioni avvengono per lo più in controllo cinetico, in quanto il potenziale della reazione di depolimerizzazione è molto più grande di quello della polimerizzazione. Nel secondo caso invece si è sempre in controllo termodinamico e il numero di unità ripetenti (detto *degree of polymerization* – DP), è direttamente legato al valore della costante di equilibrio, che dev'essere necessariamente il più alto possibile (vedi figura 2.3).



**Figura 2.3:** Meccanismo di formazione generico per CP e SP.

Poiché per i SP il processo di polimerizzazione avviene in controllo termodinamico, variazioni di concentrazione o di temperatura si riflettono in modo marcato sul valore del DP: soluzioni concentrate e basse temperature produrranno dunque DP sempre elevati.

Dall'analisi di queste marcate differenze si può estrapolare l'obiettivo principale di questo settore di ricerca: combinare le proprietà chimico-fisiche dei CP alla reversibilità tra unità monomeriche, tipica delle interazioni supramolecolari. I parametri architetturali e dinamici che determinano le proprietà polimeriche come il DP, il tempo di vita della catena, e la sua conformazione, sono funzione della forza dell'interazione non-covalente, che può essere modificata in maniera reversibile. Ciò consente di produrre materiali con potenzialità di lavorazione insospettabili per i polimeri convenzionali, e con proprietà innovative e affascinanti come l'auto-riparazione.

### 2.1.1 Tipologie di polimeri supramolecolari

#### a) Legame a idrogeno

I legami a idrogeno occupano un posto prominente nella chimica supramolecolare per la loro “direzionalità” e versatilità.<sup>5</sup> In un polimero supramolecolare è necessaria però una cooperazione tra interazioni non-covalenti per ottenere *DP* significativi, e ciò si traduce in legami a idrogeno multipli (di seguito descritti) oppure in una cooperazione tra legami a idrogeno e forze addizionali.

Un valido metodo per aumentare la forza dell'interazione a idrogeno consiste nel combinare più legami nella stessa unità funzionale, mentre utilizzare un particolare arrangiamento dei siti ne accresce la specificità. La forza dei legami a idrogeno singoli dipende fondamentalmente dalla natura del donatore e dell'accettore, sebbene sia influenzata anche dal solvente. È stato dimostrato che il particolare arrangiamento di siti donatori e accettori vicini è un fattore addizionale che influenza significativamente la forza dell'interazione non covalente. Il fenomeno è stato osservato la prima volta per l'associazione lineare di siti a tre legami a idrogeno (vedi figura 2.4).

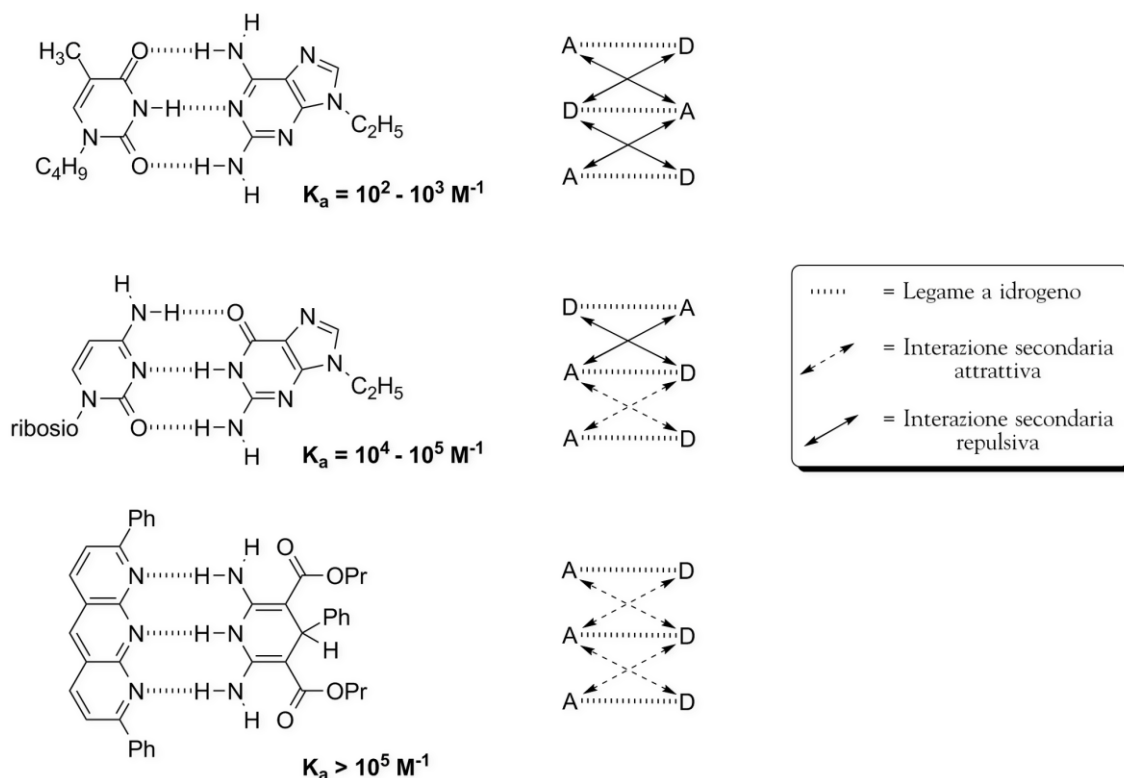


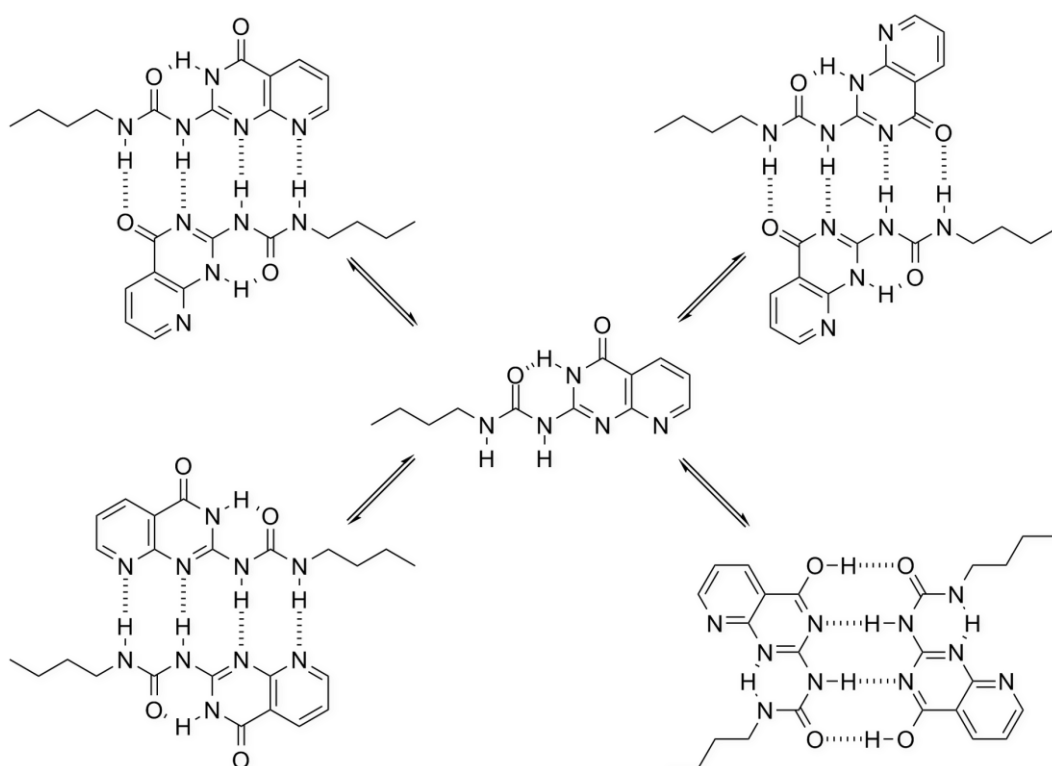
Figura 2.4: Stabilità di complessi con differenti motivi di legami a idrogeno.

Mentre per complessi caratterizzati dai motivi ADA – DAD (D: donatore, A: accettore) si ha una costante d'associazione attorno a  $10^2 M^{-1}$  in cloroformio, questo valore sale attorno a  $10^4 M^{-1}$  in complessi con motivo DAA – DDA, mentre allineamenti AAA e DDD mostrano costanti di associazione che superano anche i  $10^5 M^{-1}$ . Questo effetto dipende



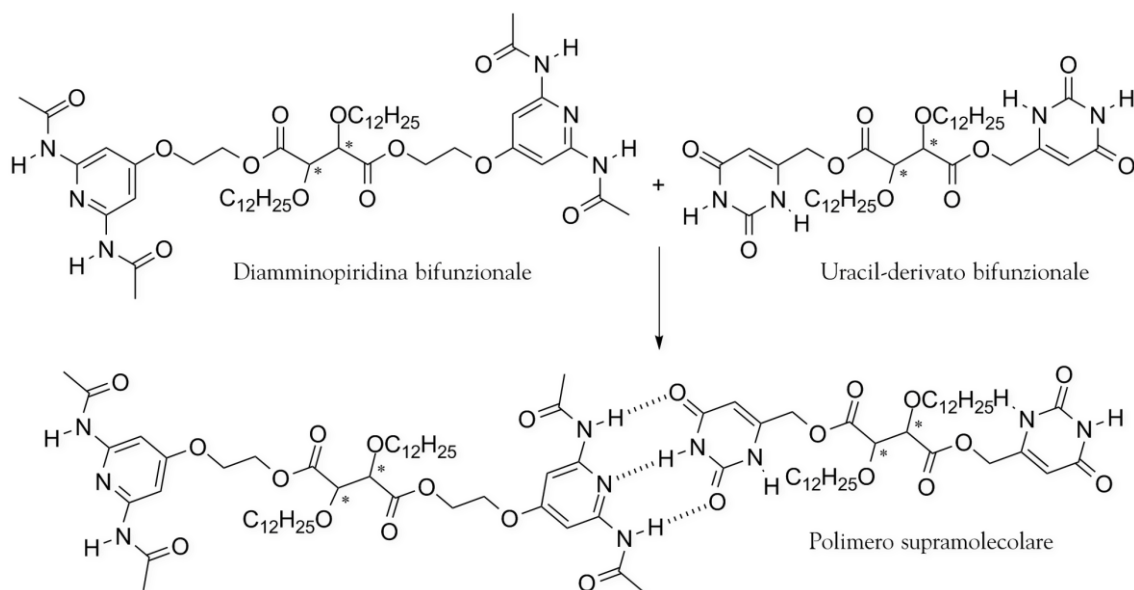
da differenze nelle interazioni secondarie tra questi motivi: siti diagonalmente opposti si respingono elettrostaticamente quando sono dello stesso tipo (entrambi donatori o accettori), mentre siti differenti si attraggono. In un motivo AAA – DDD il numero d'interazioni secondarie attrattive è massimizzato, mentre in un motivo ADA – DAD è il numero d'interazioni repulsive ad essere elevato (vedi figura 2.4).<sup>6</sup>

Utilizzando unità legate da quattro legami a idrogeno si ottengono interazioni molto stabili (vedi figura 2.5).<sup>7</sup> Gli aspetti che assumono un'importanza rilevante rispetto all'applicazione come polimeri supramolecolari sono l'auto-complementarietà dei motivi DADA e DDAA e la possibilità di tautomerismo. Quest'ultimo può portare alla perdita dell'interazione quando viene persa la complementarietà, o quando un motivo DDAA tautomerizza in DADA con un numero maggiore d'interazioni secondarie repulsive.



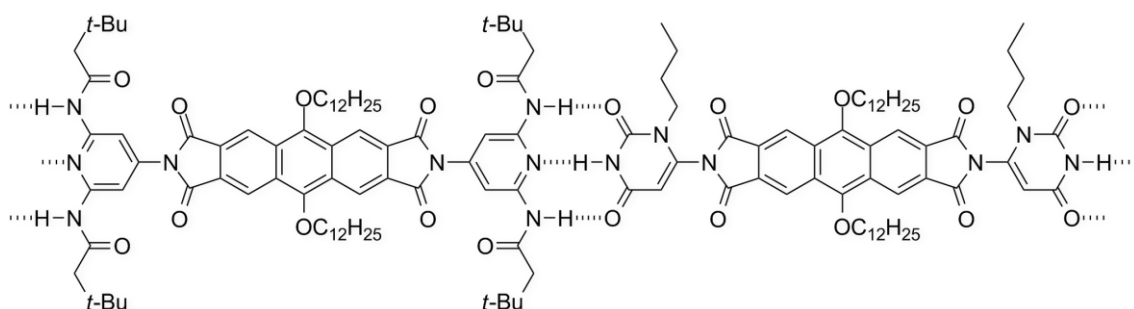
**Figura 2.5:** Unità di diammino-triazina che dimerizza con quattro legami a idrogeno.

Il gruppo di ricerca che per primo ha progettato e sintetizzato i polimeri supramolecolari è stato quello di Lehn: mediante legami a idrogeno tripli tra diammino-piridine bifunzionali e derivati di uracili bifunzionali si sono creati polimeri supramolecolari con valori di *DP* accettabili (fig. 2.6).<sup>8</sup> Grazie alla chiralità dello spaziatore utilizzato (acido tartarico), le fibre di polimero dimostrano una parziale elicità.<sup>9</sup>



**Figura 2.6:** Polimero supramolecolare LC, sviluppato da Lehn, basato su legami a idrogeno tripli.

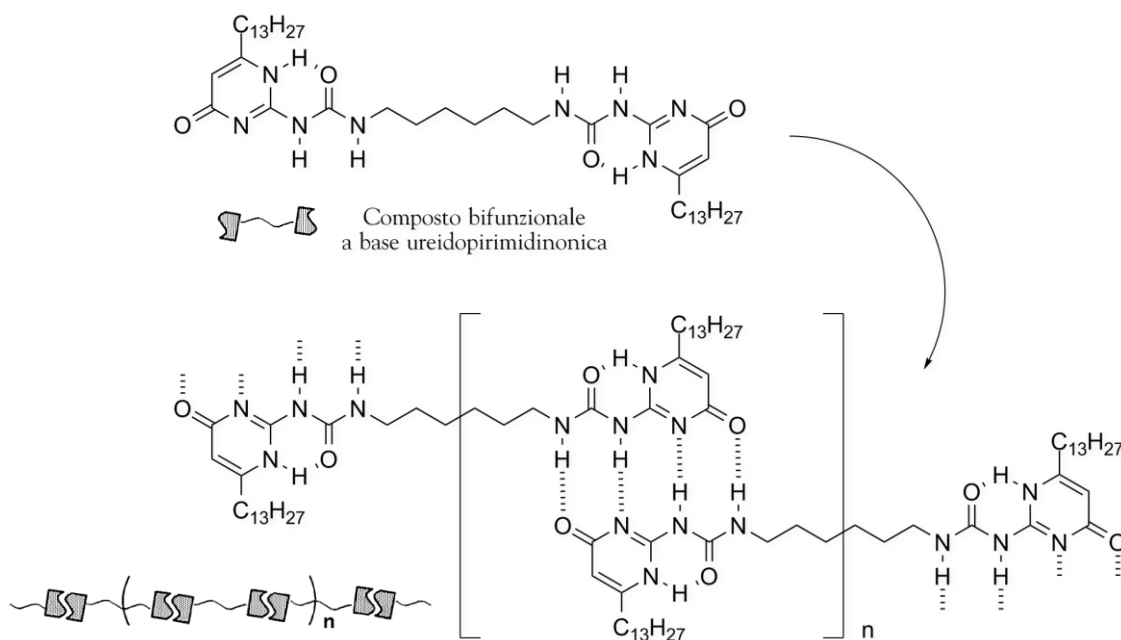
Il gruppo di Lehn ha successivamente ampliato il campo di applicazione dei polimeri supramolecolari attraverso lo sviluppo di polimeri a bastoncino rigidi (vedi figura 2.7).<sup>10</sup> In questi polimeri, un “core” rigido di 9,10-dialchilossiantracene connette i gruppi legati a idrogeno mediante gruppi immidici.



**Figura 2.7:** Polimero supramolecolare LC, originato da monomeri rigidi.

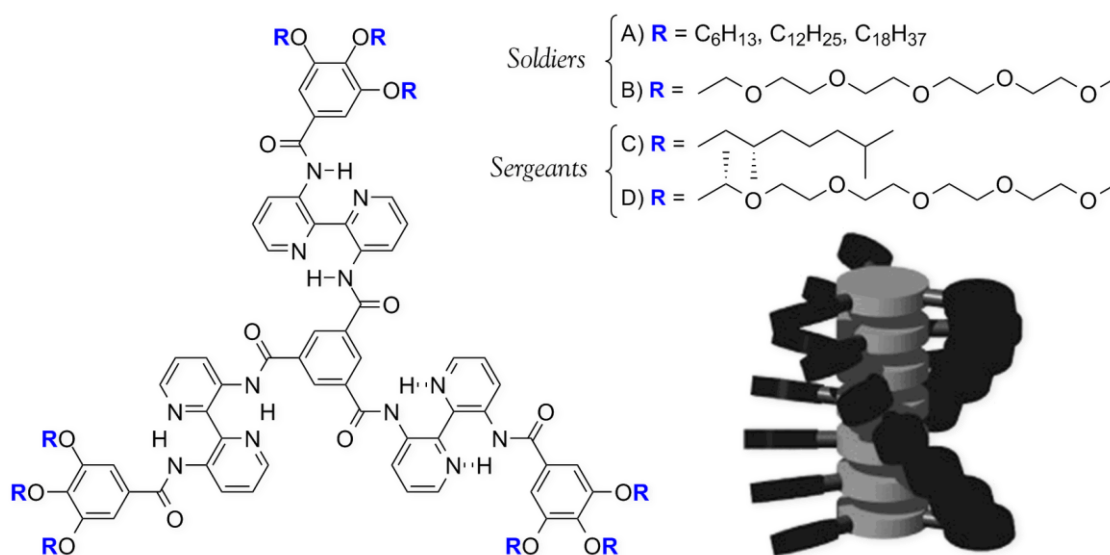
Il maggior impulso nella produzione e studio dei polimeri supramolecolari si deve però certamente al gruppo di ricerca olandese di E. W. Meijer. Nella seconda metà degli anni '90 tale gruppo ha sintetizzato il primo polimero supramolecolare in grado di organizzarsi con *DP* confrontabili con quelli dei polimeri covalenti, avente un'architettura strutturale basata sull'ureidopirimidinone.<sup>11</sup> Composti bifunzionali aventi due unità pirimidiniche (vedi figura 2.8) formano catene polimeriche lunghe e molto stabili sia in soluzione che allo stato solido: dissolvendone una piccola quantità in cloroformio si ottengono infatti soluzioni ad alta viscosità.<sup>1</sup> Partendo da monomeri ben purificati si ottengono, infatti, lunghe catene di polimero, mentre la presenza d'impurità monofunzionali porta ad un abbassamento del *DP*, poiché esse agiscono da *stoppers* di catena.

<sup>1</sup> L'unità ureidopirimidinonica dimerizza con una costante d'associazione pari a  $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  in  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 2.8:** Formazione di un polimero reversibile o di una rete supramolecolare.

Le molecole raffigurate in figura 2.9 possono potenzialmente raggiungere un elevato *DP* ad architettura ben definita in tutti i tipi di solvente. Sono infatti caratterizzate da un centro aromatico molto grande, e da una struttura con interazioni a idrogeno intermolecolari. Le molecole discotiche rigide<sup>12</sup> A e B formano strutture polimeriche a cono rigido con grandi *DP* in soluzioni molto diluite ( $10^{-6}$  in esano), grazie alla costante di associazione molto grande ( $10^8$  L/mol).<sup>13</sup> Le interazioni aggiuntive di *stacking* ottimizzate danno quindi origine ad una colonna elicale.



**Figura 2.9:** Molecole discotiche a simmetria  $C_3$  con catene laterali chirali e achirali.

Questo tipo di polimero ha permesso di verificare il fenomeno di amplificazione della chiralità noto come “*sergeant and soldier effect*”.<sup>14</sup> Le molecole sono cioè in grado di organizzarsi lungo un asse preferenziale formando con la porzione periferica una triplice elica.

L'andamento destrorso o sinistrorso dell'elica è casuale se la molecola di partenza possiede catene laterali achirali (casi A e B), mentre risulta regolarmente orientato se le catene laterali sono chirali (casi C e D). Se all'organizzazione supramolecolare di A o B (*soldier*) si introduce una minima percentuale (*i.e.* 4%)<sup>15</sup> di C o D (*sergeant*), questa da casuale diventa enantiospecifica, con amplificazione della chiralità a tutto il materiale (indotta dallo stereocentro metilico). Su un insieme di ottanta molecole discotiche achirali, la presenza di una sola con catene laterali chirali può essere sufficiente ad indurre la formazione di un polimero elicale con una sola elicità.

Un altro interessante esempio presente in letteratura riguarda lo studio di architetture colonnari legate attraverso legami a idrogeno partendo da 1,3,5-benzene triammidi, molecole a simmetria  $C_3$  costituite da un anello benzenico singolo e tre catene laterali connesse con legami ammidici.<sup>16</sup> Le molecole arrangono in colonne tramite legami intermolecolari a idrogeno, cui sono subordinate le deboli interazioni arene-arene del gruppo benzenico centrale. Per motivi d'impaccamento i legami intermolecolari a idrogeno ruotano fuori dal piano, e ciò induce elicità nelle colonne. I composti achirali di figura 2.10 (A-D) formano miscele equimolari di colonne a elicità (R) ed (L), ma le catene omochirali del composto E (fig. 2.10) introducono una differenza di energia tra le forme (R) ed (L) producendo una fase supramolecolare ad l'elicità univoca. Anche in questo caso si è studiato il fenomeno del "sergeant and soldier effect"<sup>17</sup> attraverso l'introduzione di piccole quantità di E nelle miscele raceme prodotte dai monomeri A-D,

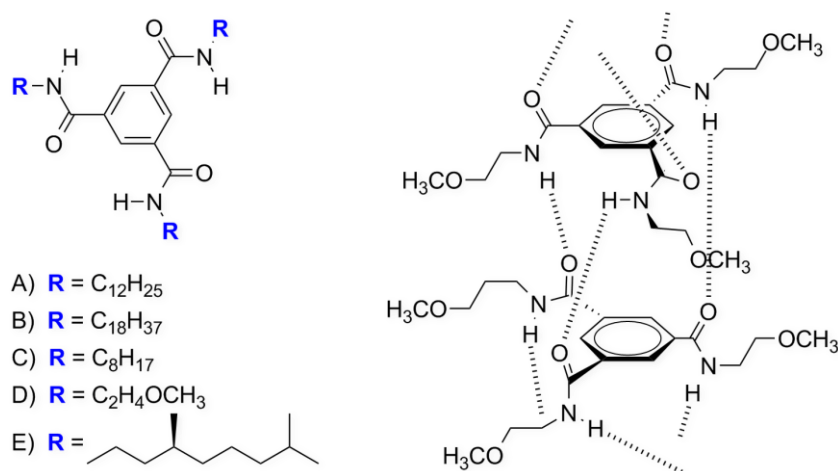


Figura 2.10: 1,3,5-benzene triammidi costituenti colonne in solventi apolari.

Ultimo esempio rilevante di questa classe di polimeri, soprattutto per la sua analogia strutturale con la doppia elica del DNA, è quello rappresentato in figura 2.11, dovuto sempre al gruppo di ricerca di E. W. Meijer. Partendo dalle ureidotriazine rappresentate in figura 2.11, è stata finalizzata la sintesi di polimeri discotici che interagiscono mediante legami a idrogeno intermolecolari. La molecola bifunzionale D-G (fig. 2.11), composta da due unità interconnesse da un ponte  $C_6$ , è capace di formare otto legami a idrogeno generando polimeri supramolecolari in cloroformio. I dischi si dispongono in un allineamento alternato a spazi, e in solventi apolari aggregano formando un polimero colonnare. Colonne elicali di ureidotriazine bifunzionali possono essere create anche in acqua partendo dai monomeri F di

figura 2.11: il centro aromatico del composto si dispone al centro creando un ambiente in cui la formazione di legami a idrogeno intermolecolari è favorita.<sup>18</sup>

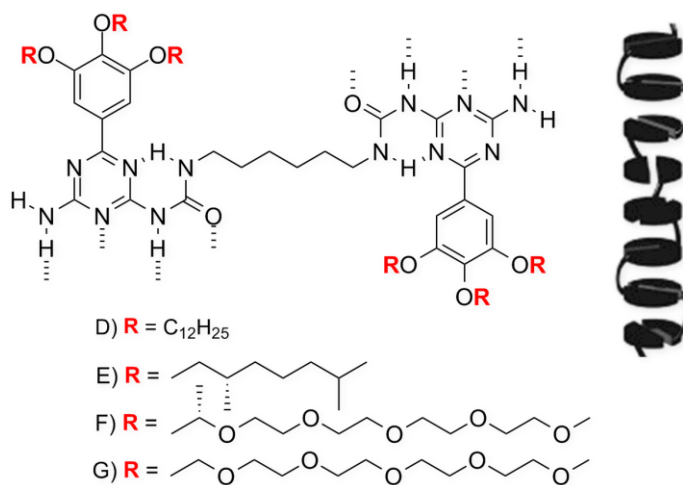


Figura 2.11: Ureidotriazine bifunzionali.

### b) Interazioni di $\pi$ - $\pi$ stacking

Una classe molto importante di SP è quella che sfrutta le interazioni non covalenti di tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking. Le prime strutture studiate sono stati i trifenileni alchil-sostituiti. Nonostante il centro aromatico dei trifenileni sia relativamente piccolo, la polimerizzazione si verifica anche in esadecano deuterato, come confermato da analisi di diffrazione neutronica (SANS).<sup>19</sup> A basse concentrazioni il  $DP$  è piccolo, ma a concentrazioni maggiori ( $10^{-3}$  M) si osservano polimeri a bastoncino. La distanza tra i centri aromatici è di 6 Å circa, un valore più grande della distanza di *stacking* allo stato liquido cristallino (3.5 Å circa). Questo indica che le molecole sono legate mediante uno *stacking* debole, probabilmente per l'assenza di specifiche interazioni intermolecolari. Il gruppo di ricerca di Ringsdorf ha dimostrato come i trifenileni possono formare polimeri supramolecolari alternati donatore-accettore in soluzione.<sup>20</sup> La formazione di queste coppie donatore-accettore è favorita in solventi apolari, mentre in solventi più polari i trifenileni non aggregano bene, portando alla formazione di polimeri a basso  $DP$ .

In contrasto con quanto descritto per le molecole sintetizzate dal gruppo di Meijer, la struttura B di figura 2.12 non riesce ad esprimere la chiralità della catena laterale nella colonna, fornendo un assemblato disordinato. Miscelando invece un trifenilene achirale (*i.e.* caso A di figura 2.12) con un mentil-derivato aromatico elettron-povero (fig. 2.12), si riesce per quanto sopra descritto ad introdurre la chiralità supramolecolare nella colonna.<sup>21</sup>

Trifenileni provvisti di catene laterali non-ioniche di di-etileneossido, o di catene alchiliche ioniche, formano polimeri supramolecolari in acqua.<sup>22</sup> Le interazioni arene-arene dei centri aromatici permettono la formazione di "micelle" colonnari. A basse concentrazioni le colonne sono relativamente corte, e le soluzioni sono isotropiche; a concentrazioni maggiori invece le colonne più lunghe interagiscono e si formano delle mesofasi liotropiche. Nelle soluzioni isotropiche la polimerizzazione di molecole discotiche è guidata da attrazioni

soluto-soluto; le costanti di associazione per la dimerizzazione e la trimerizzazione sono uguali e il *DP* della colonna può essere facilmente regolato variando la concentrazione e la temperatura.<sup>23</sup> A concentrazioni maggiori le dimensioni delle colonne sono influenzate da quelle vicine, perciò si allineano e il *DP* aumenta rapidamente. L'inserimento di accettori di elettroni tra i trifenileni spiega la formazione di polimeri più lunghi e incrementa l'ordine nella colonna.

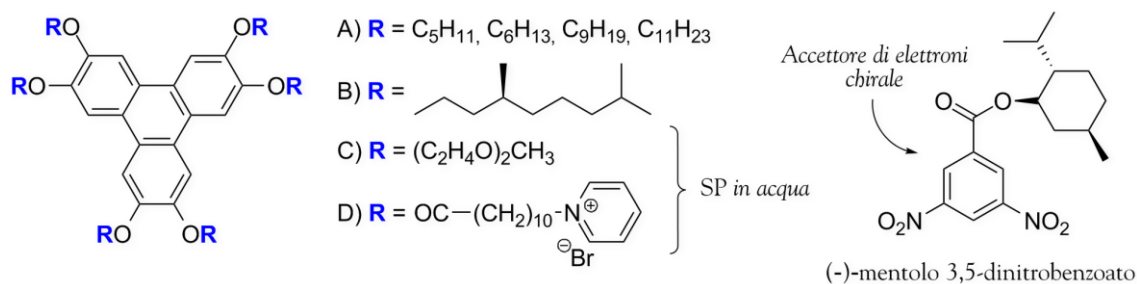


Figura 2.12: Trifenileni apolari (A–B) e polari (C–D) e accettore di elettroni.

Un altro interessante esempio di SP generato da  $\pi$ - $\pi$  *stacking* è quello delle ftalocianine, che possiedono un centro aromatico decisamente più grande rispetto ai trifenileni, e pertanto sono in grado di generare interazioni intermolecolari arene–arene più forti.<sup>24</sup> Le loro proprietà ottiche ed elettroniche possono essere inoltre facilmente regolate variando la natura del metallo incorporato. Inserendo nella periferia della ftalocianina eteri corona e catene laterali alcossiliche chirali (fig. 2.13 D) si formano invece aggregati ad elica auto-assemblanti:<sup>25</sup> le catene infatti, grazie alle interazioni steriche, inducono una torsione nell'aggregato.<sup>26</sup> L'elicità di questo aggregato può essere “spenta” aggiungendo un sale di potassio, annullando così la torsione imposta dalle catene chirali, attraverso la coordinazione ione–dipolo degli ioni  $K^+$  con gli eteri corona di due differenti ftalocianine.

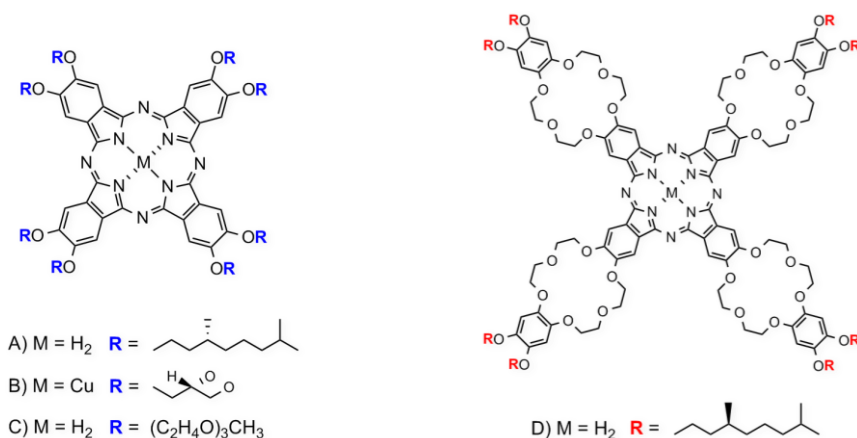


Figura 2.13: Molecole discotiche a base ftalocianinica.

La polimerizzazione di ftalocianine in acqua si verifica per derivati che possiedono catene laterali costituite da oligo-etilene ossido (caso C di figura 2.13).<sup>27</sup> Le forti interazioni arene–arene e la planarità del centro aromatico inducono un'aggregazione ancor più forte, grazie anche all'effetto idrofobico addizionale.

c) *Coordinazione*

L'ultima tipologia di polimeri supramolecolari che viene presentata è quella dei polimeri di coordinazione. Qui i metalli di coordinazione vengono adottati per preparare un'ampia gamma di complessi supramolecolari con geometrie variabili. La maggior parte dei polimeri di coordinazione solubili, siano essi lineari o ramificati, è tenuta insieme da interazioni metallo-legante cineticamente stabili e non mostra la reversibilità dinamica osservata nei polimeri supramolecolari veri e propri. Per formare tali aggregati è allora necessario utilizzare complessi di coordinazione deboli da un punto di vista cinetico, con ioni metallici tipo Cu(I) o Ag(I).

Il gruppo di ricerca di Hunter attorno al 2000 ha sintetizzato polimeri di coordinazione solubili ad alto peso molecolare basandosi sulle porfirine.<sup>28</sup> La porfirina è stata dotata di due pendenti costituiti da gruppi piridinici, e un atomo di cobalto (con sei siti di coordinazione) al centro (vedi figura 2.14). Studi di diffusione di A tramite DOSY hanno dimostrato la formazione di aggregati polimerici. Vista la stabilità cinetica del sistema metallo-legante, l'aggregazione è stata studiata mediante cromatografia SEC (*size exclusion chromatography*), che ha svelato come A formi aggregati B significativamente più grandi di C, che non può associare oltre lo stato di dimero. Attraverso questa tecnica è stato possibile utilizzare la molecola C di figura 2.14 come "chain-stopper" per dimostrare come la dimensione degli aggregati possa essere regolata tramite l'aggiunta di quantità crescenti di composto monofunzionale C.

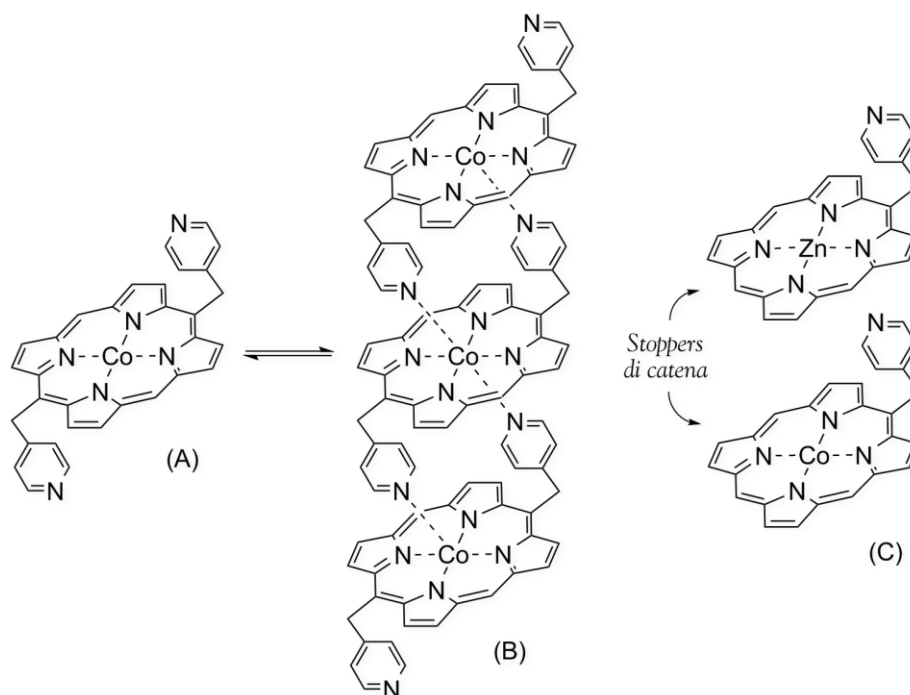


Figura 2.14: Polimeri di coordinazione da porfirine e stoppers di catena.

### 2.1.2 Polimerizzazione supramolecolare

Il termine “polimerizzazione supramolecolare” indica il processo generale per cui monomeri ditopici in soluzione generano polimeri, la cui formazione è guidata dall’associazione reversibile di due gruppi terminali A e B, che possono essere connessi o meno da uno *spacer* polimerico. L’interazione reversibile, dal momento che si tratta di monomeri ditopici, può avvenire sia tra due gruppi terminali auto-complementari ( $A=B$ ), sia tra due gruppi terminali complementari ( $A\neq B$ ).<sup>1a</sup> Come già anticipato, le reazioni di polimerizzazione che coinvolgono la formazione di legami covalenti avvengono sotto controllo cinetico, perché la barriera di potenziale per la depolimerizzazione è maggiore rispetto a quella di polimerizzazione. Di conseguenza una diluizione o un riscaldamento del polimero non si traducono in una perdita di peso molecolare, e quindi di grado di conversione. Nelle polimerizzazioni supramolecolari la situazione è ben diversa poiché, a causa della reversibilità, il grado di polimerizzazione è direttamente legato alle forze termodinamiche come concentrazione, temperatura e pressione.

I tre principali meccanismi di polimerizzazione supramolecolare sono: (1) isodesmico, (2) nucleazione-elongazione, (3) anello-catena (fig. 2.15).<sup>1c</sup>

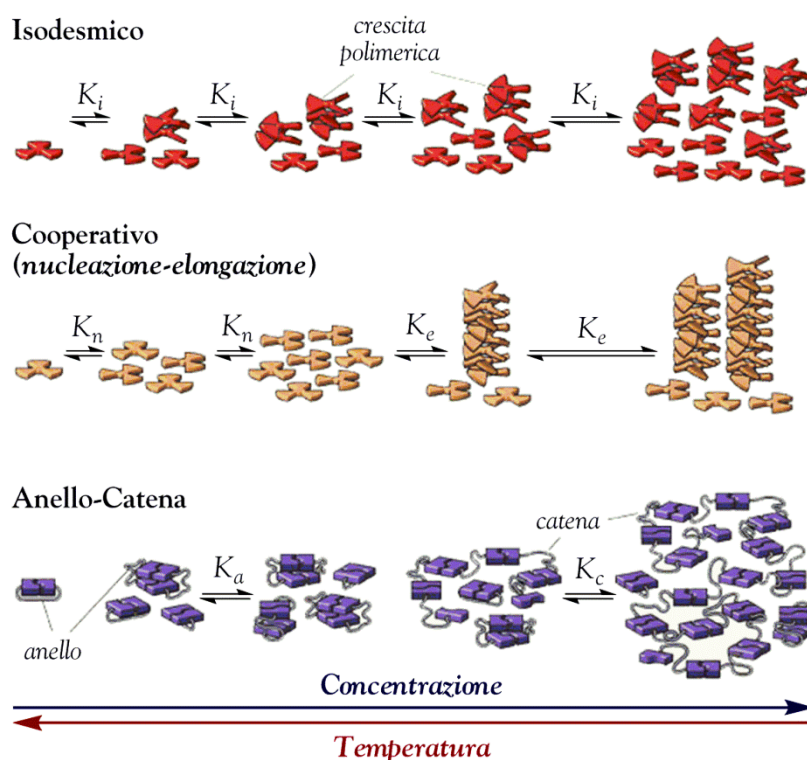


Figura 2.15: Meccanismi di polimerizzazione supramolecolare.

Nel caso della polimerizzazione isodesmica la costante di equilibrio  $K_i$  è sempre la stessa in tutta la fase di accrescimento polimerico. Se invece si è all'interno di un meccanismo cooperativo (detto anche “nucleazione-elongazione”) si hanno due fasi distinte: prima la formazione del nucleo (difficoltosa, con  $K_n \ll K_e$ ), e poi l'accrescimento veloce del polimero (governato da  $K_e$ ). Il terzo caso, rappresentato dal meccanismo di tipo anello-catena, riguarda particolari monomeri che, a seconda delle condizioni di polimerizzazione,



possono formare anelli o catene elongate. Nel presente lavoro di tesi verranno discussi in maniera dettagliata i meccanismi di polimerizzazione di tipo isodesmico e cooperativo.

#### a) Polimerizzazione supramolecolare isodesmica

Nelle polimerizzazioni supramolecolari isodesmiche (da *isos*: uguale, e *desmos*: legame) si ha la formazione reversibile di un legame non-covalente singolo, uguale in tutte le fasi del processo di polimerizzazione. Ciò implica che la reattività dei gruppi terminali, durante il processo di polimerizzazione, non cambia per effetti di gruppi vicinali o per energie addizionali d'interazione tra siti non adiacenti. Inoltre un processo isodesmico è caratterizzato dall'assenza di intermedi ciclici nel percorso di *self-assembly*.

Una polimerizzazione isodesmica di un monomero ditopico in soluzione diluita è caratterizzata perciò da una singola costante di equilibrio  $K_i$  ( $M^{-1}$ ) per ciascuno *step* reversibile nel percorso di aggregazione. In figura 2.16 vengono rappresentati due casi: (A) polimerizzazione di una molecola discotica rigida in un polimero supramolecolare lineare e (B) polimerizzazione di un monomero bifunzionale in cui le due funzionalità sono connesse da uno *spacer* flessibile. Poiché durante la polimerizzazione ogni *step* si equivale, le polimerizzazioni supramolecolari isodesmiche sono caratterizzate dall'assenza di una concentrazione o di una temperatura critiche per il *self-assembly*.<sup>29</sup>

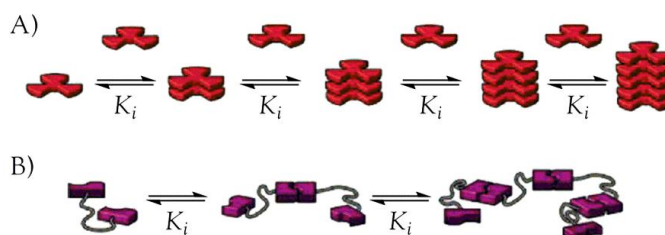


Figura 2.16: Meccanismo di polimerizzazione supramolecolare isodesmica.

#### Variazioni di concentrazione

Per dimostrare l'assenza di una concentrazione critica per il *self-assembly*, parecchie proprietà dipendenti dalla concentrazione sono state calcolate usando il modello discusso da Zhao e Moore.<sup>29i</sup> In figura 2.17 A si ha la frazione di monomero che è convertita a polimero supramolecolare ( $\Phi$ ), in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_t$ , dove  $C_t$  = concentrazione totale delle specie e  $\Phi = (C_t - M)/C_t$ , con  $M$  quantità di monomero non ancora polimerizzata. Come si può osservare, la frazione di monomero incorporata nelle specie polimeriche cresce gradualmente all'aumentare della concentrazione del monomero ditopico nella soluzione diluita. Questa transizione graduale si nota anche quando il grado di polimerizzazione, mediato sul peso o sul numero (rispettivamente  $DP_w$  e  $DP_n$ ), viene rappresentato in funzione della concentrazione adimensionale (fig. 2.17 B). I grafici rivelano subito uno svantaggio dei polimeri supramolecolari con meccanismo di crescita isodesmico: si ottengono alti  $DP$  solamente per alti valori di  $KC_t$ . Ne deriva che, per ottenere un polimero con un alto  $DP$  in soluzioni diluite ( $C_t < 1$  M), occorre avere un valore della costante di equilibrio  $K$  elevato ( $K > 10^6$   $M^{-1}$ ).

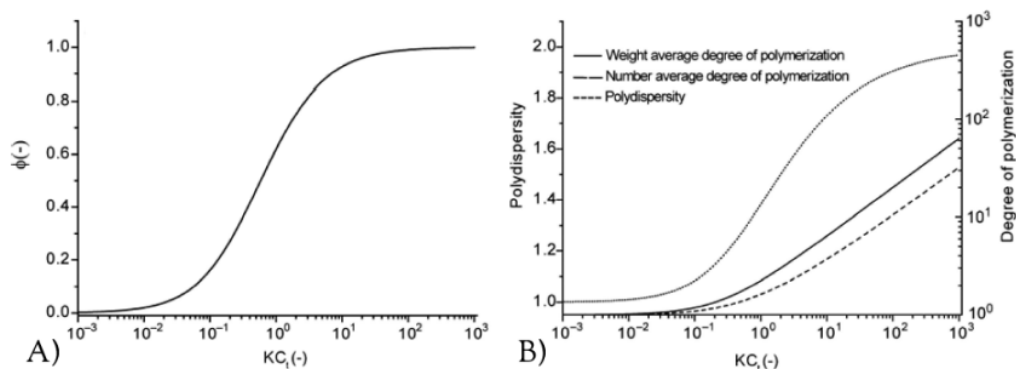


Figura 2.17:  $\Phi$  e DP in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_T$ .

Il valore della costante d'equilibrio isodesmica può essere calcolato con misure spettroscopiche dipendenti dalla concentrazione (UV-Vis,<sup>30</sup> IR,<sup>31</sup> fluorescenza,<sup>32</sup> NMR,<sup>33</sup> dicroismo circolare<sup>34</sup>). Nella maggior parte dei casi le variazioni del segnale sperimentale misurato vengono considerate proporzionali alla concentrazione o alla frazione di materiale aggregato.<sup>29c</sup> Come verrà discusso successivamente (vedi Par. 2.4.2), a causa delle approssimazioni introdotte che non consentono di distinguere fra dimerizzazione isodesmica e polimerizzazione isodesmica, la qualità del *fit* deve essere sempre accompagnata da misure dirette (*i.e.* DOSY,<sup>35</sup> VPO,<sup>33</sup> *light scattering*<sup>36</sup>) della lunghezza del polimero (e quindi del DP) in funzione della concentrazione.

### Variazioni di temperatura

Al contrario dei modelli di *self-assembly* isodesmici dipendenti dalla concentrazione, che sono stati sviluppati con considerazioni inerenti l'equilibrio chimico, i modelli dipendenti dalla temperatura sono stati costruiti attingendo alla meccanica statistica,<sup>37</sup> in particolare alla distribuzione di Boltzmann.<sup>38</sup> In questo lavoro di tesi si farà riferimento al modello sviluppato da van der Schoot.<sup>29d</sup> Qui i due parametri sono: (1) la temperatura di fusione  $T_m$  (dipendente dalla concentrazione), definita come la temperatura per cui la frazione di monomero presente nei polimeri supramolecolari è pari a 0.5, e (2) l'entalpia di polimerizzazione  $\Delta H_p$  [kJ mol<sup>-1</sup>], indipendente dalla temperatura.

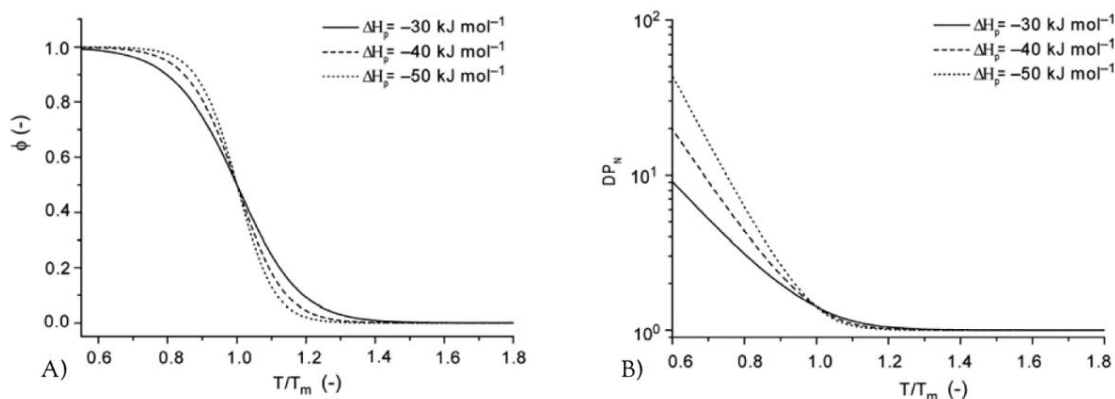


Figura 2.18:  $\Phi$  e  $DP_n$  in funzione di  $T/T_m$  (van der Schoot).

In figura 2.18 A si può osservare la frazione di materiale polimerizzato,  $\Phi$ , in funzione della temperatura adimensionale  $T/T_m$  per alcuni valori realistici di  $\Delta H_p$  di un polimero che aggrega raffreddandosi. La curva ha una forma chiaramente sigmoideale, mentre la ripidità della transizione dipende dal valore di  $\Delta H_p$ . Il grafico in figura 2.18 B illustra il grado di polimerizzazione mediato sul numero ( $DP_n$ ) in funzione di  $T/T_m$ , in accordo con lo stesso modello: al diminuire della temperatura si ha un graduale aumento del  $DP_n$ .

Tra i monomeri più importanti che polimerizzano secondo questo tipo di meccanismo si possono ricordare le 3'-diammino-2,2'-bipiridine di figura 2.19 A e le molecole a base ureido pirimidinonica di figura 2.19 B, sviluppate dal gruppo di ricerca di Meijer nel 2009.<sup>1c</sup>

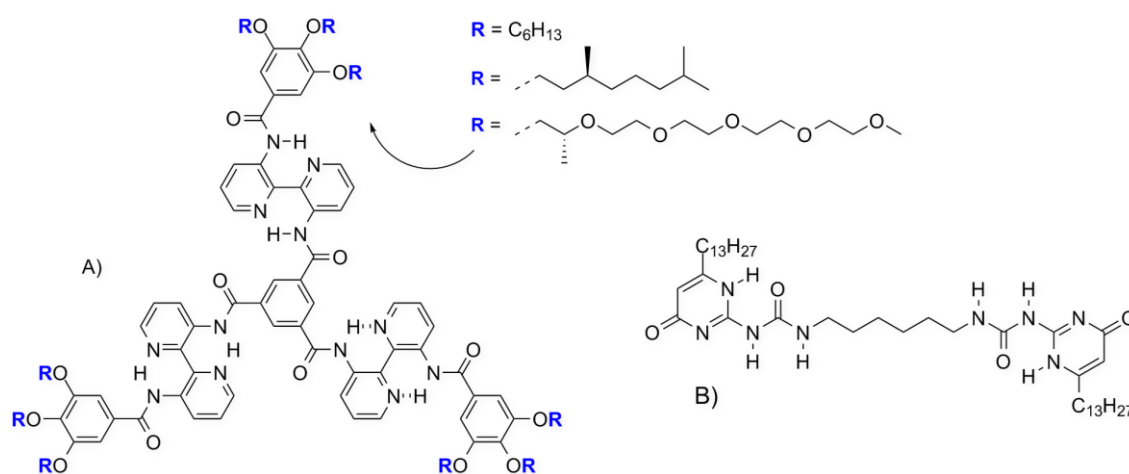


Figura 2.19: Esempi di monomeri che polimerizzano per via isodesmica.

### b) Polimerizzazione supramolecolare cooperativa

In una polimerizzazione supramolecolare cooperativa la nucleazione iniziale è costituita da un'associazione lineare isodesmica, con una costante di associazione  $K_n$  per l'aggiunta di ciascun monomero ( $K_n \ll 1$ )<sup>39</sup>. Il processo di polimerizzazione continua fino alla formazione di un nucleo di dimensione critica avente grado di polimerizzazione  $s$  (fase di nucleazione). A causa di vari effetti cooperativi che verranno discussi successivamente, l'addizione di un ulteriore monomero avviene con una costante di associazione  $K_e$  (fase di elongazione), il cui valore deve essere sempre maggiore di  $K_n$ .

Rispetto alle polimerizzazioni supramolecolari isodesmiche, quelle cooperative sono quindi governate da due costanti di associazione diverse (fig. 2.20), e di conseguenza da una temperatura o concentrazione critica (corrispondente a  $K_e^{-1}$ )<sup>39</sup> per cui il polimero inizia a crescere.

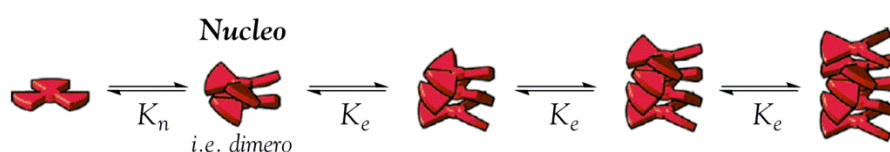


Figura 2.20: Meccanismo di polimerizzazione supramolecolare cooperativa.

### Variazioni di concentrazione

Per descrivere le proprietà dipendenti dalla concentrazione delle polimerizzazioni cooperative in soluzioni ideali viene utilizzato in genere il modello d'equilibrio chimico sviluppato da Zhao e Moore.<sup>29i</sup> Secondo questo modello, come misura del grado di cooperatività viene introdotto il parametro  $\sigma$  definito come  $K_n/K_e$ , che per un processo cooperativo dev'essere sempre  $\sigma < 1$ . In figura 2.21 A si ha la frazione molare di materiale aggregato ( $\Phi$ ) in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_t$  per tre valori diversi di  $\sigma$ , dove  $C_t$  = concentrazione totale delle specie e  $\Phi = (C_t - M)/C_t$ , con  $M$  quantità di monomero non ancora polimerizzata. Un aumento di cooperatività influenza chiaramente il profilo di crescita della specie polimerica. Mentre per la crescita isodesmica ( $\sigma = 1$ ) aumentando la concentrazione si ha un graduale aumento delle specie polimeriche, per i sistemi cooperativi, al di sotto della concentrazione critica adimensionale pari a 1, si forma appena qualche specie polimerica. Solo quando la concentrazione supera la concentrazione critica si ha la crescita della catena, e tutti i monomeri vengono convertiti in polimeri ad alto peso molecolare, in un intervallo di concentrazione relativamente piccolo (fig. 2.21 B).

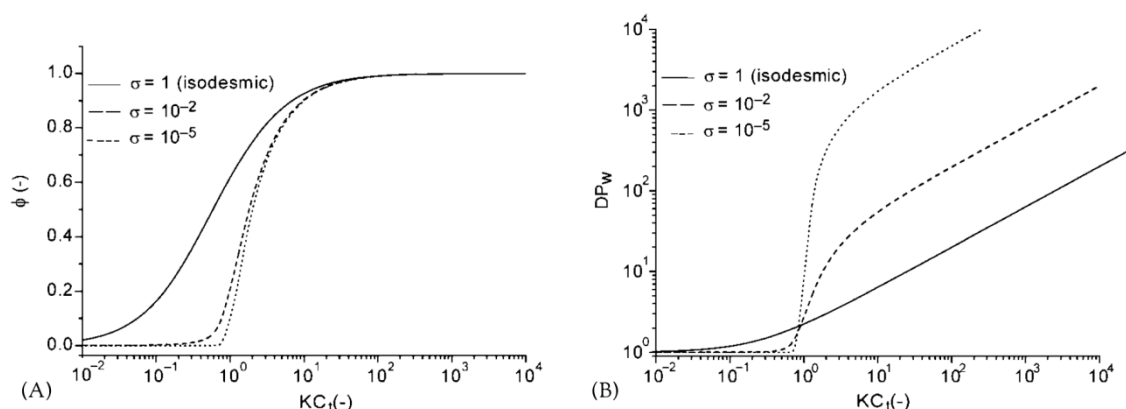


Figura 2.21:  $\Phi$  e  $DP_w$  in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_T$  (Zhao e Moore).

Un altro modello molto utilizzato per descrivere la polimerizzazione cooperativa a concentrazione variabile è quello di Goldstein e Stryer, i quali oltre la cooperatività  $\sigma$  introducono un'ulteriore parametro: la dimensione  $s$  del nucleo. Goldstein e Stryer dimostrano come la crescita del polimero non sia determinata solamente da  $\sigma$ , ma anche da  $s$ , definendo una cooperatività cumulativa  $\omega = \sigma^{s-1}$ . In figura 2.22 vengono rappresentati la frazione di materiale polimerizzato  $\Phi$  e il  $DP_w$  in funzione della concentrazione totale adimensionale, per diversi valori di  $s$  ma ugual valore di  $\omega$ . Come si può osservare, curve aventi stesso  $\omega$  si unificano velocemente quando  $KC_T > 1$ , ovvero quando la concentrazione totale del monomero supera quella critica. Inoltre, per alti valori di  $s$ , una quantità significativa di materiale è già polimerizzata prima di raggiungere la concentrazione critica. Ad ogni modo, come si vede dalla figura 2.22 B, tale sistema è costituito principalmente da monomeri e dimeri: solo quando viene superata la concentrazione critica si ottengono polimeri ad alto peso molecolare.

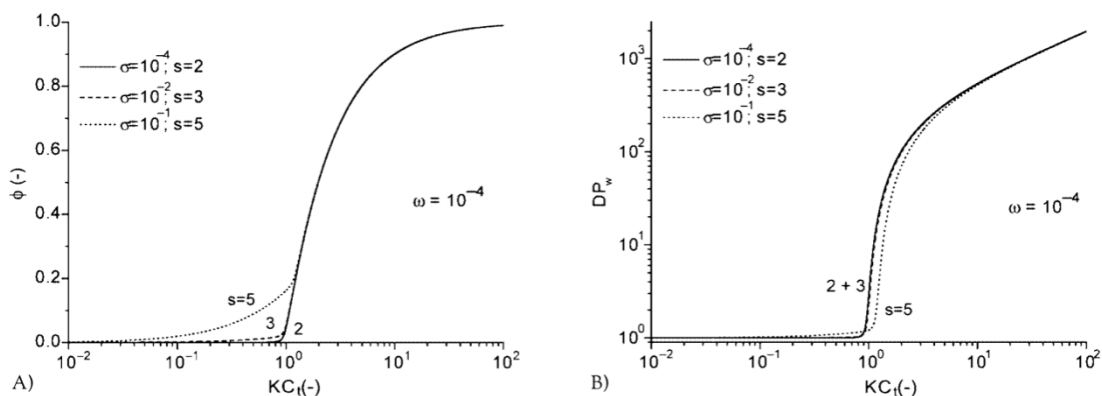


Figura 2.22:  $\Phi$  e  $DP_w$  in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_T$  (Goldstein e Stryer).

In figura 2.23 vengono invece rappresentati la frazione di materiale polimerizzato e il  $DP_w$  in funzione della concentrazione totale adimensionale, per un valore  $s = 4$  e valori variabili di  $\omega$ . Rispetto alla situazione di figura 2.22 A, le curve di figura 2.23 A si uniscono meno rapidamente quando la concentrazione totale è maggiore rispetto alla concentrazione critica. Infine, dalla figura 2.23 B è chiaro che abbassando il valore della costante di cooperatività cumulativa  $\omega$  si può ottenere un polimero a PM maggiore.

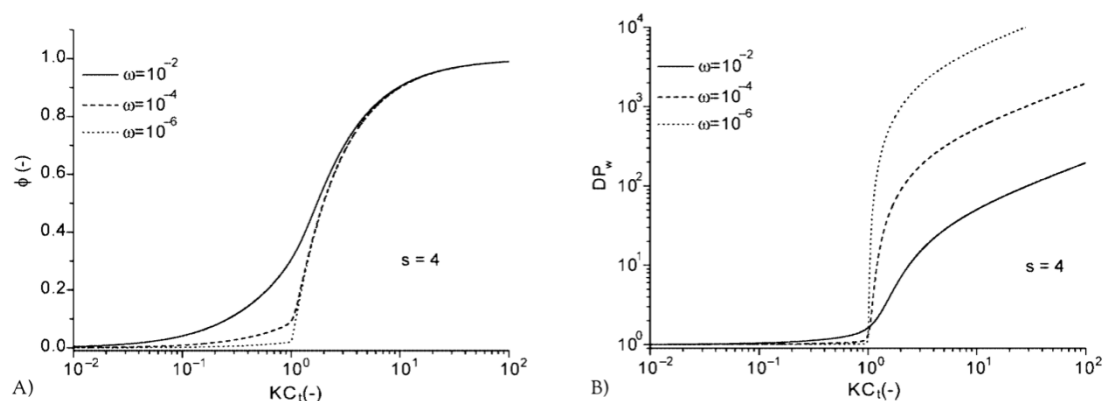


Figura 2.23:  $\Phi$  e  $DP_w$  in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_T$  (Goldstein e Stryer).

### Variazioni di temperatura

Nelle polimerizzazioni cooperative esiste una temperatura “limite”, per la quale si ha un rapido aumento della frazione di materiale polimerizzato.<sup>29b</sup> In questo lavoro di tesi per descrivere tale processo ci si basa sul modello sviluppato da van der Schoot,<sup>29d</sup> in cui l’attivazione monomerica è descritta da una costante di attivazione adimensionale  $K_a$ , mentre la successiva elongazione dei polimeri è descritta dall’entalpia di elongazione  $\Delta H_e$  (indipendente dalla temperatura) e dalla temperatura di elongazione  $T_e$  (dipendente dalla concentrazione). Per polimeri supramolecolari che polimerizzano in seguito a raffreddamento, l’entalpia di elongazione è negativa.  $T_e$  in questo modello separa due regimi di polimerizzazione: sopra la temperatura di elongazione critica, quasi tutte le molecole nel sistema sono in uno stato disattivato (regime di nucleazione), mentre sotto la  $T_e$  avviene l’attivazione, e la minima frazione di monomero attivato può elongare rapidamente per

formare polimeri supramolecolari con un alto  $DP$ . In figura 2.24 A si può apprezzare come sopra la  $T_c$  sia presente appena qualche specie polimerica, mentre al di sotto della  $T_c$  la frazione di materiale polimerizzato  $\Phi$  cresce bruscamente e la transizione sia sempre più netta al diminuire di  $K_a$ . In questo modello perciò  $K_a$  ricopre lo stesso ruolo del parametro di cooperatività  $\sigma$  del modello di Zhao e Moore.<sup>29i</sup> In figura 2.24 B si può osservare invece l'andamento del  $DP_n$  in funzione di  $T/T_c$ : gradi di polimerizzazione elevati vengono raggiunti solamente per bassi valori di  $K_a$ . A differenza delle polimerizzazioni supramolecolari isodesmiche, le curve che descrivono la frazione di materiale aggregato in funzione della temperatura non sono sigmoidali.

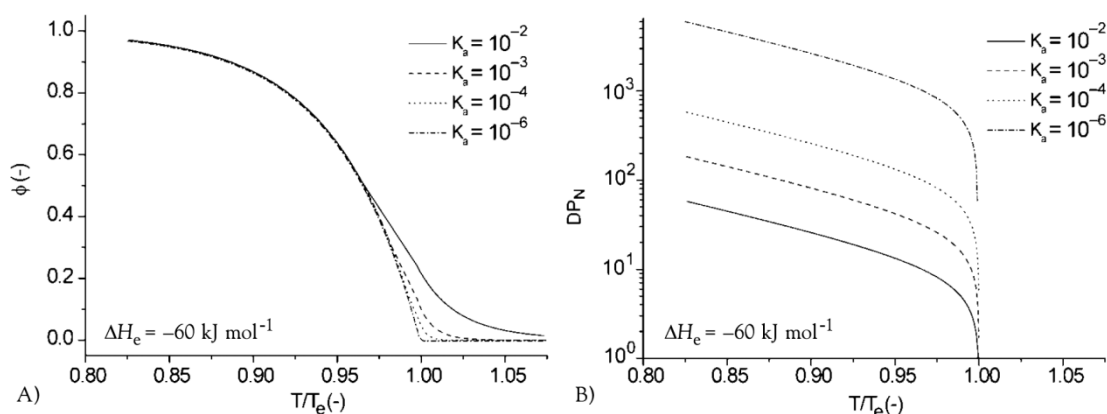


Figura 2.24:  $\Phi$  e  $DP_n$  in funzione di  $T/T_c$  (van der Schoot).

Un classico esempio di composto che polimerizza con un meccanismo di crescita cooperativo è la molecola di trialchilbenzene-1,3,5-tricarbossammide a simmetria  $C_3$  di figura 2.25, sintetizzata dal gruppo di ricerca di E. W. Meijer.<sup>15</sup> Tali molecole discotiche auto-assemblano in colonne elicili sia allo stato liquido cristallino, sia in soluzioni diluite di alcani.<sup>40</sup>

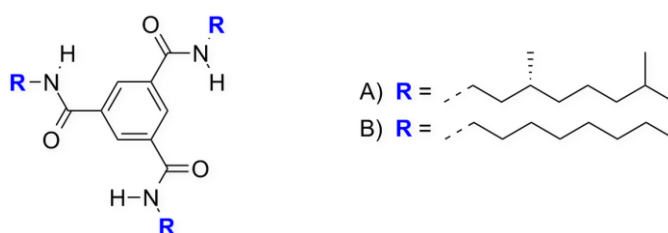


Figura 2.25: 1,3,5-benzene tricarbossammide.

Un secondo esempio, dovuto sempre al gruppo di ricerca di Meijer, è quello degli oligo(*p*-fenilen-vinileni), detti OPV, molecole dotate di un'unità auto-complementare di ureidotriazina con quattro legami a idrogeno. La purezza enantiomerica delle code chirali laterali si esprime a livello supramolecolare con la formazione di strutture elicili quasi mono-dimensionali (fig. 2.26).

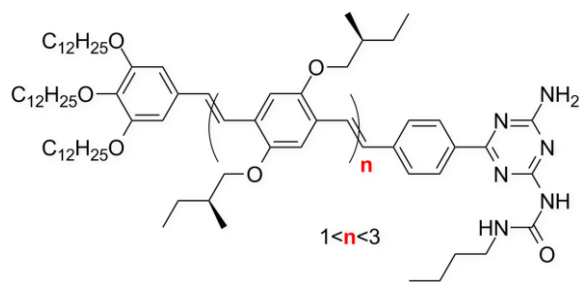


Figura 2.26: Esempio di OPV.

## 2.2. Scopo della tesi

Di recente sono stati sviluppati molti materiali basati sulla tecnologia dei polimeri supramolecolari. In particolare tali strutture molecolari sono state introdotte all'interno dei polimeri convenzionali, ottenendo nuovi materiali compositi con caratteristiche uniche. La natura non-covalente delle interazioni consente infatti, per effetto di uno stimolo esterno (ad esempio innalzamento della temperatura, irraggiamento UV, variazioni di pH, etc.), di rompere e quindi ricomporre la rete di legami che tiene unita la struttura supramolecolare. Da un punto di vista pratico, si possono ottenere nuovi polimeri che, se danneggiati, per azione di uno stimolo fisico esterno possono auto-ripararsi. Un valido esempio tratto dalla letteratura è quello sviluppato dal gruppo di E. W. Meijer sul polimero rappresentato in figura 2.27. In questo caso il gruppo ureido-pirimidinonico è stato posizionato come terminale di catena ad un polisilano, originando un composto plastico che si auto-ripara per effetto termico.

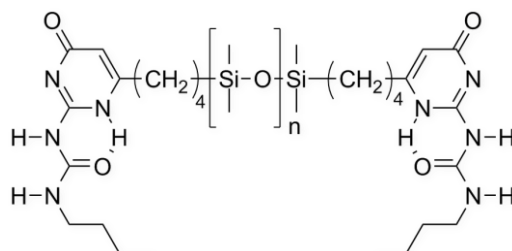


Figura 2.27: Esempio di polimero auto-riparante per via termica.

Un altro esempio di materiale auto-riparante tratto dalla letteratura recente è quello sintetizzato dal gruppo di S. J. Rowan<sup>41</sup> (vedi figura 2.28).

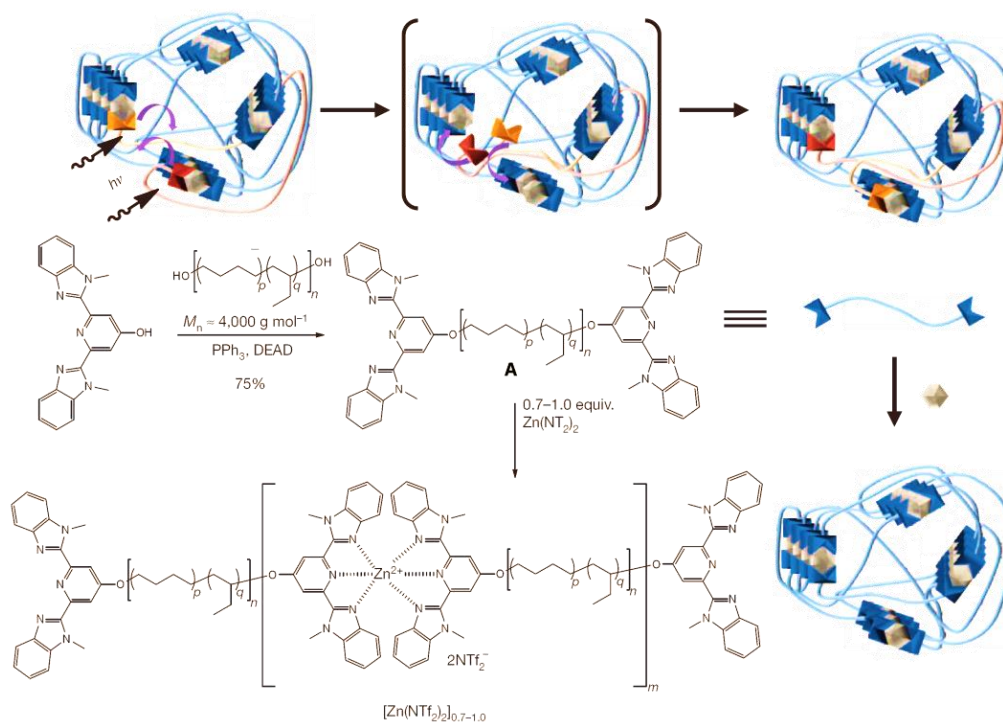


Figura 2.28: Esempio di polimero auto-riparante tramite irraggiamento UV.



In questo caso viene introdotta una struttura molecolare in grado di produrre un'interazione di tipo metallo-legante, come terminale dell'oligomero A, generando un polimero ad alto PM. Se questo subisce una degradazione meccanica, l'ipotetica "rottura" si localizza nella parte più debole della struttura, ovvero sull'interazione coordinativa, lasciando inalterata la struttura polimerica più rigida. In questo caso la reversibilità dell'interazione debole consente di ricomporre la frattura attraverso irraggiamento UV.

Nel presente lavoro di tesi si vuole sfruttare l'auto-riparabilità caratteristica dei polimeri supramolecolari per creare materiali innovativi utili nel settore della conservazione e restauro. In particolare si vuole sviluppare una nuova classe di materiali polimerici basati sull'architettura molecolare del **DPP**, capaci di reticolare attraverso le interazioni non-covalenti tipiche di tale sistema (vedi figura 2.29). Questi nuovi prodotti potrebbero rappresentare dei potenziali leganti o consolidanti per opere pittoriche, specialmente per manufatti contemporanei. Il restauro di tali opere e la produzione di materiali specifici che ne consegue è, come già detto nella parte introduttiva del Cap. 1, un settore di ricerca poco esplorato ma di grande interesse artistico e culturale.

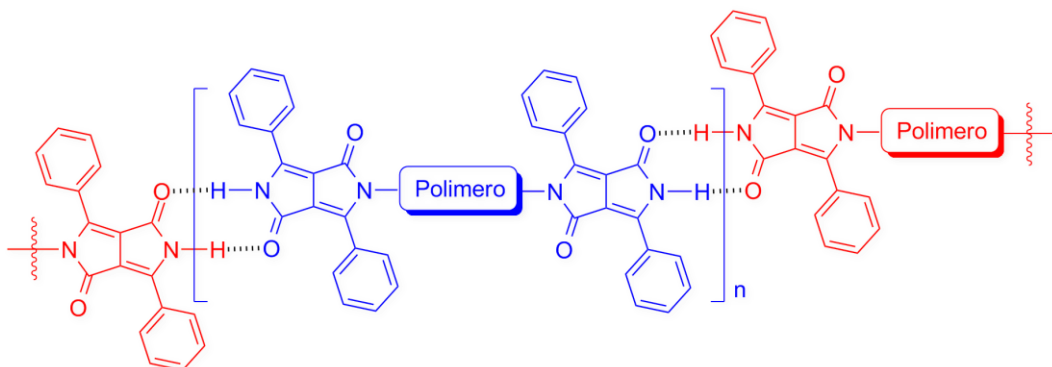


Figura 2.29: Polimero auto-riparante basato sul DPP.

Per quanto descritto nella parte introduttiva dei Cap. 1 e 2, gli **HPP** e in particolare il **DPP** possiedono i requisiti necessari atti allo sviluppo dei polimeri supramolecolari, grazie alla capacità di generare interazioni secondarie multiple come legami a idrogeno e *stacking*  $\pi-\pi$ . Per realizzare questo progetto è necessario quantificare l'entità delle interazioni non-covalenti prodotte dal **DPP**, sintetizzando un derivato solubile nei comuni solventi organici che mantenga allo stesso tempo la possibilità di creare interazioni deboli.

Dal punto di vista sintetico l'idea consiste nel legare in *para* agli anelli aromatici del **DPP** un fenile trisostituito con lunghe catene alchiliche ( $-C_{12}H_{25}$ ), arrivando all'ottenimento di un derivato, denominato *longchains*-DPP (vedi figura 2.31), le cui unità monomeriche siano tenute insieme dalle tipiche interazioni non-covalenti. Il gruppo tridodecilossifenilico è un gruppo solubilizzante che dovrebbe indurre la struttura ad auto-aggregare in maniera particolare, conferendole al tempo stesso proprietà liquido cristalline. S'intende poi sintetizzare un derivato asimmetrico, recante un solo gruppo tridodecilossifenilico, per studiarne affinità e differenze rispetto al predecessore bifunzionalizzato.

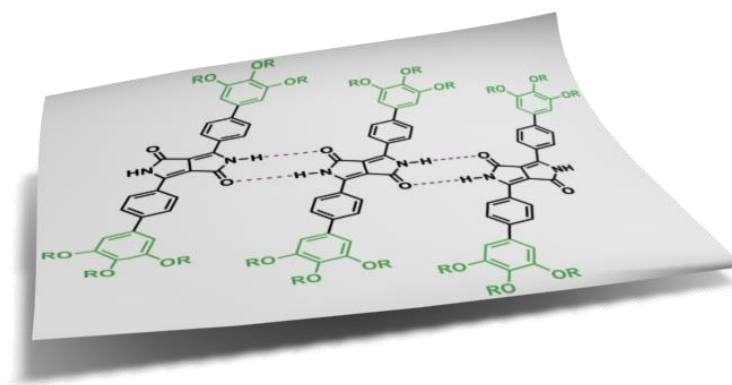


Figura 2.30: Polimero supramolecolare basato sul DPP.

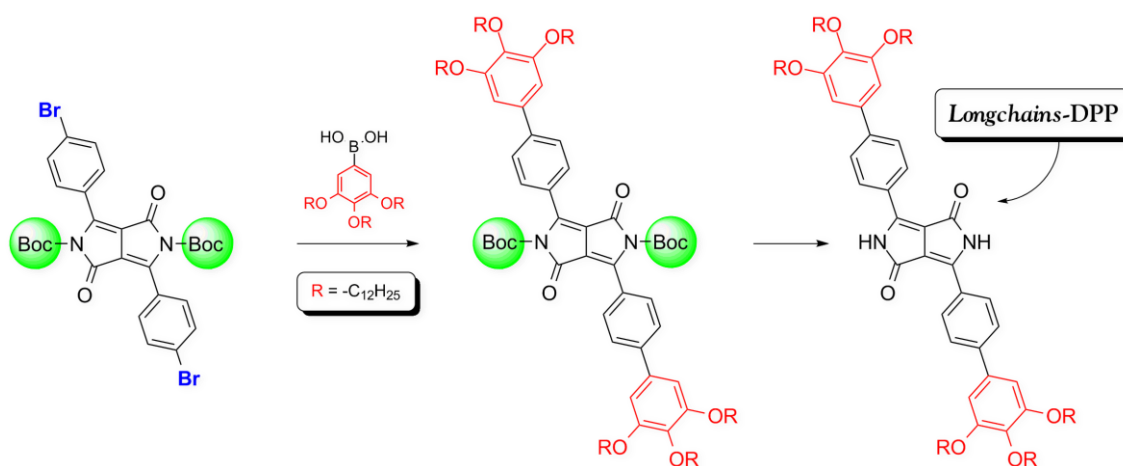
Tale struttura supramolecolare rappresenta l'approccio preliminare per l'ottenimento di una nuova classe di *smart-material* auto-riparanti,<sup>41,42</sup> con una notevole capacità di auto-riparazione (cicli di riscaldamento-raffreddamento). Il tessuto supramolecolare danneggiato potrebbe infatti essere "azzerato" tramite uno stimolo fisico esterno (irraggiamento UV o riscaldamento), con rottura delle interazioni intermolecolari e omogeneizzazione strutturale, quindi "ritensionato" abbassando la temperatura, grazie alla formazione di nuove interazioni supramolecolari.

Il meccanismo di aggregazione supramolecolare del polimero in soluzione verrà indagato attraverso tecniche di spettroscopia NMR e UV-Vis (a concentrazione o a temperatura variabili), accompagnate da analisi di microscopia ottica allo stato solido (SEM, EFM, POM) per comprendere come il *self-assembly* molecolare si amplifichi a livello macroscopico.

## 2.3. Sintesi

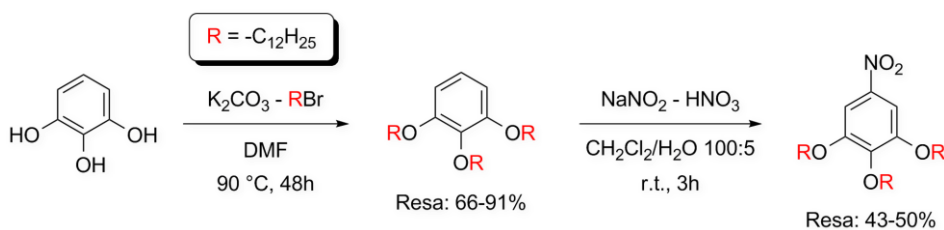
### 2.3.1. Longchains-DPP

Per sintetizzare un *longchains*-DPP caratterizzato da lunghe catene laterali alchiliche, si è deciso di impiegare il *cross-coupling* di Suzuki-Miyaura tra il Br-DPP-Boc (per la cui sintesi si rimanda al capitolo precedente) e l'acido 3,4,5-tridodecilossifenil-boronic. La sintesi di questo prodotto rappresenta la naturale evoluzione dei risultati dello studio di reattività descritto nel Cap. 1, e quindi si basa sugli stessi presupposti che prevedono l'utilizzo del Boc come gruppo protettore-solubilizzante in virtù della sua semplice rimozione in ambiente acido. Di seguito si riporta il percorso di sintesi che s'intende seguire (schema 2.1).



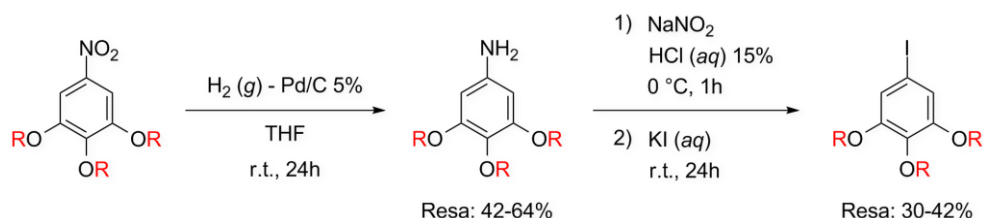
Schema 2.1: Passaggi sintetici per l'ottenimento del *longchains*-DPP.

Per poter intraprendere la procedura suddetta si è sintetizzato dapprima l'acido 3,4,5-tridodecilossifenil-boronic, composto non disponibile in commercio. Seguendo inizialmente come riferimento la procedura descritta da Lincker nel n°8 di *Organic Letters* del 2005,<sup>43</sup> si è partiti dall'alchilazione del pirogallolo (1,2,3-triidrossibenzene) con 1-bromododecano in DMF, utilizzando come base  $K_2CO_3$ . Il prodotto (1,2,3-tridodecilossibenzene), che si presenta sotto forma di solido basso fondente bianco, viene purificato per estrazione con  $CH_2Cl_2$  dopo rimozione maggioritaria della DMF mediante distillazione. La successiva nitratura,<sup>43,44</sup> che avviene con  $NaNO_2$  e  $HNO_3$  in miscela bifasica  $CH_2Cl_2/H_2O$  100:5 a temperatura ambiente, porta all'ottenimento del 3,4,5-tridodecilossi-nitrobenzene, solido polverulento giallo.



Schema 2.2: Sintesi 3,4,5-tridodecilossi-nitrobenzene.

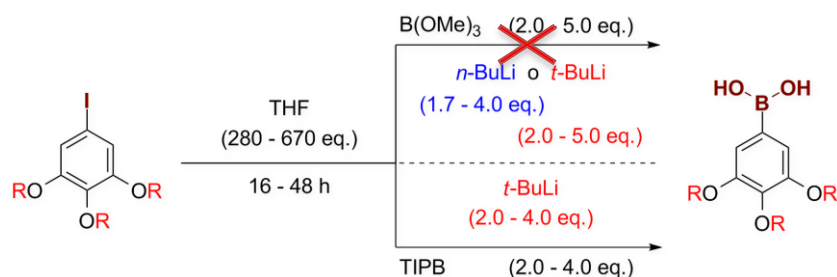
La riduzione del gruppo nitro viene prima effettuata in EtOH, utilizzando idrazina monoidrata e carbone attivo, ma le rese sono troppo basse. Si raggiunge un esito migliore con  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in EtOH,<sup>45</sup> ma il prodotto ottenuto (olio nerastro) presenta notevoli problematiche di purificazione. Si propende allora per una riduzione catalitica<sup>43,46</sup> utilizzando idrogeno gassoso e Pd/C 5% in THF. Il prodotto viene purificato tramite ricristallizzazione da EtOH caldo, e si presenta come un solido polverulento biancastro.



Schema 2.3: Sintesi 3,4,5-tridodecilossi-iodobenzene.

L'introduzione dell'alogeno mediante una reazione di Sandmeyer<sup>47</sup> (step limitante, a resa inferiore) porta all'ottenimento dello iodo-derivato, che si presenta come un solido cristallino bianco a seguito di estrazione con  $\text{Et}_2\text{O}$  e purificazione tramite cromatografia flash (miscela eluente: Cy-Hex/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  9:1).

I passaggi di litiazione e borazione della reazione finale hanno richiesto una ricalibrazione completa delle condizioni di reazione trovate in letteratura.<sup>43</sup> Di seguito vengono riportati lo schema di sintesi e una tabella con tutti i parametri di reazione modulati per ottimizzare la sintesi (schema 2.4, tab. 2.1). Come solvente si utilizza THF anidro, mentre i reagenti vengono sempre introdotti a  $-90$  °C, onde evitare la degradazione della litio-specie.<sup>48</sup>

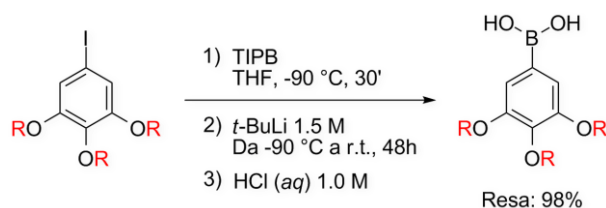


Schema 2.4: Tentativi di sintesi acido 3,4,5-tridodecilossifenil-boronic.

Esp.	Base	[eq]	Borato	[eq]	Tempo (h)	Solvente [eq]	Resa
1	<i>n</i> -BuLi	1.7	Trimetil-	2.6	16	280	–
2	<i>n</i> -BuLi	4.0	Trimetil-	4.0	20	300	–
3	<i>t</i> -BuLi	5.0	Trimetil-	5.0	24	460	–
4	<i>t</i> -BuLi	2.0	Trimetil-	2.0	24	460	–
5	<i>t</i> -BuLi	2.0	Triisopropil-	2.0	24	460	–
6	<i>t</i> -BuLi	2.0	Triisopropil-	2.0	24	520	60%
7	<i>t</i> -BuLi	4.0	Triisopropil-	4.0	48	370	60%
8	<i>t</i> -BuLi	4.0	Triisopropil-	4.0	48	670	98%

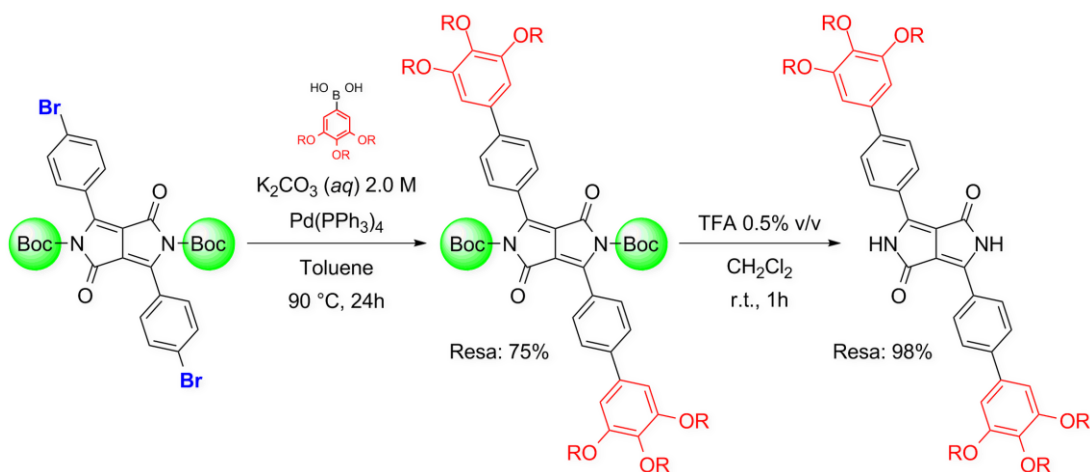
Tabella 2.1: Studio dei parametri per la sintesi dell'acido boronico.

Dalla tabella si può osservare come convenga utilizzare triisopropil-borato (TIPB) in sostituzione al trimetil-borato  $B(OMe)_3$ , previsto dalla sintesi originale, e come un lieve eccesso di borato (4.0 eq) accompagnato da una quantità stechiometrica di base ( $t\text{-BuLi}$ ) rispetto al substrato permetta di raggiungere una resa quantitativa di prodotto (contro un massimo dell'80% riscontrabile in letteratura), che si presenta sotto forma di solido giallino. Anche la diluizione della reazione è stata incrementata per garantire un'ottima miscibilità della soluzione a basse temperature, prevenendo la degradazione della litio-specie. Di seguito si riporta lo schema di sintesi con le condizioni finali applicate (schema 2.5):



Schema 2.5: Condizioni finali di sintesi per l'acido boronico.

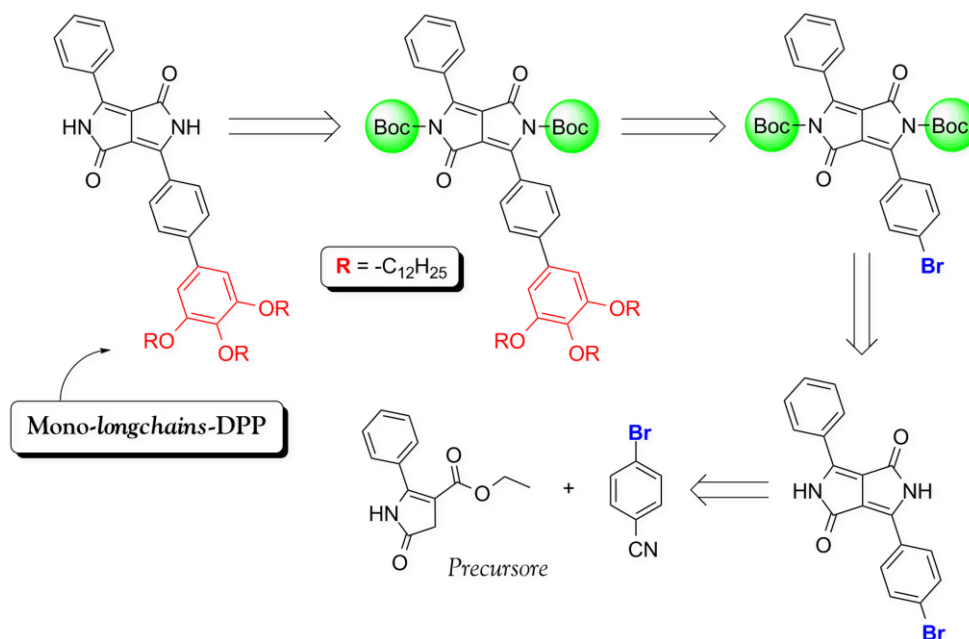
Nello schema 2.6 vengono illustrati gli ultimi due passaggi per la sintesi dell'unità monomerica del *longchains*-DPP. La condensazione di Suzuki-Miyaura tra il Br-DPP-Boc e l'acido 3,4,5-tridodecilossifenil-boronico è condotta sotto le stesse condizioni sperimentali viste nel capitolo precedente. La reazione avviene in toluene a refluxo, utilizzando  $\text{K}_2\text{CO}_3(\text{aq})$  2.0 M come base e  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  come catalizzatore. Il prodotto *longchains*-DPP-Boc viene isolato con una resa del 75% dopo purificazione mediante FC (miscela eluente finale: Cy-Hex/ $\text{Et}_2\text{O}$  7:3). La rimozione del gruppo protettore  $t\text{-Boc}$  avviene utilizzando lo 0.5% v/v di TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , con resa quantitativa e senza sottoprodotti. La purezza del prodotto è una prerogativa essenziale per ottenere un polimero supramolecolare ad elevato DP.



Schema 2.6: Sintesi *longchains*-DPP.

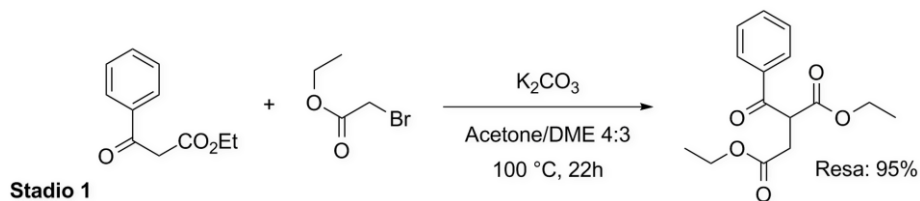
### 2.3.2. Mono-longchains-DPP

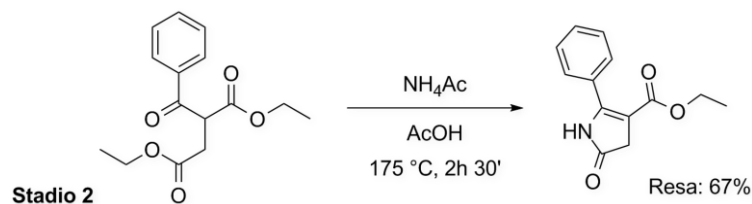
Come apparirà più chiaro nei paragrafi successivi, al fine di valutare l'effetto delle catene sull'organizzazione supramolecolare, si è deciso di sintetizzare un **DPP** asimmetrico definito *mono-longchains-DPP*. Nello schema di retrosintesi sotto riportato si possono osservare i passaggi sintetici previsti per l'ottenimento dell'unità monomerica. Nel complesso si hanno sei *step* consecutivi, con gli stessi passaggi chiave della sintesi precedente (Par. 2.3.1).



**Schema 2.7:** Schema di retrosintesi per l'ottenimento del *mono-longchains-DPP*.

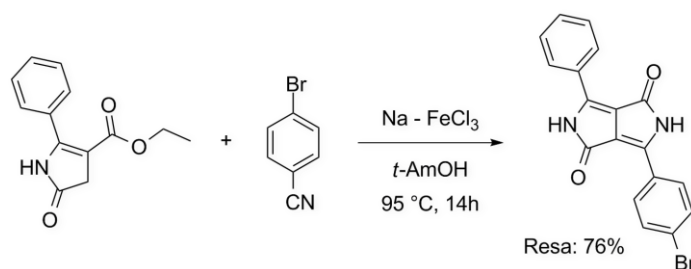
L'asimmetria dell'architettura strutturale del prodotto viene perciò introdotta nella fase iniziale, sfruttando la condensazione tra un precursore pirrolico (etossipirrolcarbossilato) e il *p*-bromobenzonitrile.<sup>49</sup> Il primo *step* sintetico prevede proprio la sintesi del precursore,<sup>49,50</sup> suddivisa in due stadi (vedi schema 2.8). Prima il dietil 2-benzoilsuccinato viene ottenuto attraverso una sostituzione nucleofila dell'etil-benzoilacetato con estere bromoacetico in acetone e DME. Il prodotto viene ottenuto con resa quantitativa e utilizzato nella reazione successiva senza purificazione. Il secondo *step*, che prevede la sintesi del precursore per ciclizzazione del dietil 2-benzoilsuccinato con acetato d'ammonio in acido acetico, porta alla formazione dell'anello pirrolico.



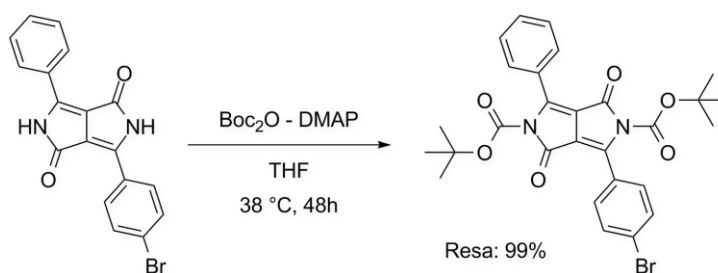


Schema 2.8: Sintesi del precursore pirrolico.

Il pigmento asimmetrico, denominato mono-Br-DPP, si ottiene per reazione del precursore pirrolico con *p*-bromobenzonitrile (vedi schema 2.9) fornendo il prodotto mono-Br-DPP come solido polverulento di color rosso ciclamino scuro. Questo viene successivamente funzionalizzato con il gruppo protettore *t*-Boc, per renderlo reattivo nella reazione di *cross-coupling* (schema 2.10).

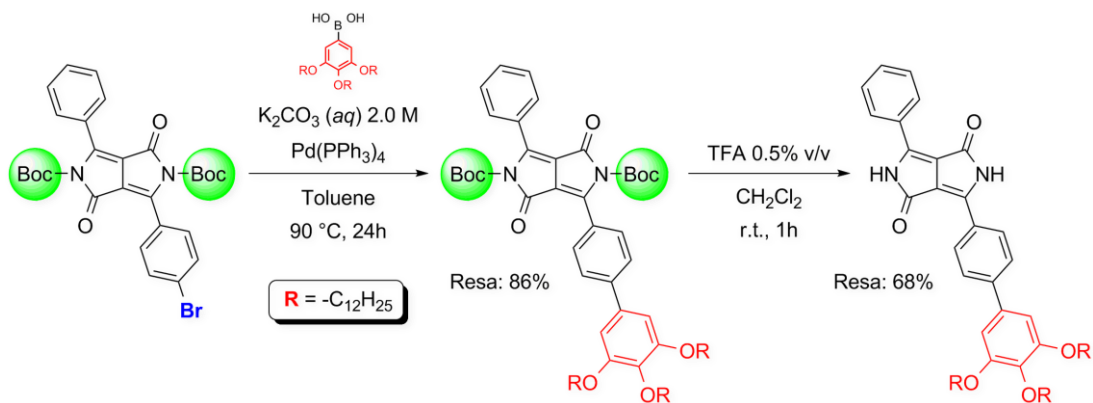


Schema 2.9: Sintesi mono-Br-DPP.



Schema 2.10: Sintesi mono-Br-DPP-Boc.

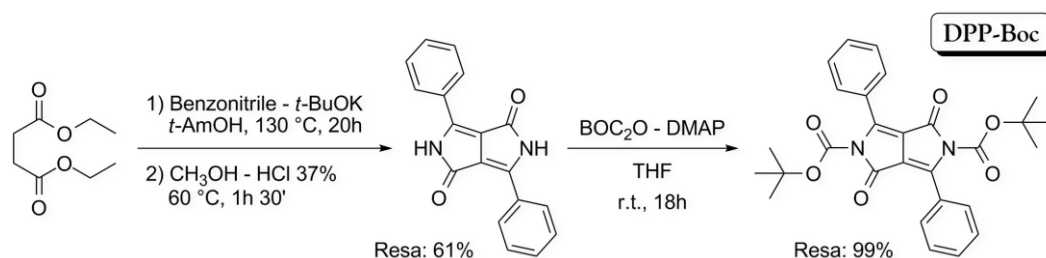
Nello schema 2.11 vengono illustrati gli ultimi due passaggi per la sintesi dell'unità monomeric del mono-*longchains*-DPP. La sintesi è analoga a quella descritta per il *longchains*-DPP.


 Schema 2.11: Sintesi mono-*longchains*-DPP.

### 2.3.3. Molecola-modello ad aggregazione limitata

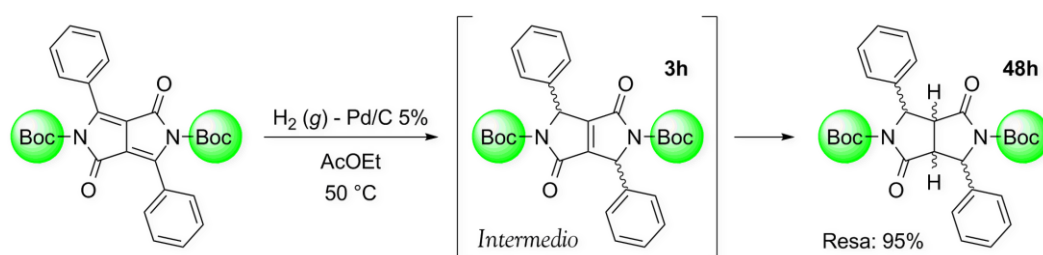
In questa sezione verrà descritta la procedura di sintesi per l'ottenimento di una molecola-modello ad aggregazione limitata. La struttura realizzata è una molecola analoga al *longchains*-DPP, simile per struttura e peso molecolare, ma incapace di aggregare perché privata della possibilità d'interagire in maniera non-covalente. Tale molecola verrà adottata come riferimento per il calcolo del coefficiente di diffusione del *longchains*-DPP in soluzione, attraverso la tecnica NMR bidimensionale DOSY.

L'idea consiste nell'impedire la formazione dei legami a idrogeno mediante una metilazione diretta della funzionalità ammidica, e nell'ostacolare l'interazione di *stacking*  $\pi$ - $\pi$  tramite una riduzione dei doppi legami interni al bicyclo del **DPP**. Per studiare la reazione di riduzione si decide inizialmente di utilizzare come substrato modello il DPP-Boc, la cui sintesi è descritta nello schema 2.12.



Schema 2.12: Sintesi **DPP** e **DPP-Boc**.

La reazione di riduzione del DPP-Boc procede in AcOEt a 50 °C, utilizzando H<sub>2</sub> gassoso e Pd/C 5% in quantità catalitica. Un monitoraggio orario dell'andamento della reazione permette di comprendere come a tre ore dall'inizio si verifichi la formazione del prodotto intermedio riportato nello schema 2.13, con il doppio legame centrale ai due anelli pirrolici del **DPP**. Dopo due giorni invece si ha l'esauriva idrogenazione del composto.



Schema 2.13: Riduzione del **DPP-Boc**.

Considerata la struttura prochirale del **DPP**, con una reazione di riduzione si possono raggiungere teoricamente sedici possibili stereoisomeri, il cui numero si riduce a dodici attraverso le opportune operazioni di simmetria (vedi figura 2.31). Per semplicità in questa descrizione gli enantiomeri verranno omissi, perché indistinguibili attraverso l'analisi NMR effettuata.



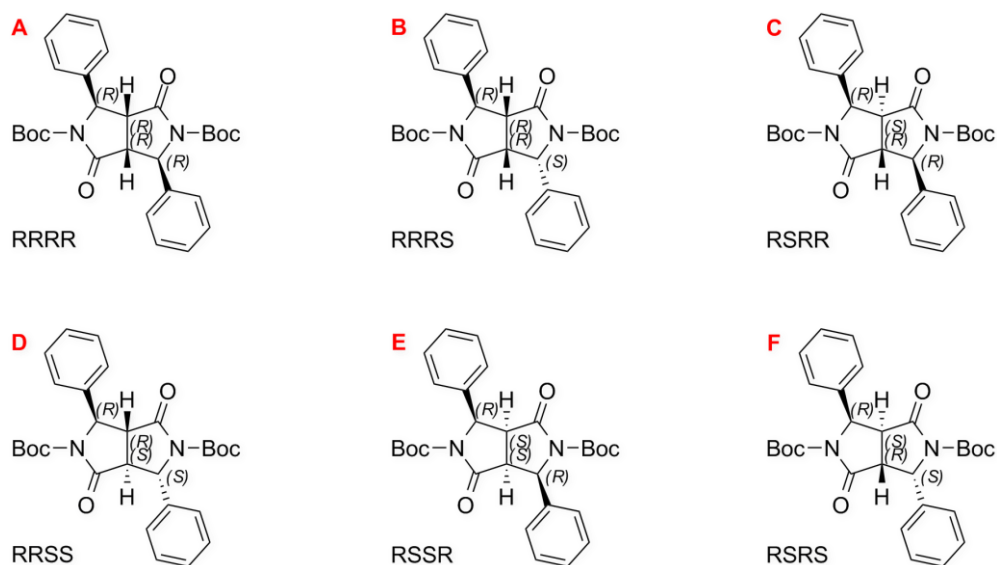


Figura 2.31: Possibili stereoisomeri generati dalla riduzione del DPP-Boc.

Ricordando che l'idrogenazione con Pd/C conduce sempre a prodotti con idrogeni *sin*-orientati, se non si considera l'intermedio di reazione, le uniche strutture possibili per il prodotto finale sarebbero date da **E** e **F**. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR dell'intermedio (fig. 2.32) però è compatibile solamente con le strutture **I1** e **I2**, per la presenza del protone benzilico a 5.81 ppm in forma di singoletto, indice di simmetria molecolare.

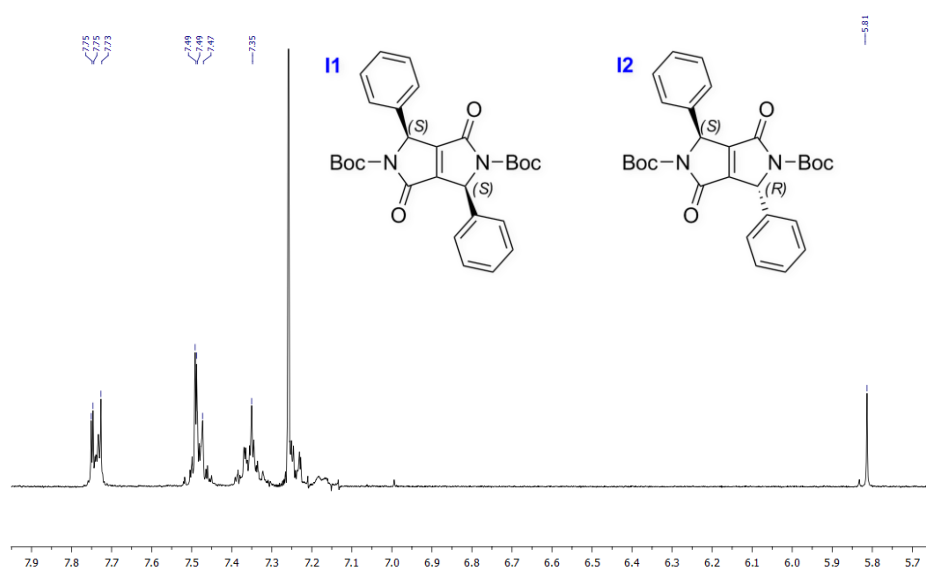


Figura 2.32: Spettro  $^1\text{H}$  NMR della riduzione del DPP-Boc dopo 3h.

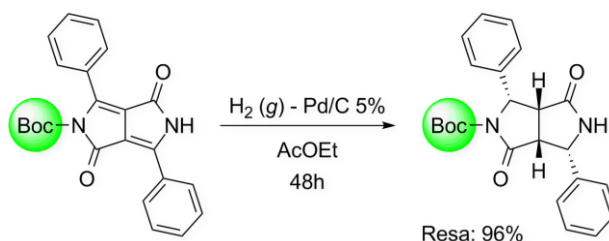
Per quanto premesso, considerato che l'idrogenazione esaustiva dall'intermedio al prodotto porta a prodotti i cui atomi di idrogeno centrali sono sempre *sin*-orientati, le sole strutture ipotizzabili diventano **A**, **B** ed **E**. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del prodotto però (vedi parte sperimentale) esclude **B** perché molecola priva di simmetria e quindi con molteplicità di segnali maggiore.

Per stabilire l'esatta configurazione stereochimica degli atomi di idrogeno comuni agli anelli pirrolici interni del **DPP** (identificando la struttura **A** o **E**), si decide di ridurre una struttura asimmetrica, il DPP-mono-BOC. Da un breve cenno di letteratura brevettuale<sup>51</sup> si ricava una procedura sintetica per ottenere questo derivato asimmetrico partendo direttamente dal DPP-Boc. La metodologia sintetica, ottimizzata dopo vari tentativi (schema 2.14), prevede la dissoluzione del DPP-Boc in una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 9:1, seguita dall'adsorbimento su silice. Dopo aver rimosso il solvente a pressione ridotta, si lascia riposare il solido qualche giorno ad alto vuoto a temperatura ambiente, quindi si lava la silice ripetutamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le fasi organiche non evaporate forniscono il DPP-mono-Boc con scomparsa totale del reagente e una resa pari al 64%.



Schema 2.14: Sintesi DPP-mono-Boc.

La riduzione del DPP-mono-Boc avviene in maniera simile a quanto sopra descritto per il DPP-Boc, in AcOEt utilizzando H<sub>2</sub> gassoso e Pd/C 5% come catalizzatore, fornendo il prodotto desiderato con resa del 96%.



Schema 2.15: Riduzione DPP-mono-Boc.

L'analisi dello spettro bidimensionale NOESY relativo al DPP-mono-Boc ridotto permette di capire in modo inequivocabile che gli atomi di idrogeno comuni agli anelli pirrolici interni si collocano spazialmente dalla stessa parte della molecola, opposti rispetto agli anelli aromatici, e che quindi la struttura corretta è la **E**. Nello spettro NOESY vengono evidenziate tutte le interazioni indicate sulla struttura tridimensionale riportata a fianco (fig. 2.33).

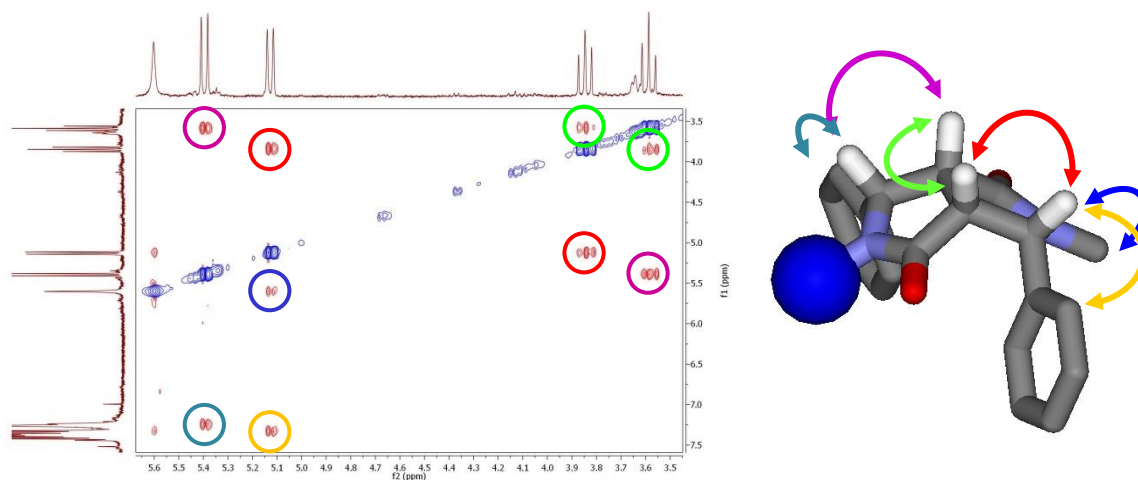
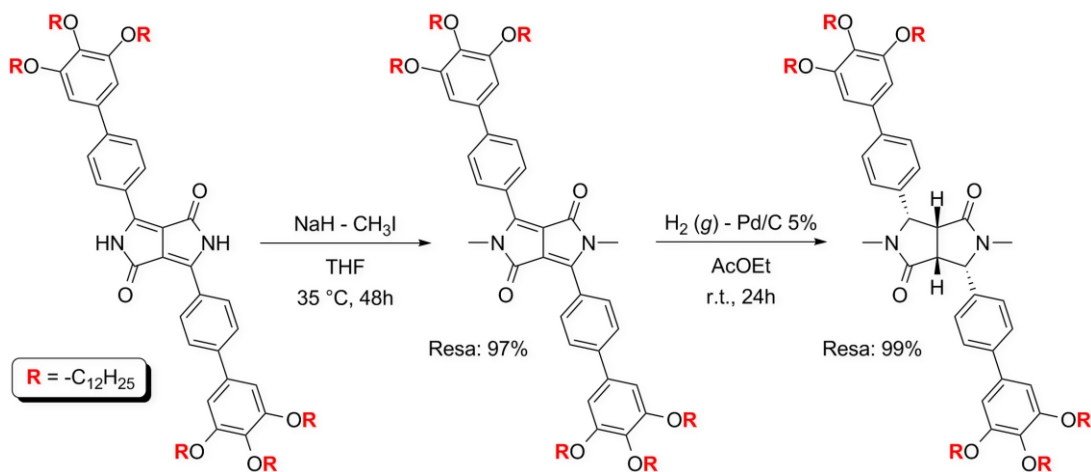


Figura 2.33: Spettro NOESY e struttura 3D per il DPP-mono-Boc ridotto.

Grazie a questo studio si può affermare che il DPP-mono-Boc presenta una struttura pseudo-curva, incapace di aggregare attraverso qualsiasi tipo di interazione di tipo  $\pi$ - $\pi$ .

I risultati ottenuti per la molecola di DPP-Boc hanno permesso di proseguire la sintesi dello standard di riferimento da utilizzare per il DOSY. Per prima cosa il *longchains*-DPP viene metilato. La reazione procede in THF anidro a 35 °C, utilizzando NaH come base e CH<sub>3</sub>I come agente alchilante. Il *longchains*-DPP metilato viene ottenuto con resa quantitativa e si presenta come un olio di color rosso acceso. La successiva riduzione dei doppi legami dei cicli pirrolici avviene in AcOEt a temperatura ambiente, utilizzando ancora H<sub>2</sub> gassoso e Pd/C 5% come catalizzatore. Il prodotto finale desiderato si ottiene con resa quantitativa senza necessità di purificazione e si presenta come un olio trasparente.



Schema 2.16: Metilazione e riduzione del *longchains*-DPP.

## 2.4. Caratterizzazione del longchains-DPP

### 2.4.1. Spettroscopia di assorbimento UV-Vis e fluorescenza

Dal momento che il longchains-DPP è un derivato di un pigmento, le prime caratterizzazioni che vengono effettuate sono di tipo ottico. In figura 2.36 si rappresentano gli spettri di assorbimento UV-Vis a concentrazione variabile in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per calcolarne il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) e la retta di taratura (con un valore di  $R^2$  pari a 0.9945), ottenuta a  $\lambda$  fissa, il cui coefficiente angolare fornisce il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$ , risultato pari a 22500.

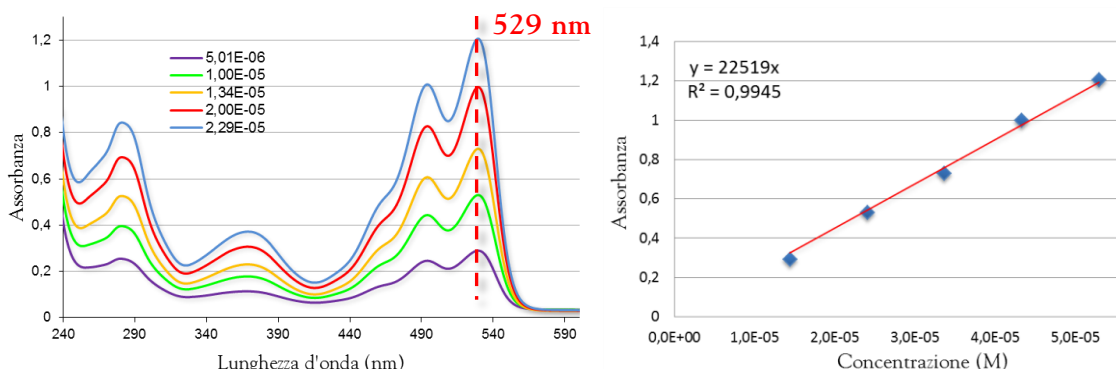


Figura 2.34: Assorbimento UV-Vis del longchains-DPP e calcolo di  $\epsilon$ .

Viene valutata anche la proprietà di emissione di fluorescenza del monomero, come evidenziato da figura 2.35.

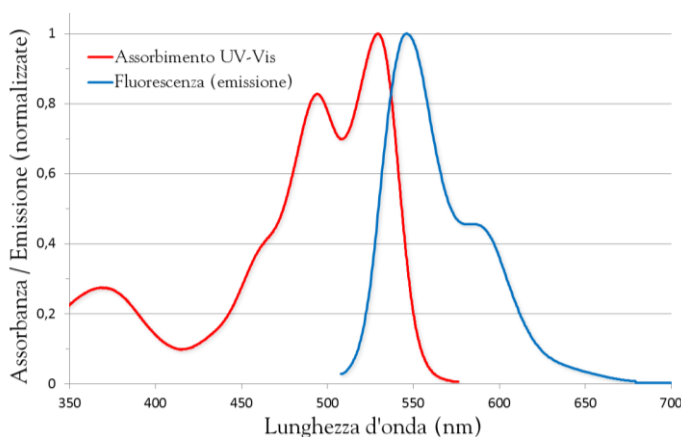


Figura 2.35: Assorbimento UV-Vis ed emissione di fluorescenza del longchains-DPP.

Come si potrà constatare successivamente, la presenza dei due massimi d'assorbimento attorno a 500 nm è consistente con la completa solubilizzazione del polimero nel solvente. Soluzioni diluite dimostrano fin da subito un ottimo grado di fluorescenza e sono caratterizzate da un colore arancione chiaro, mentre aumentando la concentrazione il colore vira a rosso scuro, mantenendo la fluorescenza. Il massimo di assorbimento si ha, come già detto, a 529 nm, mentre il picco massimo di emissione si trova a 546 nm. Lo Stokes shift risulta pari a 17 nm, in linea con i pigmenti appartenenti alla classe del DPP, ed inferiore rispetto a quanto si può raggiungere attraverso una N-sostituzione.

## 2.4.2. Esperimenti NMR

a) Titolazioni  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{CDCl}_3$ 

Un test preliminare per verificare l'aggregazione del polimero supramolecolare in soluzione consiste in esperimenti di diluizione  $^1\text{H}$  NMR a temperatura costante ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) in  $\text{CDCl}_3$ . Nella figura sottostante (fig. 2.36) al diminuire della concentrazione si nota il *downshift* del segnale relativo al protone ammidico verso regioni più schermate, indicativo di un legame a idrogeno intermolecolare più debole, ed il restringimento delle bande dei protoni aromatici. Queste variazioni di *chemical shift* in funzione della concentrazione confermano la presenza di aggregati in soluzione in equilibrio fra loro, in regime di scambio veloce per la scala dei tempi NMR.

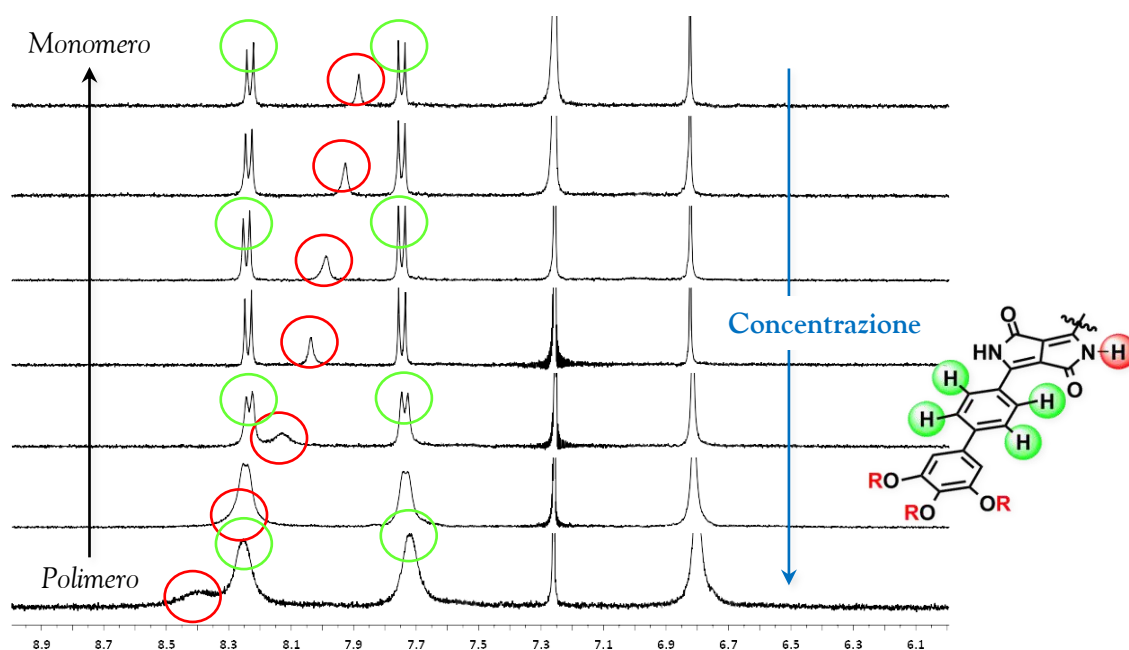


Figura 2.36: Esperimenti di diluizione  $^1\text{H}$  NMR del longchains-DPP ( $\text{CDCl}_3$ ).

A questo punto si è deciso di quantificare la dimensione, ovvero il numero di molecole aggregate presenti in soluzione, valutando il *DP* attraverso esperimenti NMR a concentrazione variabile. Si sono registrati tredici spettri a concentrazione variabile (fig. 2.37), e ogni spettro è stato anche simulato attraverso deconvoluzioni (somma di funzioni lorenziane e gaussiane), al fine di calcolare l'esatto valore del *chemical shift* (vedi figura 2.38).

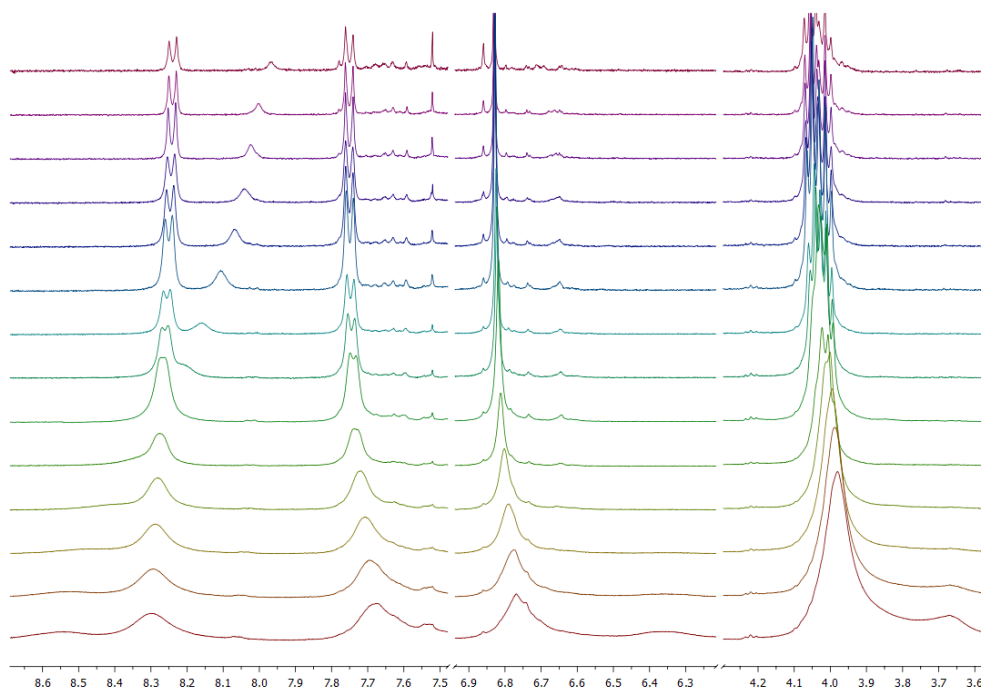


Figura 2.37: Spettri reali di diluizione  $^1\text{H}$  NMR del longchains-DPP ( $\text{CDCl}_3$ ).

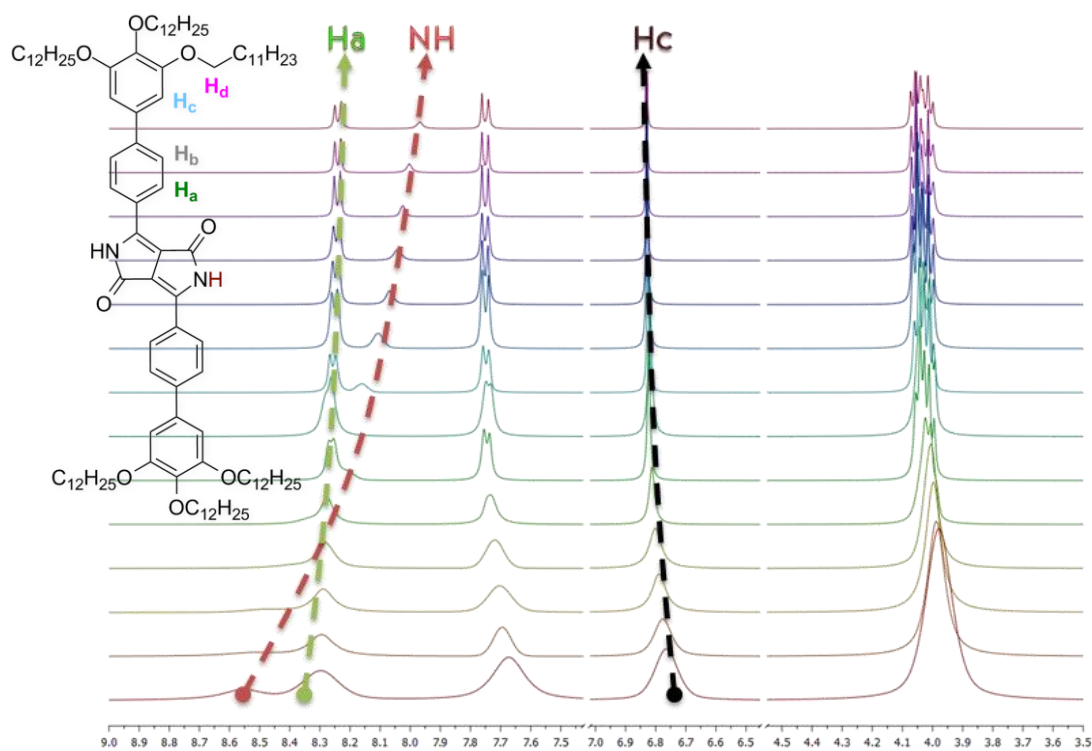
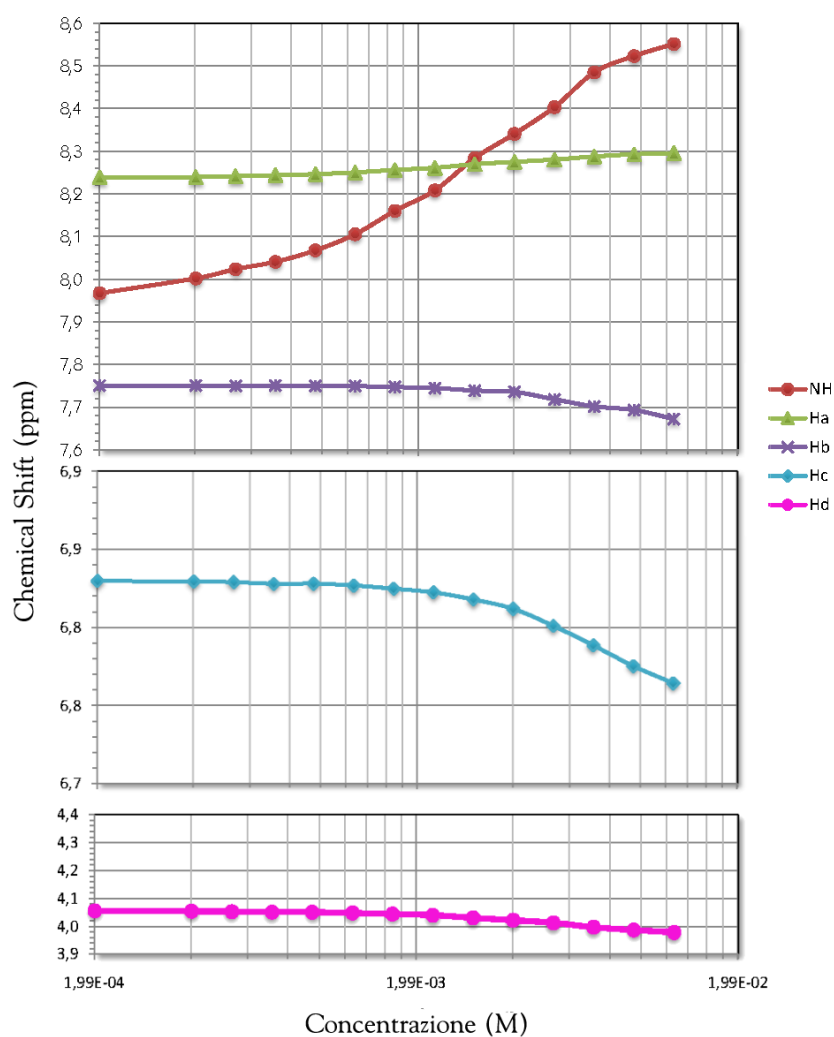


Figura 2.38: Spettri simulati di diluizione  $^1\text{H}$  NMR del longchains-DPP ( $\text{CDCl}_3$ ).

In tabella 2.2 si riportano i valori di *chemical shift* relativi ai protoni del longchains-DPP a tutte le diluizioni effettuate, e di seguito per chiarezza gli andamenti dei *chemical shift* in funzione della concentrazione in forma grafica (fig. 2.39).

#	Concentrazione	NH	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>d</sub>
1	1.2610 E-02	8.5521	8.2960	7.6724	6.7644	3.9787
2	9.4574 E-03	8.5238	8.2933	7.6938	6.7754	3.9874
3	7.0931 E-03	8.4850	8.2881	7.7022	6.7886	3.9971
4	5.3198 E-03	8.4038	8.2808	7.7188	6.8011	4.0130
5	3.9899 E-03	8.3411	8.2755	7.7360	6.8120	4.0222
6	2.9924 E-03	8.2842	8.2700	7.7395	6.8180	4.0309
7	2.2443 E-03	8.2086	8.2614	7.7452	6.8225	4.0404
8	1.6832 E-03	8.1604	8.2565	7.7475	6.8249	4.0446
9	1.2624 E-03	8.1060	8.2506	7.7499	6.8269	4.0484
10	9.4681 E-04	8.0679	8.2468	7.7509	6.8281	4.0510
11	7.1011 E-04	8.0412	8.2443	7.7511	6.8280	4.0518
12	5.3258 E-04	8.0239	8.2419	7.7509	6.8291	4.0534
13	3.9944 E-04	8.0025	8.2400	7.7512	6.8295	4.0544

Tabella 2.2: Variazioni dei chemical shift relativi ai protoni del longchains-DPP.


 Figura 2.39: Andamento del chemical shift per i protoni NH e H<sub>a-d</sub> del longchains-DPP.

Per effettuare il *fitting* dei dati sperimentali si è scelto di seguire l'andamento del protone  $H_a$  (vedi figura 2.39), *probe* ideale per valutare i parametri termodinamici del processo di *self-assembly*, in quanto vicino all'interazione non covalente responsabile del riconoscimento molecolare. Il segnale del protone legato all'azoto (NH), che presenta le variazioni maggiori, non è un buon candidato per questo tipo di analisi perché, oltre a partecipare al legame a idrogeno, può scambiare anche con tracce d'acqua presenti nel solvente. Il profilo dei dati sperimentali (vedi figura 2.40 A), nell'intervallo di concentrazione e temperatura indagato, rivela un meccanismo di aggregazione chiaramente isodesmico. In figura 2.40 B si rappresenta il *fitting* dei dati sperimentali effettuato attraverso il software Scientist<sup>®</sup>, elaborato graficamente mediante Microsoft Excel<sup>®</sup>. Le equazioni di *fitting* vengono ricavate secondo l'approccio di Zhao e Moore<sup>29i</sup> (vedi Appendice A – Modello di Zhao e Moore).

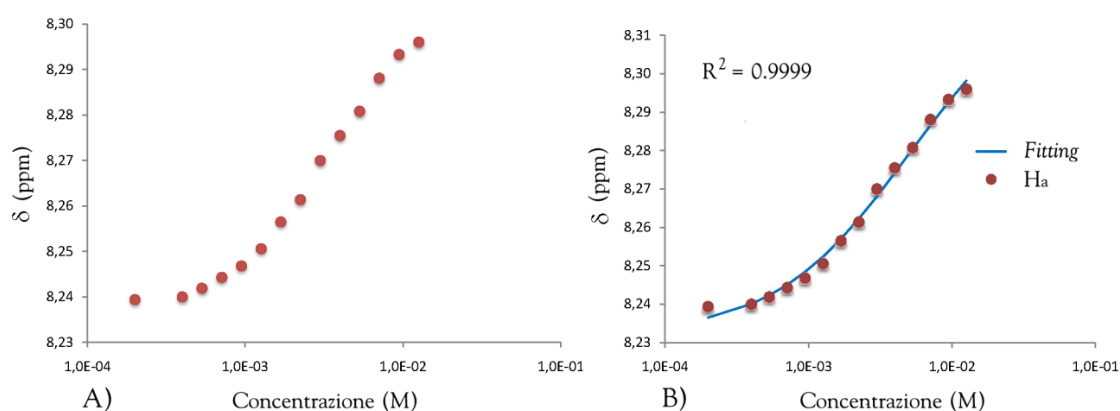


Figura 2.40: (A) Andamento del valore di  $\delta$  di  $H_a$  e (B) fitting dei dati ottenuti.

Il *fitting* non lineare ha permesso così di calcolare la costante di associazione del *longchains-DPP* in  $CDCl_3$ , risultata pari a  $K=1.08 \times 10^2 \pm 15 \text{ M}^{-1}$ , e i valori dei *chemical shift* teorici del monomero  $\delta_m=8.232 \pm 0.001$  e del polimero  $\delta_p=8.328 \pm 0.004$ , tramite estrapolazione asintotica. In figura 2.41 si rappresenta infine la variazione del grado di associazione  $\alpha$  (equivalente a  $\Phi_n$ , come verrà descritto nel Par. 2.4.4) in funzione della concentrazione adimensionale  $KC_T$  (con  $C_T$  = concentrazione totale delle specie).

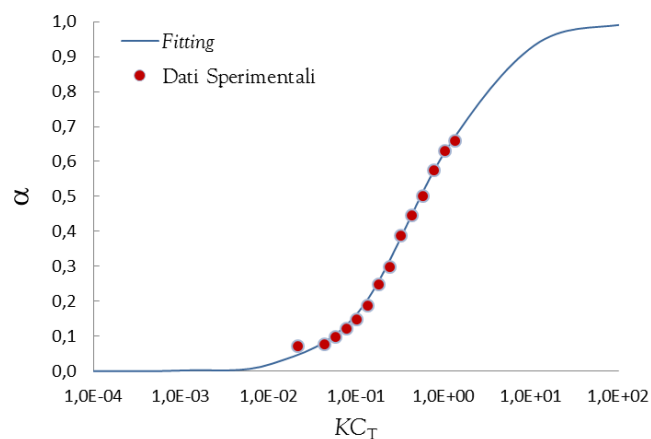


Figura 2.41: Variazione di  $\alpha$  in funzione di  $KC_T$ .



Attraverso il valore di  $K$  si può risalire al  $DP$ , che per soluzioni più concentrate si attesta attorno al valore di 6 molecole. In figura 2.42 viene rappresentata la variazione del  $DP$  in funzione della concentrazione  $C_T$ . Come si può apprezzare dai grafici delle figure 2.41 e 2.42, vi è pieno accordo fra i dati sperimentali e la teoria descritta nel paragrafo 2.1.2 per l'associazione di tipo isodesmico.

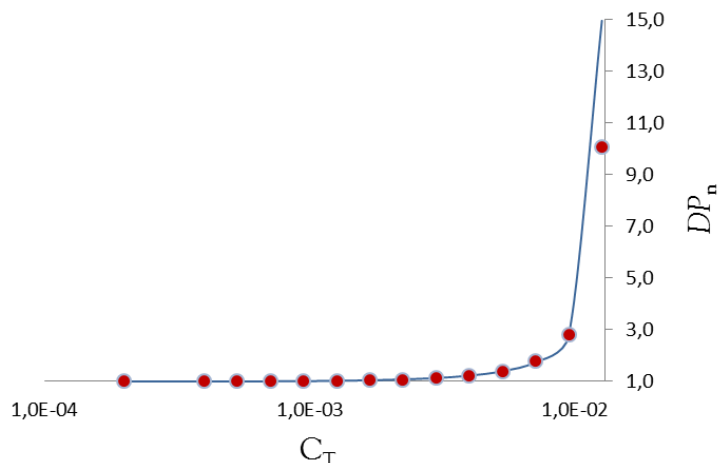


Figura 2.42: Variazione del  $DP_n$  in funzione di  $KC_T$ .

Come già anticipato nel paragrafo introduttivo 2.1.2, a causa della semplificazione introdotta con la formula (10) (vedi Appendice B), per cui tutti gli equilibri in soluzione vengono ricondotti al semplice caso monomero/polimero, indistinguibile dal caso monomero/dimero, questo tipo di misure “indirette” deve trovare riscontro in un’altra tecnica più “diretta”, che stimi nuovamente la dimensione dell’aggregato. In questo lavoro di tesi si è scelta la tecnica NMR DOSY, sempre più popolare nella caratterizzazione di polimeri supramolecolari, che consente di risalire al numero di molecole aggregate in soluzione, a una data concentrazione, grazie al calcolo del valore del coefficiente di diffusione traslazionale.

## b) DOSY

Nella tecnica NMR DOSY (*diffusion ordered spectroscopy*) il coefficiente di diffusione traslazionale  $D$  [ $m^2/s$ ] di specie molecolari in soluzione può essere calcolato grazie all’equazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

T: temperatura  
 $\eta$ : viscosità del solvente  
 R: raggio idrodinamico della molecola  
 $k_B$ : costante di Boltzmann

In accordo con tale equazione, il valore di  $D$  è inversamente proporzionale al raggio idrodinamico di una molecola. Pertanto, la dimensione di un aggregato può essere calcolata a partire dal valore di  $D$  solo se gli altri parametri rimangono pressoché costanti.<sup>52</sup>

Secondo tali premesse è stata sintetizzata una molecola strutturalmente analoga al *longchains-DPP*, di peso molecolare quasi identico ( $\Delta=32$  u), ma incapace di aggregare (vedi Par. 2.3.3, schema 2.16). Questa struttura, di fatto un *longchains-DPP* metilato e ridotto, rappresenta il riferimento per il calcolo del coefficiente di diffusione traslazionale. La metilazione infatti impedisce la formazione di legami a idrogeno intermolecolari, mentre la

riduzione dei doppi legami interni al bicyclo del **DPP** ne impedisce l'interazione tramite  $\pi$ - $\pi$  *stacking* a causa della conformazione pseudo-curva assunta dalla molecola (vedi Par. 2.3.3). In figura 2.43 si riportano gli spettri DOSY in  $\text{CDCl}_3$  del *longchains*-DPP e del riferimento. Appare subito chiaro come i valori dei coefficienti  $D$  siano sensibilmente diversi per le due molecole, e come il *longchains*-DPP diffonda con maggiore difficoltà nel solvente perché forma aggregati a elevato raggio idrodinamico. Altri esperimenti effettuati, non riportati, dimostrano come aumentando la diluizione delle soluzioni del *longchains*-DPP il coefficiente di diffusione tenda al valore limite del riferimento ( $D_{\text{rif}}$ ). La differenza del valore di  $D$  apprezzata è inoltre tale da poter affermare che in soluzione ci sono aggregati superiori ai semplici dimeri, per i quali  $D$  dovrebbe essere molto simile a quello della specie che non aggrega,  $D \sim D_{\text{rif}}$ .

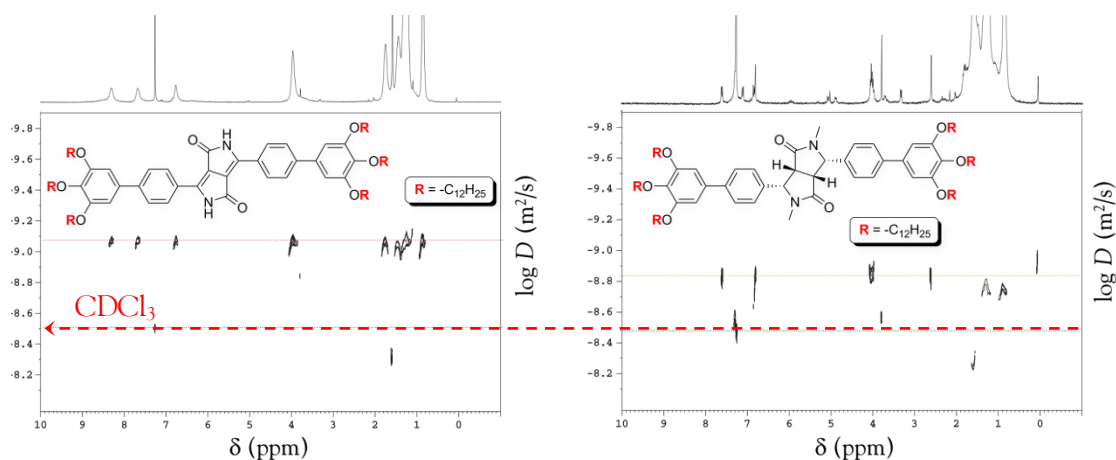


Figura 2.43: Spettri NMR DOSY per il *longchains*-DPP ed il riferimento ( $c=1.21 \times 10^{-2}$  M).

Inoltre, secondo quanto riportato dalla letteratura,<sup>52</sup> il coefficiente di diffusione traslazionale permette di risalire al numero medio di molecole aggregate in soluzione, grazie alla formula  $DP = (D_{\text{rif}} / D)^3$ . Questa espressione si ottiene attuando una semplificazione del sistema: la radice cubica del PM degli aggregati è infatti proporzionale a  $D^{-1}$  se tutti gli oligomeri vengono considerati idrodinamicamente sferici.<sup>11</sup> In questo caso il risultato di tale rapporto fornisce un valore pari a 6.5, in pieno accordo con i valori calcolati tramite gli esperimenti di diluizione NMR, entro il limite dell'errore sperimentale.

$$DP_{\text{DOSY}} \approx \left( \frac{D_{\text{monomero}}}{D_{\text{polimero}}} \right)^3 = \left( \frac{-9.1}{-8.83} \right)^3 = 6.5$$

<sup>11</sup> Tale stima rappresenta comunque un dato approssimativo, dal momento che la forma idrodinamica degli aggregati non sarà mai perfettamente sferica.

### 2.4.3. Esperimenti $^1\text{H}$ NMR a temperatura variabile in $\text{MCH-d}_8$

I risultati ottenuti dagli esperimenti fin qui descritti dimostrano come, attraverso una semplice aggregazione isodesmica, sia impossibile raggiungere un elevato  $DP$  per il *longchains-DPP*, a causa del basso valore della costante di associazione. Si è quindi deciso di cambiare solvente per indurre il fenomeno di polimerizzazione ad avvenire attraverso un meccanismo di tipo cooperativo.

Si è dapprima sciolto il polimero “forzatamente”, attraverso un bagno ad ultrasuoni ad alta potenza per 1h, in un solvente che favorisse l’incontro delle unità ripetitive. Il metilcicloesano (MCH) possiede questa proprietà, avendo una scarsa capacità di solvatare molecole che danno legami a idrogeno, e permette di ottenere una soluzione altamente viscosa. L’associazione tramite legami a idrogeno del *longchains-DPP* porta alla formazione di oligomeri con una parte centrale planare aromatica, circondata da catene laterali alchiliche flessibili, struttura che favorisce la formazione di aggregati ad architettura colonnare in MCH, ambiente incapace di solvatare il centro aromatico.<sup>53</sup> In questo caso dunque, l’apolarità del solvente impiegato è tale da consentire l’organizzazione gerarchica del composto tramite legami a idrogeno e *stacking*  $\pi$ - $\pi$ , perché esclude la competizione del solvente stesso con la formazione delle interazioni non-covalenti tra unità monomeriche.

Si è quindi deciso di registrare lo spettro  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{MCH-d}_8$  al limite di solubilità del *longchains-DPP* ( $\sim 10^{-4}$  M). Come si può osservare in figura 2.44, lo spettro registrato a temperatura ambiente è completamente diverso da quello ottenuto per la stessa molecola in  $\text{CDCl}_3$  (fig. 2.37): nella regione aromatica emerge qualche segnale appartenente alle poche specie oligomere presenti in soluzione. In analogia con quanto osservato per soluzioni di *longchains-DPP* in  $\text{CDCl}_3$ , le specie aggregate producono un allargamento delle bande che, se portate ad una situazione estrema (elevato  $DP$ ), tendono ad appiattirsi sulla linea di base dello spettro. La complessità dello spettro  $^1\text{H}$  NMR suggerisce di incrementare la temperatura, e osservare se le specie aggregate de-assemblino rigenerando il monomero.

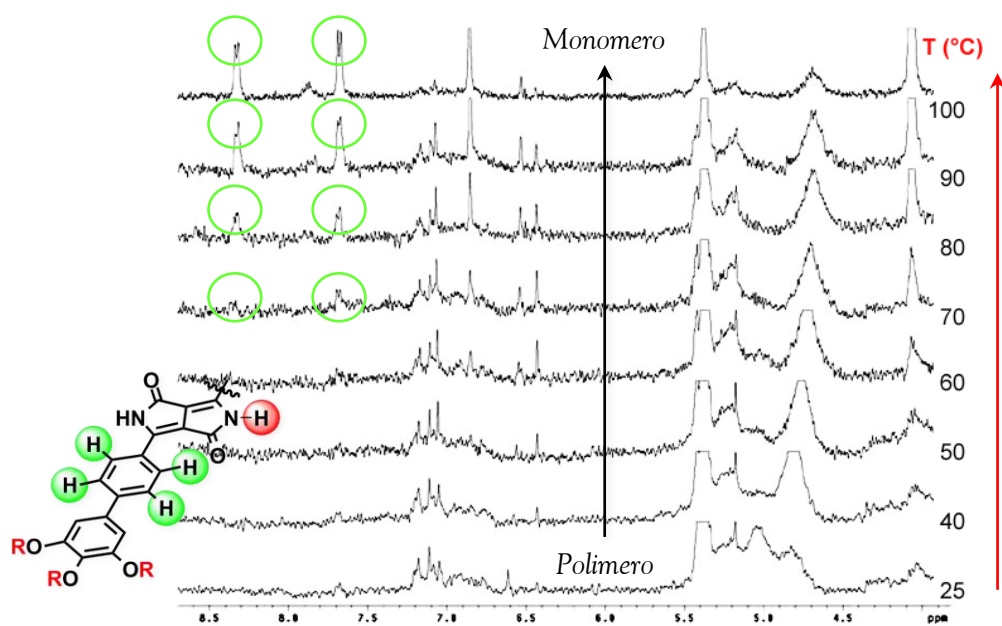


Figura 2.44: Esperimenti  $^1\text{H}$  NMR del *longchains-DPP* ( $\text{MCH-d}_8$ ) a temperatura variabile.

Incrementando la temperatura si nota chiaramente (dai 70 °C) la comparsa dei segnali relativi ai protoni aromatici, consistente con la transizione da polimero supramolecolare a unità oligomerica e monomerica in soluzione. Si nota chiaramente come, in generale, un processo di *self-assembly* dipenda fortemente dalla struttura del solvente, perché quest'ultimo crea un "guscio" di molecole che giocano un ruolo attivo nella ridefinizione degli aggregati e dei pre-aggregati.<sup>54</sup>

Questa osservazione qualitativa degli esperimenti NMR e dell'aggregazione del *longchains*-DPP in MCH-d<sub>8</sub> alimenta la speranza che quanto osservato sia dovuto a fenomeni di aggregazione di tipo cooperativo. Purtroppo la complessità dello spettro <sup>1</sup>H NMR rende impraticabile la stima dei parametri termodinamici.

#### 2.4.4. Esperimenti di spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile

Per identificare in maniera inequivocabile il meccanismo di *self-assembly* del *longchains-DPP* in MCH si è deciso di utilizzare come tecnica analitica alternativa la spettroscopia d'assorbimento UV-Vis (a temperatura variabile e concentrazione costante). Questa, rispetto alla risonanza magnetica nucleare, presenta il vantaggio di avere una sensibilità più elevata, consentendo così di lavorare a diluizioni maggiori.<sup>III</sup> S'intende allora seguire la transizione completa da stato monomero (alte temperature) a stato polimerico (basse temperature), per distinguere tra aggregazione isodesmica e cooperativa.<sup>39</sup>

Di seguito si riportano gli spettri di assorbimento UV-Vis registrati per una soluzione di *longchains-DPP* in MCH ( $1.4 \times 10^{-5}$  M), nell'intervallo di temperature da 95 °C a 25 °C (fig. 2.45). La termo-reversibilità del processo viene confermata ripetendo più misure a temperatura variabile con lo stesso campione: poiché le transizioni restano le stesse senza alcuna isteresi, si ha conferma che si tratta di un *self-assembly* mediato da interazioni non covalenti.<sup>54</sup>

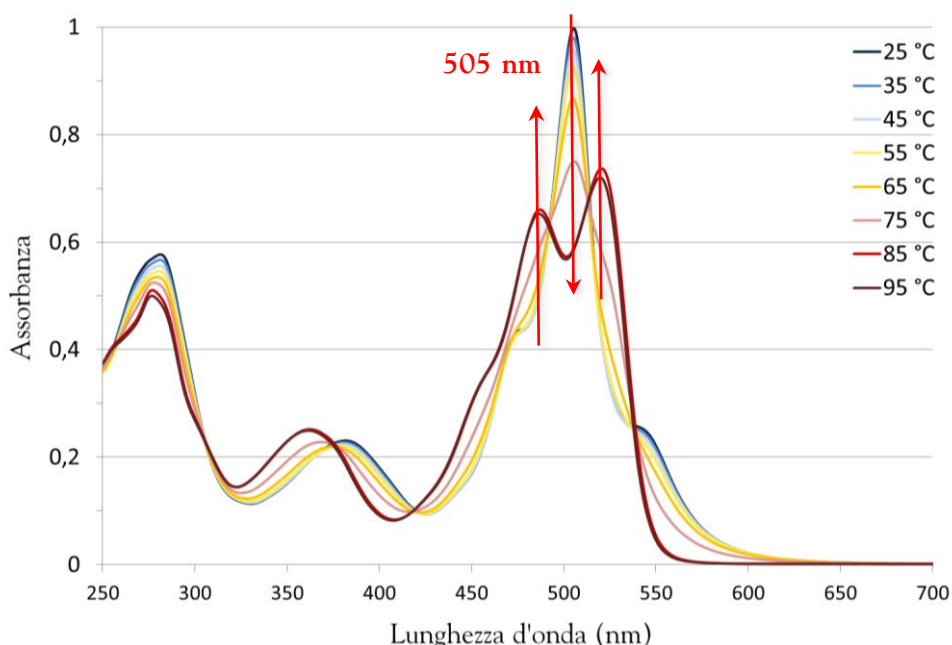


Figura 2.45: Spettri di assorbimento UV-Vis a temperatura variabile (*longchains-DPP*).

Come previsto, le misure di assorbimento rivelano subito due differenti situazioni dei cromofori in soluzione di MCH: specie monomeriche (o dimeriche, legate a idrogeno) ad alte temperature, e aggregati a basse temperature. Per temperature maggiori di 75 °C lo spettro diventa pressoché identico a quello che si osserva sciogliendo il *longchains-DPP* in  $\text{CHCl}_3$  a temperatura ambiente.<sup>15,55</sup> La variazione di assorbimento UV-Vis osservata a basse temperature è dovuta quindi all'instaurarsi di legami non covalenti (legami a idrogeno e *stacking*  $\pi$ - $\pi$ ) tra molecole adiacenti, con conseguente rottura a seguito di riscaldamento.<sup>54</sup>

Dagli spettri sono evidenti sette punti isobestici, indicativi di una transizione tra specie chimiche all'equilibrio, in cui l'assorbanza è indipendente dal rapporto molare delle

<sup>III</sup> In tal modo si è certi di avere il fenomeno di *self-assembly* a basse temperature.

specie, che presentano dunque lo stesso valore di  $\epsilon$ . Il massimo di assorbimento per temperature maggiori di 80 °C a 518 nm (corrispondente a quello dello spettro registrato in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per il calcolo del coefficiente di estinzione molare) subisce inoltre uno *shift* ipsocromo al diminuire della temperatura (505 nm), indicando la probabile formazione di aggregati di tipo H (vedi Appendice C – Aggregati H e aggregati J).<sup>56</sup>

Per studiare il fenomeno di aggregazione supramolecolare si decide di seguire la variazione di assorbanza a lunghezza d'onda fissa ( $\lambda$ : 505 nm, dove si registra il maggiore decremento di assorbanza) a temperatura variabile, per quattro soluzioni a concentrazione differente (da  $7.01 \times 10^{-6}$  M a  $1.75 \times 10^{-5}$  M). Per indurre la polimerizzazione supramolecolare ad avvenire sotto regime termodinamico (condizioni d'equilibrio)<sup>57</sup> e sopprimere effetti cinetici di non-equilibrio del *self-assembly*, si diminuisce la temperatura del campione con una velocità pari a 0.3 °C/min, registrando l'assorbanza di grado in grado. L'esperimento viene ripetuto per quattro soluzioni a concentrazione differente perché l'interpolazione prevede l'utilizzo di equazioni multi-parametro (fig. 2.46).

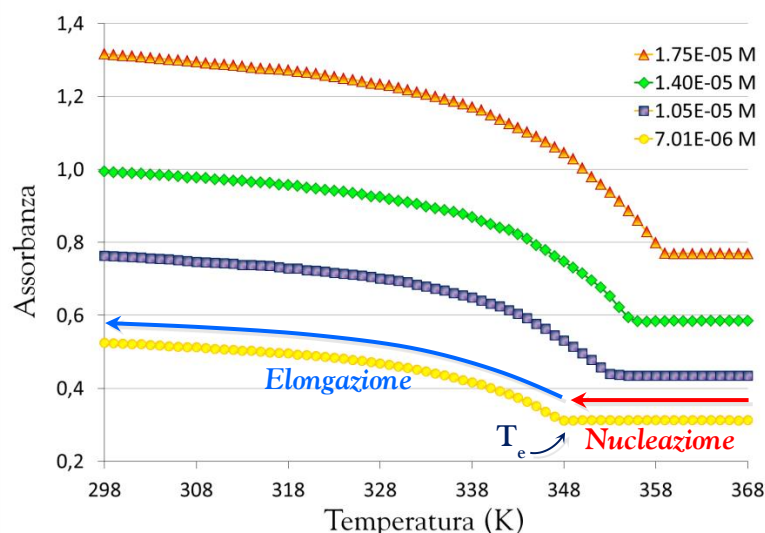


Figura 2.46: Variazione di assorbanza a temperatura variabile (longchains-DPP).

L'andamento non sigmoideale delle curve dimostra in modo inequivocabile che il monomero in queste condizioni aggrega secondo un meccanismo di tipo cooperativo.<sup>IV</sup> Si possono distinguere infatti con facilità due regimi di temperature, quello di nucleazione (alte temperature) e quello di elongazione (temperature minori), separati dalla temperatura di elongazione  $T_e$  (evidenziata per la serie a concentrazione  $7.01 \times 10^{-6}$  M). Da 368 K fino alla temperatura di elongazione si ha quindi il processo di nucleazione, governato da una prima costante  $K_n$ , che porta all'ottenimento del nucleo. Fino a questo punto la maggior parte del sistema è inattivo, solo quando viene raggiunta la  $T_e$  si ha l'attivazione. Infine, per valori di temperatura  $T < T_e$ , si ha il processo di elongazione (crescita degli aggregati) caratterizzato da una costante  $K_e \gg K_n$ .

<sup>IV</sup> Se l'andamento è sigmoideale si ricorre al modello isodesmico (vedi Cap. 2.1.2 a).

Per effettuare il *fitting* delle serie di assorbimento ci si riferisce al modello sviluppato da van der Shoot, descritto nella sezione introduttiva (vedi Cap. 2.1.2 b). Poiché i processi di aggregazione sono due (nucleazione ed elongazione), i dati sperimentali vengono interpolati con le due equazioni sotto riportate, ricavate attraverso un procedimento matematico che esula dal presente lavoro di tesi.

$$\phi_n = \phi_{sat} \left[ \sqrt[3]{K} \exp \left[ \left( \frac{2}{3\sqrt[3]{K}} - 1 \right) \frac{h_e}{RT_e^2} (T - T_e) \right] \right] \quad (1) \quad \text{Nucleazione}$$

$$\phi_n = \phi_{sat} \left[ 1 - \exp \left( \frac{-h_e}{RT_e^2} \right) (T - T_e) \right] \quad (2) \quad \text{Elongazione}$$

Bisogna evidenziare che  $\Phi_n$  e  $\alpha$  (usato nel caso dell'aggregazione isodesmica), rappresentano lo stesso parametro, e che  $K$  rappresenta una costante adimensionale<sup>V</sup> che misura il grado di cooperatività ed è equivalente, da un punto di vista concettuale, a  $\sigma = K_n/K_c$  del modello di Zhao e Moore.<sup>58</sup> Inoltre  $h_e$  è l'entalpia molecolare dovuta alle interazioni non-covalenti rilasciata durante l'elongazione,  $T_e$  è la temperatura di elongazione e  $\Phi_{sat}$  (grado di aggregazione a saturazione) è un parametro introdotto per assicurare che il grado di aggregazione non superi l'unità.  $R$  è la costante universale dei gas (pari a  $8.3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ).

Secondo il presente modello, ottimizzati questi parametri, grazie alle equazioni sotto indicate si possono calcolare: il  $DP_n(T_e)$  alla temperatura di elongazione  $T_e$ , che rappresenta il grado di polimerizzazione medio numerico mediato su tutte le specie attive e riferisce una stima del numero di molecole componenti il nucleo, e l'andamento del  $DP_n$  in funzione di tutte le temperature.

$$DP_n(T_e) = \frac{1}{\sqrt[3]{K}} \quad (3) \quad DP_n(T) = \frac{1}{\sqrt{K}} \frac{\phi_n}{\phi_{sat} - \phi_n} \quad (4)$$

Bisogna prestare attenzione che le espressioni (1) e (2) valgono esclusivamente per i regimi cui si riferiscono, pertanto  $\Phi_n$  dovrà essere modellato in specifici intervalli di temperatura. In prima approssimazione si scelgono tutte le variazioni di assorbanza al di sotto della  $T_e$  stimata sperimentalmente. Si ricordi che l'equazione (2), per correlare con i dati sperimentali, dev'essere messa a sistema con l'equazione del dato osservabile (in questo caso il coefficiente di estinzione molare  $\varepsilon$ ).

$$\varepsilon_{obs} = \alpha \varepsilon_m + \xi \varepsilon_p$$

A questo punto i parametri ottimizzabili per l'elongazione diventano cinque:  $h_e$ ,  $T_e$ ,  $\Phi_{sat}$ ,  $\varepsilon_m$  e  $\varepsilon_p$ . In prima approssimazione si assume che  $\varepsilon_m$  e  $\varepsilon_p$  siano quelle rilevate sperimentalmente. Si procede quindi al *fitting* con (2) in elongazione calcolando i primi tre parametri, mantenuti fissi nel *fitting* successivo del regime di nucleazione. In questo secondo

<sup>V</sup> Coincidente con la "costante di attivazione"  $K_a$  descritta nel Par. 2.1.2 b, costante di equilibrio tra stato non-attivato e stato attivato.

calcolo, che sfrutta la (1), oltre a  $K$  anche  $\epsilon_m$  e  $\epsilon_p$  sono parametri da ottimizzare. Dopo aver effettuato una prima minimizzazione per le quattro concentrazioni in esame, si controlla che i parametri ottenuti (dipendenti da una prima scelta arbitraria per  $\epsilon_m$  e  $\epsilon_p$  in fase di elongazione) producano risultati coerenti dal punto di vista teorico, in particolare che la temperatura di elongazione diminuisca diluendo il campione. Infatti dei quattro parametri calcolati  $K$ ,  $\Phi_{sat}$ ,  $h_e$  e  $T_e$ , solo quest'ultimo è funzione della concentrazione. L'operazione di *fitting* dev'essere quindi iterata fino a che tale parametro vari linearmente con il variare della concentrazione. Di seguito (fig. 2.47 e fig. 2.48) si riporta come esempio la modellazione non lineare, effettuata tramite software Scientist<sup>®</sup> ed elaborata graficamente con Microsoft Excel<sup>®</sup>, per la serie di dati relativa al campione più diluito ( $7.01 \times 10^{-6}$  M).

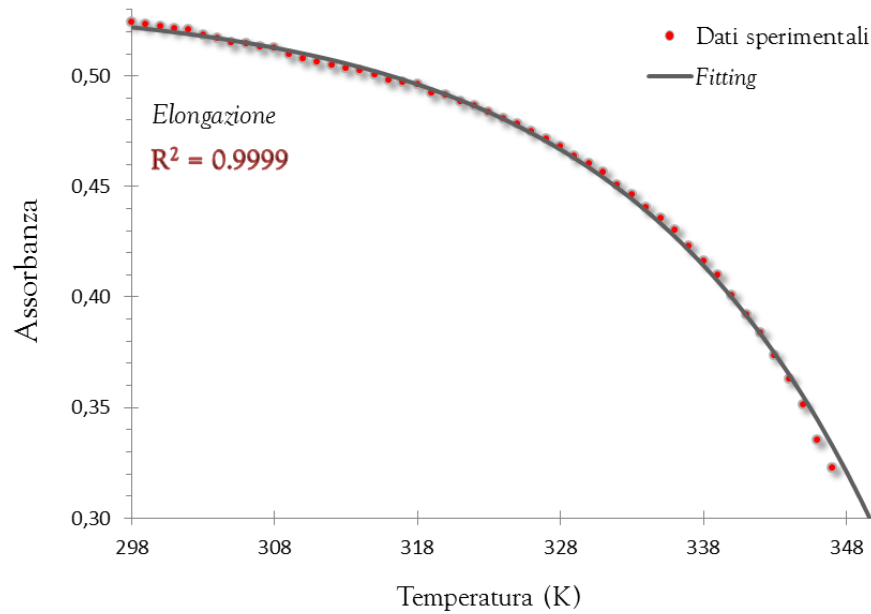


Figura 2.47: Esempio di modellazione per il processo di elongazione (longchains-DPP).

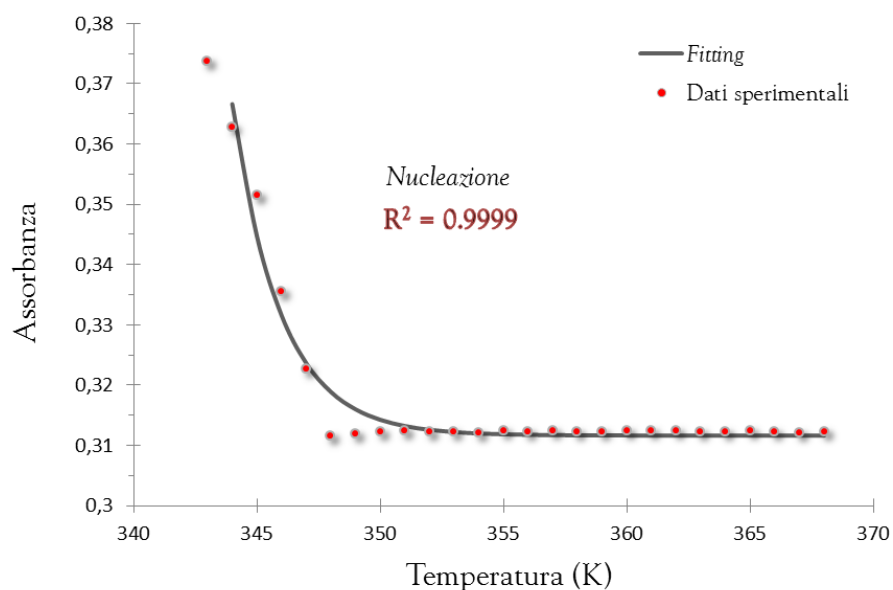


Figura 2.48: Esempio di modellazione per il processo di nucleazione (longchains-DPP).



Grazie ai parametri sopra calcolati è possibile ricavare il  $\Phi_n$  a tutte le concentrazioni e temperature, e di conseguenza il  $DP_n$  (vedi Appendice D – Dati di polimerizzazione cooperativa). Attraverso quest'elaborazione si possono così ottenere i grafici dell'andamento di  $\Phi_n$  in funzione della temperatura, per le quattro concentrazioni impiegate (fig. 2.49):

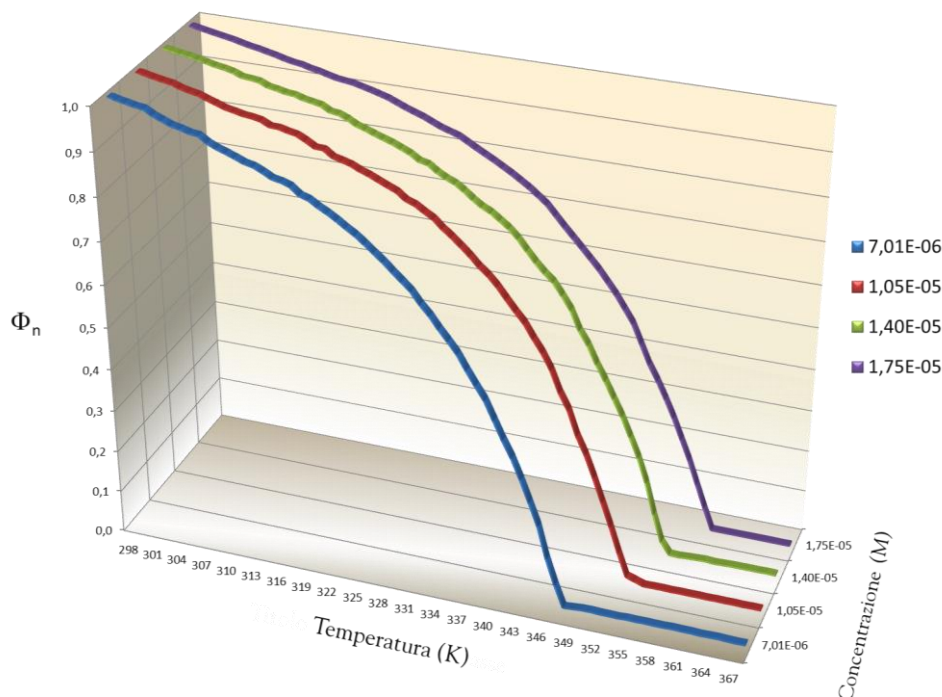


Figura 2.49: Andamento di  $\Phi_n$  al variare della temperatura (longchains-DPP).

Dal grafico sotto riportato (fig. 2.50), in cui viene rappresentato il  $DP_n$  contro la temperatura, si può notare come a temperatura ambiente l'aggregazione consista di circa 1000 molecole (nel range di concentrazioni  $7.01 \times 10^{-6} - 1.40 \times 10^{-5}$  M). A concentrazioni superiori ( $1.75 \times 10^{-5}$  M) il sistema diventa altamente cooperativo, portando ad un rapido incremento del valore del  $DP$ .

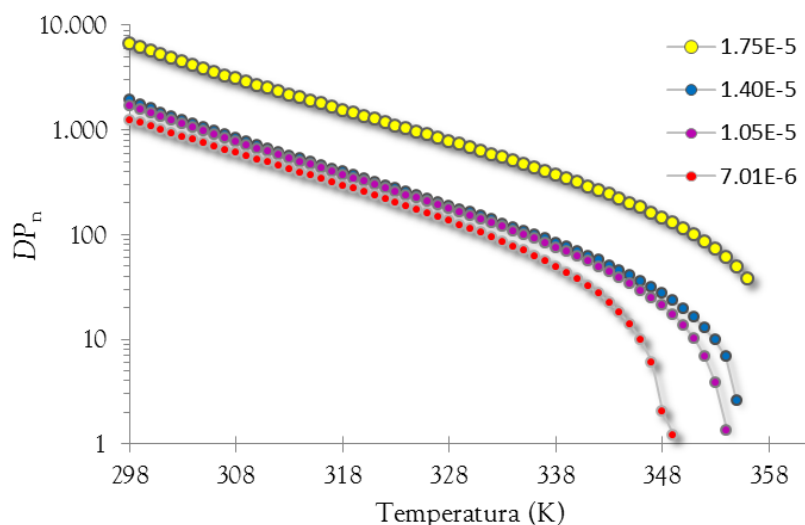


Figura 2.50: Andamento del  $DP_n$  al variare della temperatura (longchains-DPP).

In tabella 2.3 si presentano infine i parametri termodinamici ottimizzati per le quattro concentrazioni indagate, che sono in linea con quanto riportato in letteratura per molecole strutturalmente simili.<sup>15</sup>

Concentrazione [M]	Elongazione			Nucleazione			
	$h_e$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$T_e$ [K]	$\Phi_{\text{sat}}$	$\epsilon_{\text{mon}}$	$\epsilon_{\text{pol}}$	K	$DP_n(T_e)$
1.75 E-05	-59.25 ± 0.67	360.00 ± 0.07	1.022 ± 0.003	0.769 ± 0.019	0.991 ± 0.03	4.4 ± 2x10 <sup>-5</sup>	28
1.40 E-05	-62.30 ± 1.4	356.86 ± 0.13	1.020 ± 0.007	0.580 ± 0.003	0.74 ± 0.02	6.2 ± 2.0x10 <sup>-4</sup>	12
1.05 E-05	-61.19 ± 1.78	354.18 ± 0.16	1.026 ± 0.010	0.434 ± 0.001	0.54 ± 0.01	4.8 ± 1.2x10 <sup>-4</sup>	13
7.01 E-06	-58.29 ± 1.44	348.72 ± 0.12	1.044 ± 0.008	0.311 ± 0.001	0.38 ± 0.01	3.1 ± 0.7x10 <sup>-4</sup>	15
<b>Valore medio</b>	-60.26	/	1.028	/	/	3.6x10 <sup>-4</sup>	17

Tabella 2.3: Parametri termodinamici calcolati per il longchains-DPP.

Dalla tabella 2.3 si nota come  $T_e$  sia proporzionale alla concentrazione, in accordo con la teoria: in particolare la temperatura di elongazione diminuisce diluendo il campione, rivelando una relazione lineare nel “grafico di van’t Hoff” (fig. 2.51).<sup>57</sup> Qui si riporta in ascissa il reciproco della temperatura di elongazione, mentre in ordinata il logaritmo naturale della concentrazione, resa adimensionale dividendola per 10<sup>-6</sup>.<sup>15,57</sup>

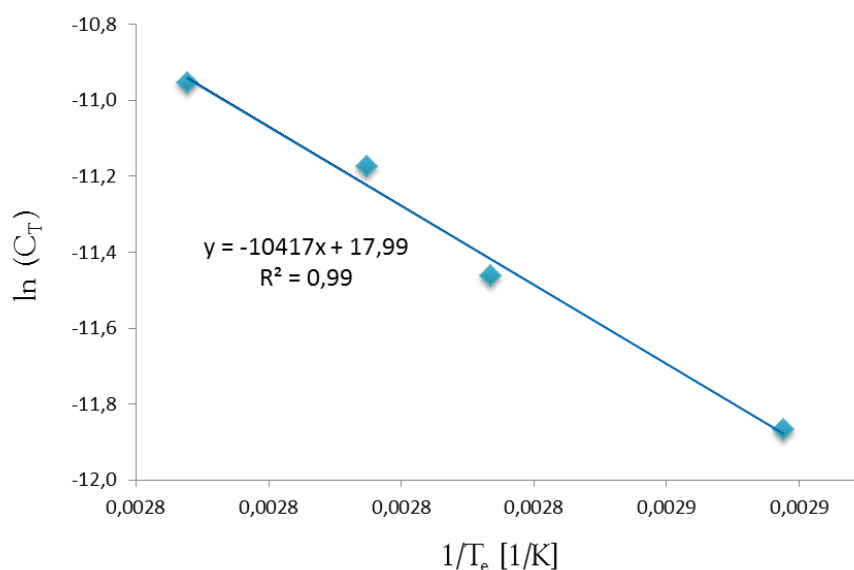


Figura 2.51: Grafico di van’t Hoff (longchains-DPP).

L’interpolazione di van’t Hoff dimostra che non vi sono deviazioni consistenti dalla linearità, confermando la validità del *fitting* effettuato. Il valore dell’entalpia rilasciata durante l’elongazione  $h_e$  si ottiene come prodotto tra il coefficiente angolare della retta e la costante dei gas  $R$ .<sup>39</sup> In questo caso si ottiene un valore pari a  $-86.61$  kJ/mol, in accordo (nei limiti dell’errore sperimentale) con quello ricavato dalla modellazione diretta dei dati di assorbimento.

#### 2.4.5. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

L'analisi di calorimetria differenziale a scansione (DSC) serve per avere una prima indicazione sull'eventuale natura mesomorfica del *longchains-DPP*. L'indagine viene effettuata utilizzando un campione con massa pari 4.6 mg, partendo da una temperatura di 30 °C fino ad arrivare a 280 °C. La rampa di riscaldamento prevede 2' di stazionamento iniziale a 30 °C ed una velocità costante di riscaldamento pari a 20 °C/min fino a 280 °C, con stazionamento finale di 1'. Il raffreddamento fino a 30 °C viene quindi effettuato con una velocità pari a – 20 °C/min. Sia nella rampa di riscaldamento che in quella di raffreddamento si hanno due transizioni reversibili, la prima più allargata compresa tra i 234.9 °C ed i 239.5 °C, la seconda più ristretta a 274 °C. Entrambe si manifestano infatti anche nel processo inverso di raffreddamento con una certa isteresi, pari a 15.1 °C per la prima transizione e 6.8 °C per la seconda. Per confermare la reversibilità del processo il campione viene analizzato mediante spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR al termine della calorimetria, e risulta inalterato rispetto alla condizione iniziale. Un punto di fusione così alto e i forti valori endotermici rilevati confermano l'alta cooperatività di polimerizzazione, com'è già stato riscontrato negli esperimenti di assorbimento UV-Vis a temperatura variabile. Inoltre, poiché la seconda transizione (274 °C) riguarda un processo di fusione/cristallizzazione, è logico pensare che la prima (~237 °C) si riferisca ad uno stadio mesomorfo, come conferma la bassa entalpia di transizione registrata (3.99 kJ/mol). Sul grafico vengono indicati anche i valori entalpici di transizione ( $\Delta H$ ), calcolati automaticamente a partire da A (area sotto la curva).

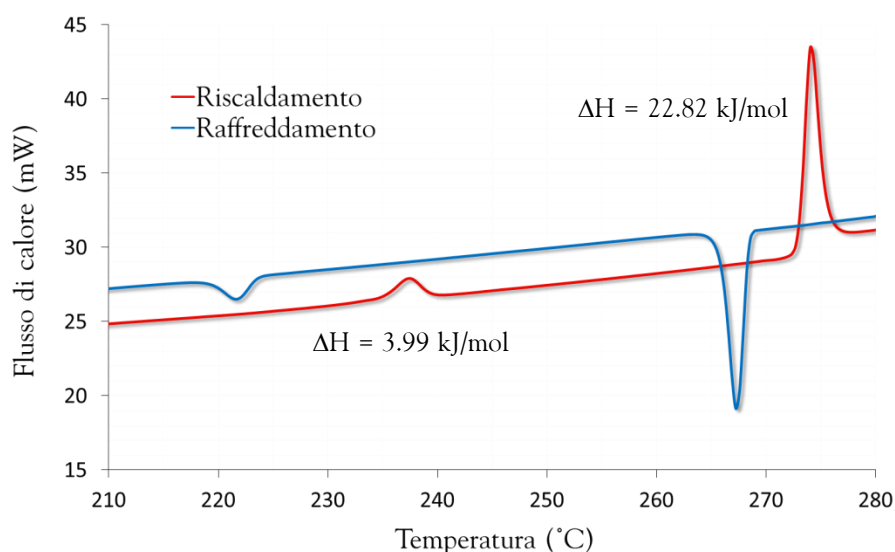


Figura 2.52: DSC del *longchains-DPP*.

Di seguito vengono riportati i dati raccolti per i due picchi in fase di riscaldamento:

Valore	1° Picco	2° Picco
Onset (°C)	234.874	272.993
Peak (°C)	237.400	274.066
End (°C)	239.478	275.661
$\Delta H$ (kJ/mol)	3.99	22.82

## 2.4.6. Analisi di microscopia allo stato solido

### a) Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le indagini di microscopia elettronica a scansione vengono effettuate preparando inizialmente una soluzione concentrata di *longchains*-DPP in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : il campione viene depositato su silicio tramite *dip-coating* e dorato. Le immagini raccolte (disposte in ordine crescente d'ingrandimento) confermano la formazione di strutture organizzate in lunghe fibre microscopiche, che generano un *network* supramolecolare microporoso.<sup>59</sup>

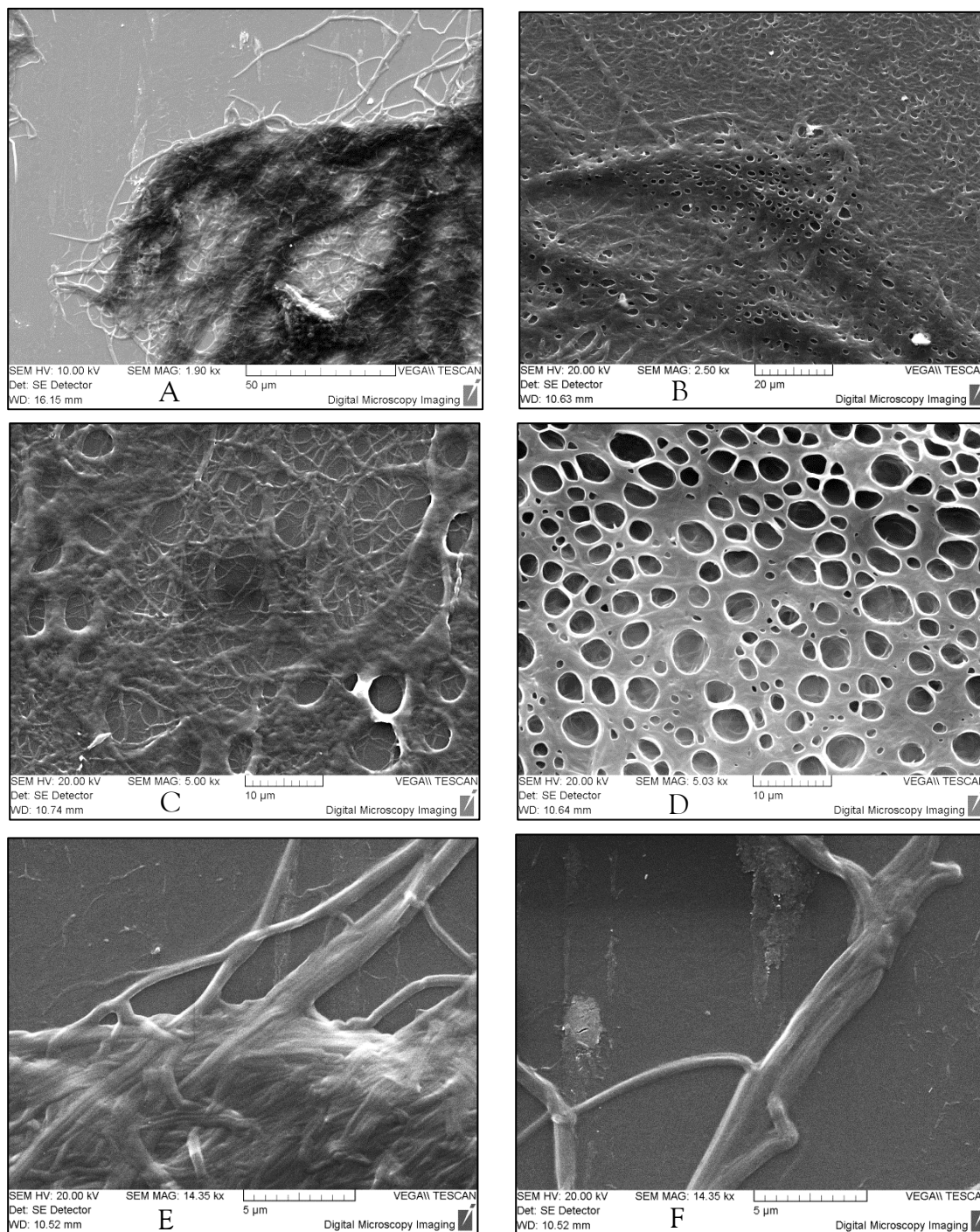


Figura 2.53: Immagini SEM del *longchains*-DPP (campioni depositati da  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Le figure B, C e D si riferiscono a zone in cui il campione è più concentrato, per cui si ha la sovrapposizione di più fibre supramolecolari, con conseguente formazione di strutture disordinate complesse. Le aree più scure presenti in figura B, in particolare, sono indicative della presenza di macrofibre costituite da aggregati supramolecolari più consistenti, mentre le moltissime microcavità che caratterizzano il polimero in figura D sono causate dall'elevata velocità di evaporazione del solvente utilizzato ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).<sup>60</sup> Le figure A, E ed F, al contrario, si riferiscono a zone periferiche del campione, per cui si ha un diradamento del *network* supramolecolare, che consente di apprezzare anche la singola fibra. Le figure E ed F sono ingrandimenti maggiori ( $14350\times$ ) dell'area superiore visibile in figura A.

Di seguito si riportano invece due immagini relative ad un campione di *longchains-DPP* depositato da una soluzione concentrata di MCH. In questo caso l'elevata apolarità del solvente causa un'aggregazione ancor più consistente del composto a temperatura ambiente, portando alla formazione di fibre supramolecolari più spesse e con meno diramazioni.

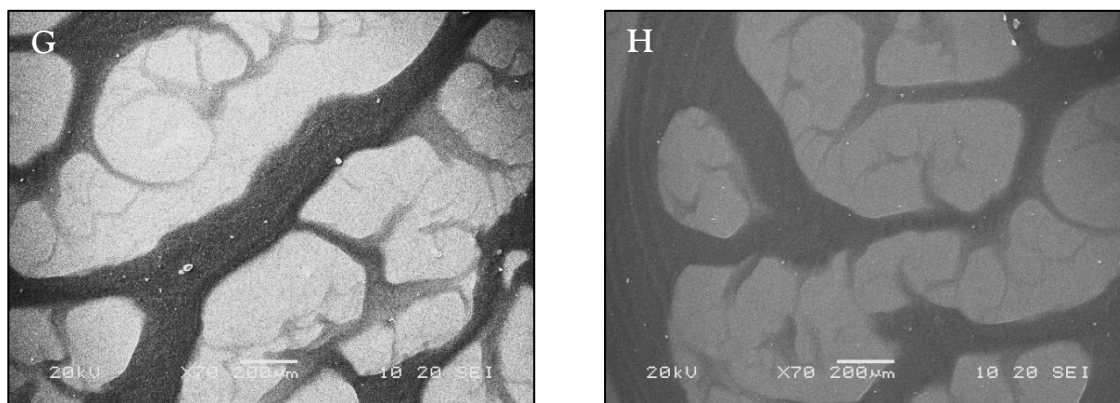


Figura 2.54: Immagini SEM del *longchains-DPP* (campioni depositati da MCH).

#### b) Microscopia a epifluorescenza (EFM)

Le dimensioni delle fibre supramolecolari prodotte dal *longchains-DPP* sono tali da poter essere apprezzate anche al microscopio ottico in luce visibile (fig. 2.55 A) e in epifluorescenza (fig. 2.55 B). Di seguito si riportano due immagini relative agli aggregati di *longchains-DPP* generatisi da un campione concentrato in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

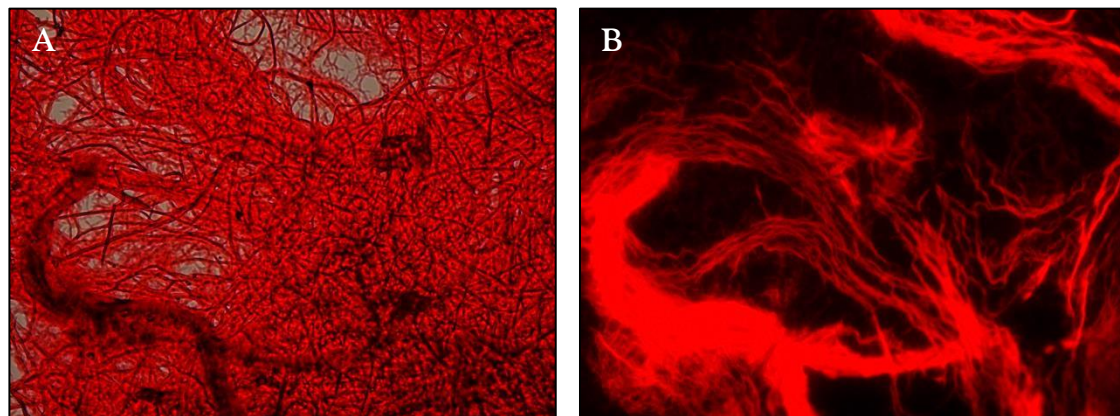


Figura 2.55: Immagini EFM che illustrano la struttura fibrosa del *longchains-DPP*.

L'analisi EFM dimostra come il longchains-DPP rimanga un fluoroforo anche allo stato solido, caratteristica singolare per molecole appartenenti alla famiglia del DPP,<sup>61</sup> che rende tale prodotto interessante per lo sviluppo di nuovi materiali utili nel settore delle energie rinnovabili.

c) **Microscopia ottica polarizzata (POM)**

L'osservazione del longchains-DPP tramite microscopio ottico a luce polarizzata (POM) ha permesso di confermare quanto già ipotizzato a seguito della calorimetria differenziale a scansione (DSC). Il polimero infatti, per temperature superiori alla prima transizione ( $\sim 237$  °C,) presenta delle *texture* dendritiche tipiche dei cristalli liquidi a fase colonnare discoidale. L'architettura molecolare dell'unità monomerica infatti, con i gruppi tridodecilossifenilici disposti in maniera simmetrica, è consistente con la formazione di fasi colonnari. Sotto i 220 °C le *texture* non sono più quelle dendritiche tipiche dei cristalli liquidi colonnari, ma ciò non esclude che la fase sia ancora colonnare.

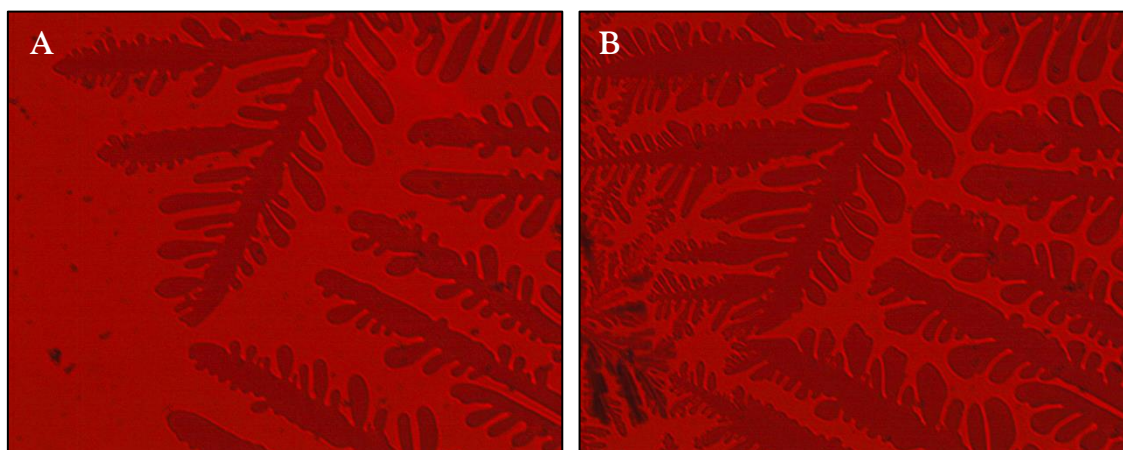
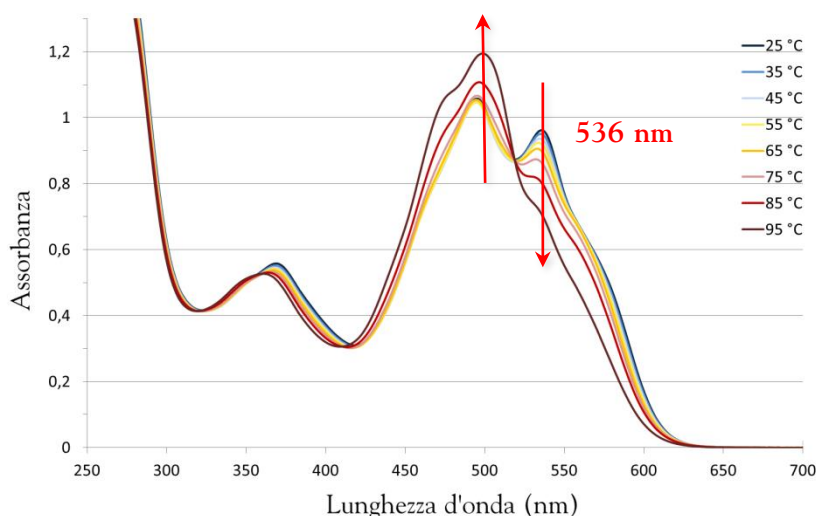


Figura 2.56: Immagini POM della texture del mesogeno longchains-DPP.

## 2.5. Caratterizzazione preliminare del mono-*longchains*-DPP

### 2.5.1. Esperimenti di spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile

Anche il mono-*longchains*-DPP presenta le stesse proprietà termo-cromiche osservate per il derivato simmetrico *longchains*-DPP. Di seguito si riportano gli spettri di assorbimento UV-Vis registrati per una soluzione di mono-*longchains*-DPP in MCH ( $6.0 \times 10^{-5}$  M), nell'intervallo di temperature da 95 °C a 25 °C. La termo-reversibilità del processo viene confermata ripetendo più misure a temperatura variabile con lo stesso campione: poiché le transizioni restano le stesse senza alcuna isteresi, si ha conferma che si tratta di un *self-assembly* mediato da interazioni non covalenti.



**Figura 2.57:** Spettri di assorbimento UV-Vis a temperatura variabile (mono-*longchains*-DPP).

Anche in questo caso le misure di assorbimento rivelano due differenti situazioni dei cromofori in soluzione di MCH: specie monomeriche (o dimeriche, legate a idrogeno) ad alte temperature, e aggregati a basse temperature. Dagli spettri sono evidenti tre punti isobestici, indicativi di una transizione tra specie chimiche all'equilibrio, in cui l'assorbanza è indipendente dal rapporto molare delle specie, che presentano dunque lo stesso valore di  $\epsilon$ . Il massimo di assorbimento per temperature maggiori di 80 °C a 497 nm (corrispondente a quello dello spettro registrato in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per il calcolo del coefficiente di estinzione molare) subisce un lieve *shift* ipsocromo al diminuire della temperatura (492 nm), indicando la probabile formazione di aggregati di tipo H.<sup>56</sup>

In figura 2.58 si riporta l'andamento della variazione di assorbanza a lunghezza d'onda fissa ( $\lambda$ : 536 nm, dove si registra il maggiore decremento di assorbanza) a temperatura variabile, per quattro soluzioni a concentrazione differente (da  $3.0 \times 10^{-5}$  M a  $6.0 \times 10^{-5}$  M). Il profilo dei dati non-sigmoidale dimostra anche in questo come l'aggregazione sia di tipo cooperativo (nucleazione-elongazione).

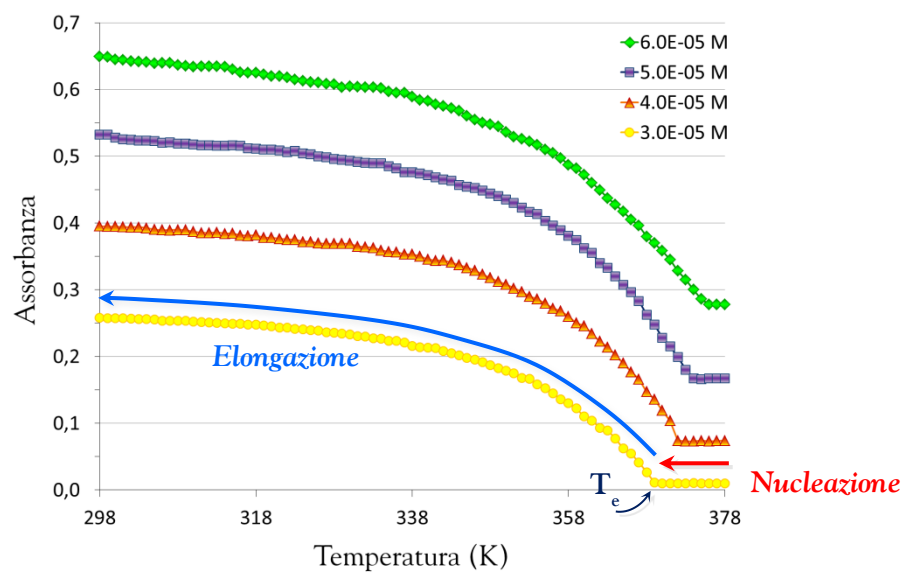


Figura 2.58: Variazione di assorbanza a temperatura variabile (mono-longchains-DPP).



### 2.5.2. Analisi di microscopia allo stato solido (SEM)

L'organizzazione supramolecolare del mono-*longchains*-DPP è stata preliminarmente studiata allo stato solido mediante analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM). La preparazione dei campioni consiste nella realizzazione di soluzioni sature di mono-*longchains*-DPP in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , che vengono depositate su silicio e, terminata l'evaporazione del solvente, dorate.

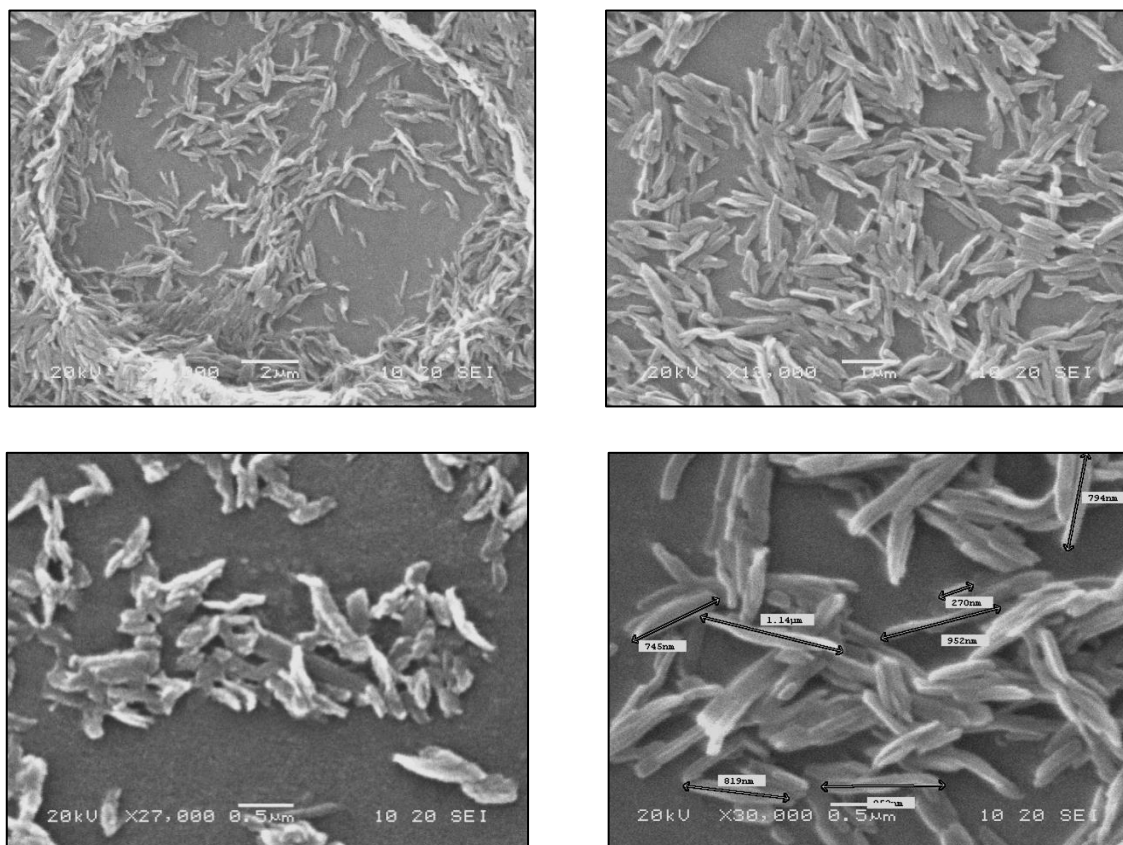


Figura 2.59: Immagini SEM del mono-*longchains*-DPP.

Le immagini evidenziano come il composto polimerizzi formando una sorta di bastoncini, quasi cilindrici, di dimensioni comprese tra qualche centinaio di nanometri ed il micron. Si ha dunque un'aggregazione molecolare molto differente rispetto al *longchains*-DPP, derivato simmetrico, che costituisce al contrario delle vere e proprie fibre supramolecolari. In questo caso appare ancora più evidente come le strutture a bastoncino si dispongano preferenzialmente all'interfaccia soluzione/aria a seguito della rapida evaporazione del solvente.<sup>62</sup>

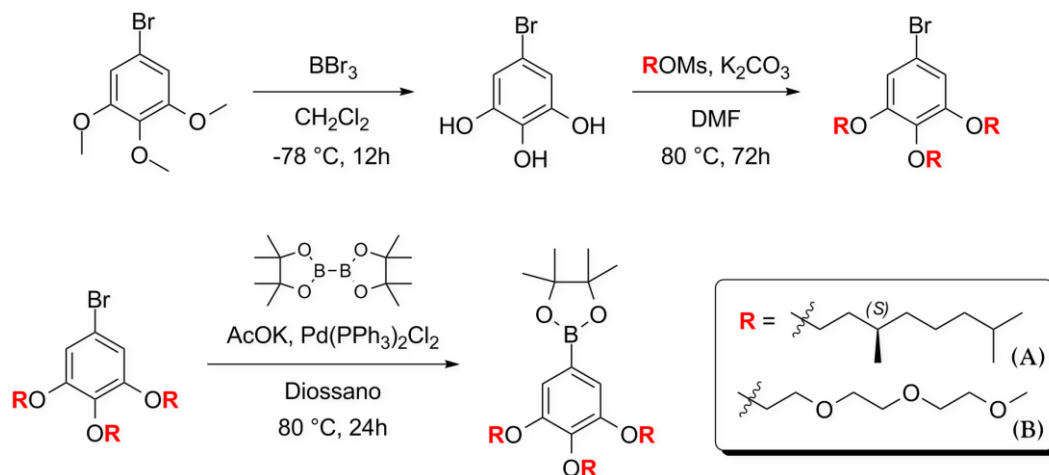
## 2.6. Conclusioni e prospettive

L'idea di creare un nuovo polimero supramolecolare partendo dalla struttura molecolare del **DPP** è stata portata a termine con ottimi risultati. L'introduzione dell'unità mesogena (tridodecilossifenile) ha consentito di portare in soluzione il **DPP** nei comuni solventi organici, e conseguentemente di poterne valutare la capacità di polimerizzazione supramolecolare quantificando l'entità delle interazioni non-covalenti.

Esperimenti di diluizione  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{CDCl}_3$  hanno permesso, utilizzando l'approccio di Zhao e Moore,<sup>29i</sup> di capire come il *longchains*-DPP aggrega secondo un meccanismo isodesmico, e di stimarne la costante di associazione pari a  $K=1.08\times 10^2\pm 15\text{ M}^{-1}$ , con un valore di  $DP$  medio piuttosto basso (pari a 6 per soluzioni a concentrazione maggiore di  $1\times 10^{-2}\text{ M}$ ), dato confermato anche tramite DOSY. Per indurre il fenomeno di aggregazione ad avvenire attraverso un meccanismo cooperativo (del tipo nucleazione-elongazione), si è allora solubilizzato il *longchains*-DPP in MCH. L'apolarità di questo solvente ha permesso l'organizzazione gerarchica del composto tramite le tipiche interazioni non-covalenti del **DPP** (legami a idrogeno e *stacking*  $\pi$ - $\pi$ ), studiata preliminarmente mediante esperimenti  $^1\text{H}$  NMR a temperatura variabile. Analisi di spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile hanno poi permesso di confermare la natura cooperativa della polimerizzazione, nonché di stimare correttamente tutti i parametri termodinamici del processo. Il valore medio di entalpia molecolare dovuta alle interazioni non-covalenti rilasciata durante l'elongazione è risultato pari a  $-60.26\text{ kJ/mol}$ , mentre il valore della costante  $K$  è risultato pari a  $3.6\times 10^{-4}$ , con un  $DP_n(T_c)$  medio pari a 17 (valore indicativo della dimensione del nucleo  $s$ ). A temperatura ambiente, per concentrazioni inferiori a  $1.4\times 10^{-5}\text{ M}$ , il  $DP_n$  assume un valore di ben 1000 molecole, mentre per concentrazioni superiori si ha un incremento pressoché esponenziale. L'interpolazione di van't Hoff ha confermato la validità del *fitting* effettuato tramite modellazione diretta dei dati di assorbimento UV-Vis, portando ad un valore di  $h_c$  pari a  $-86.61\text{ kJ/mol}$ . Analisi calorimetriche (DSC) e al microscopio ottico a luce polarizzata (POM) hanno quindi permesso di valutare la natura mesomorfica del *longchains*-DPP che ha dimostrato, per temperature superiori alla prima transizione ( $237\text{ }^\circ\text{C}$ ), *texture* dendritiche tipiche dei cristalli liquidi a fase colonnare discoidale. Infine, analisi allo stato solido tramite SEM e EFM hanno confermato dal punto di vista microscopico come l'aggregazione porti alla formazione di lunghe fibre supramolecolari fluorescenti, apprezzabili anche al microscopio ottico in luce visibile.

Infine si è intrapreso lo studio preliminare del mono-*longchains*-DPP, derivato asimmetrico con un solo gruppo solubilizzante. Questo, come il predecessore, dimostra in MCH un meccanismo di polimerizzazione supramolecolare di tipo cooperativo (studiato mediante esperimenti di spettroscopia UV-Vis a temperatura variabile) e immagini SEM consentono di valutare come l'interazione porti ad aggregati di natura molto differente rispetto al *longchains*-DPP, visibili come bastoncini cilindrici di dimensione compresa tra le centinaia di nanometri ed il micron. Questo secondo polimero supramolecolare è attualmente in corso di caratterizzazione presso i laboratori di ricerca dell'Università Ca' Foscari Venezia.

Di seguito si riporta una metodologia di sintesi alternativa, in corso di sviluppo presso i nostri laboratori, che permette di sintetizzare altri gruppi solubilizzanti (con un numero ridotto di passaggi), inseribili poi nella struttura molecolare del **DPP** tramite la consolidata reazione di Suzuki-Miyaura *cross-coupling* (vedi schema 2.17).



Schema 2.17: Nuovi gruppi solubilizzanti da introdurre nell'architettura molecolare del **DPP**.

Si possono ottenere in tal modo dei **DPP** chirali (vedi schema 2.17 A) o idro-solubili (vedi schema 2.17 B), la cui capacità di aggregazione supramolecolare può essere indagata secondo le metodologie descritte nel presente lavoro di tesi per il *longchains*-DPP. Inoltre, nel caso della catena chirale, sarebbe interessante studiare la capacità di amplificazione della chiralità del monomero al polimero attraverso esperimenti di dicroismo circolare, nonché la possibile formazione di una mesofase liquido cristallina chirale.

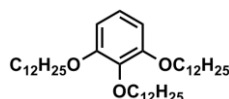
Tutti questi monomeri dovrebbero essere in grado di creare soluzioni intime con i pigmenti appartenenti alla famiglia del **DPP**, aprendo la possibilità di un loro impiego come leganti in formulazioni pittoriche contemporanee.

## 2.7. Parte sperimentale

### 2.7.1. Strumentazione, reagenti e solventi

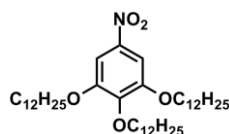
Le reazioni vengono seguite attraverso TLC POLYGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub> di 0.25 mm di spessore. Le cromatografie flash sono effettuate utilizzando gel di silice MERK 60, 0.04-0.063 mm/230-400 mesh, secondo le metodologie e le strumentazioni descritte da Still.<sup>63</sup> Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR vengono registrati con uno spettrometro VARIAN UNITY 400 MHz, utilizzando tetrametilsilano come riferimento interno. Gli spettri NMR COSY sono ottenuti con la usuale sequenza di impulsi. Le trasformazioni lungo t1 e t2 sono pesate con le opportune *non-shifted sine functions* e fasate con la tecnica *absolute value*. Gli spettri NMR NOESY vengono ottenuti con la normale sequenza di impulsi e con un *mixing time* di 1.8 secondi. La massima sensibilità si ottiene non applicando alcuna funzione lungo t2 e con una *non shifted gaussian function* lungo t1. Gli spettri eterocorrelati sono ottenuti con la tecnica *reverse detection*. Lo spettro eterocorrelato HMQC permette di rilevare le correlazioni dirette <sup>1</sup>J<sub>CH</sub>, mentre lo spettro *multiple bond* HMBC fornisce le correlazioni a più lungo raggio <sup>n</sup>J<sub>CH</sub> (con in genere n = 2, 3). In un tipico esperimento sono state effettuate 256 misure lungo t1 con il metodo di acquisizione *phase sensitive*, con 16 (HMQC) o 32 (HMBC) scansioni per ogni valore di t1. Il ritardo per il filtro BIRD è tarato su un valore medio <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 140 Hz, mentre il ritardo per il rilevamento delle correlazioni *multiple bond* è basato su <sup>n</sup>J<sub>CH</sub> = 5 Hz. La trasformazione lungo t2 è effettuata su FID pesati da una funzione gaussiana, la trasformazione lungo t1 è preceduta dall'applicazione di una funzione gaussiana e da *zero filling*. Gli spettri HMBC sono in genere deturpati da elevato rumore lungo t1. Il rumore è rimosso mediante l'applicazione a ogni traccia (punti lungo la direzione orizzontale nello spettro) di una maschera formata dai valori massimi e minimi delle tracce raccolte in un intervallo privo di segnali. I valori positivi (negativi) di ogni traccia sono sottratti ai valori positivi (negativi) della maschera, o azzerati se nell'operazione il segno del valore cambia. Gli spettri di massa vengono acquisiti con un FINNIGAN – TRACE MS 2000 SERIES CC (EI, 70 eV), utilizzando colonne capillari RTX®-5MS (5% difenile / 95% dimetile polisilossano) di 15 m di lunghezza e 0.25 mm di diametro. Laddove sia specificato “ESI”, gli spettri di massa vengono acquisiti con un sistema HPLC AGILENT 1100 SERIES con rilevatore DAD, abbinato ad uno spettrometro di massa AGILENT LC/MSD Trap SL, con ionizzazione API (Electrospray) e modalità *Flow Injection Analysis*. Gli spettri UV allo stato solido sono registrati con un PERKIN ELMER LAMBDA 35 UV/VIS SPECTROMETER, mentre quelli allo stato liquido (in soluzioni di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> o DMSO) con un PERKIN ELMER LAMBDA 40 UV/VIS SPECTROMETER con un Perkin Elmer PTP 6 Peltier *temperature programmer* impostato a 25 °C. Gli spettri in fluorescenza vengono registrati con un PERKIN ELMER LS55 FLUORESCENCE SPECTROMETER. Gli spettri IR sono acquisiti con un PERKIN ELMER SPECTRUM ONE FT-IR SPECTROMETER. Tutti i reagenti e i solventi commerciali vengono impiegati senza ulteriori purificazioni, salvo diversamente specificato. I solventi definiti “anidri” vengono purificati secondo procedure riportate in letteratura<sup>64</sup> (eventualmente conservati qualche giorno su setacci molecolari); in particolare THF viene anidrificato per distillazione da sodio e benzofenone, mentre DMF e NMP da calcio idruro.

## 2.7.2. Prodotti e caratterizzazione



1,2,3-tri(dodecilossi)benzene

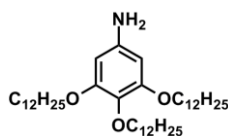
Il composto viene preparato secondo una procedura di letteratura, apportando qualche modifica.<sup>43</sup> In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, flusso d'argon e refrigerante, s'introduce  $K_2CO_3$  (31.13 g, 225.20 mmol) e 1,2,3-triidrossibenzene (4.13 g, 32.71 mmol). Dopo aver introdotto DMF anidra (200 mL) e 1-bromodecano (27.1 mL, 112.87 mmol) si degasa la miscela mediante flusso d'argon per 30'. Si innalza la temperatura a 90 °C e si lascia procedere la reazione sotto agitazione per 48h. Si lascia raffreddare, si filtra su Gooch con allumina neutra lavando accuratamente con  $Et_2O$  e si distilla il solvente in alto vuoto a 60 °C. Si riprende con  $CH_2Cl_2$  e si estrae lavando la fase organica per tre volte con  $H_2O$ . Si anidrifca su  $MgSO_4$ , quindi si rimuove il solvente a bassa pressione. Il grezzo viene ridisciolto nella minima quantità di  $CH_2Cl_2$ , quindi precipitato da  $CH_3OH$  freddo. Si filtra su imbuto Büchner lavando il precipitato con  $CH_3OH$  freddo. Dopo aver pestato finemente il prodotto su un mortaio, si rimuove il solvente in alto vuoto per 24h. Si ottiene un solido bianco bassofondente (20.2 g, resa: 91%). EA (calc.): C, 79.94; H, 12.46; O, 7.61 / (exp.): C, 80.03; H, 12.39.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 6.90 (1H, t,  $J = 8.3$  Hz), 6.54 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 3.96 (4H, t,  $J = 6.6$  Hz), 3.94 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 1.84-1.70 (6H, m), 1.51-1.41 (6H, m), 1.28 (48H, m), 0.88 (9H, t,  $J = 6.8$  Hz). PM ( $C_{42}H_{78}O_3$ ): 631.07 u.



1,2,3-tri(dodecilossi)-5-nitrobenzene

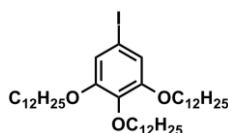
Il composto viene preparato secondo procedure di letteratura, apportando qualche modifica.<sup>43,44</sup> In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e refrigerante s'introduce 1,2,3-tri(dodecilossi)benzene (30.3 g, 48.01 mmol),  $NaNO_2$  (0.665 g, 9.84 mmol) in una miscela  $CH_2Cl_2:H_2O$  100:5 (61 mL/ 3.05 mL) e si scalda leggermente per favorire lo scioglimento del reagente iniziale. Si lascia procedere sotto agitazione per 15', quindi si aggiunge  $HNO_3$  concentrato goccia a goccia (13.94 mL). Dopo 24h si aggiunge  $H_2O$  (50 mL), quindi si estrae con  $CH_2Cl_2$  lavando più volte la fase organica con  $H_2O$ . Dopo aver seccato la fase organica su  $MgSO_4$ , si rimuove il solvente a bassa pressione, si riprende con la minima quantità di  $CH_2Cl_2$  (8 mL) e si precipita con  $CH_3OH$  freddo (400 mL). Si filtra su imbuto Büchner lavando il precipitato con  $CH_3OH$  freddo, quindi si rimuove il solvente a bassa pressione. Si ottiene il prodotto desiderato sotto forma di cristalli gialli (16.2 g, resa: 50%). Mp: 58.3 °C. EA (calc.): C, 74.62; H, 11.48; N, 2.07; O, 11.83 / (exp.): C, 74.79; H, 11.32; N, 1.96.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.47 (2H, s), 4.06 (4H, t,  $J = 6.5$  Hz), 4.03 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz), 1.83 (4H, m), 1.74 (2H, m), 1.48 (6H, m), 1.40-1.20 (48H, m),

0.88 (9H, t,  $J = 6.8$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 170.5, 152.8, 144.0, 143.3, 102.3, 69.6, 32.1, 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.2, 26.2, 26.1, 22.9, 14.3. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3417 (vw, b), 2952 (s), 2918 (vs), 2840 (vs), 1742 (vw), 1641 (vw), 1613 (w), 1510 (vs), 1471 (s), 1437 (w), 1381 (w), 1345 (s), 1314 (w), 1213 (m), 1118 (s), 1093 (m), 962 (w), 847 (w), 732 (w), 718 (w). PM ( $\text{C}_{42}\text{H}_{77}\text{NO}_5$ ): 676.06 u.



**3,4,5-tri(dodecilossi)anilina**<sup>43,46a</sup>

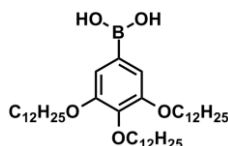
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica s'introduce 1,2,3-tridodecilossi-5-nitrobenzene (12.28 g, 18.16 mmol) e THF anidro (80 mL) quindi si lascia procedere la miscela sotto agitazione per 15'. Dopo aver introdotto Pd/C 5% in quantità catalitica (1.28 g, Pd: 0.6 mmol) si lascia procedere la miscela sotto agitazione per una notte in atmosfera idrogenata. Si effettua il work-up filtrando il contenuto su Gooch con celite, quindi rimuovendo il solvente a bassa pressione. Si precipita da EtOH a caldo, quindi si filtra lavando il precipitato con 300 mL di EtOH a temperatura ambiente. Il prodotto si presenta sotto forma di solido biancastro (7.52 g, resa: 64%). Mp: 75.0 °C. EA (calc.): C, 78.08; H, 12.32; N, 2.17; O, 7.43 / (exp.): C, 77.81; H, 12.55; N, 2.03.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 5.91 (2H, s), 3.91 (4H, t,  $J = 6.6$  Hz), 3.84 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 3.45 (2H, s *large*), 1.77 (4H, m), 1.71 (2H, m), 1.45 (6H, m), 1.34-1.21 (48H, m), 0.88 (9H, t,  $J = 6.8$  Hz). IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3411 (w), 3333 (w), 2924 (vs), 2845 (vs), 1602 (m), 1504 (m), 1468 (m), 1398 (w), 1384 (w), 1241 (m), 1116 (s), 1020 (vw), 811 (w), 716 (w), 618 (vw), 581 (vw). PM ( $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{NO}_3$ ): 646.08 u.



**1,2,3-tri(dodecilossi)-5-iodobenzene**

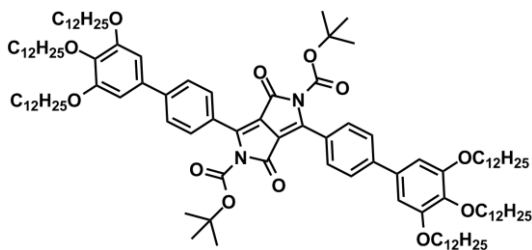
Il composto viene preparato secondo procedure di letteratura, apportando qualche modifica.<sup>43</sup> Una sospensione di 1,2,3-tri(dodecilossi)-5-amminobenzene (1.1 g, 1.70 mmol) in  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  15% (15 mL) viene raffreddata a 0 °C, quindi si aggiunge goccia a goccia  $\text{NaNO}_2$  (0.141 g, 2.86 mmol) disciolto in  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL) e si tappa la miscela di reazione. Dopo un'ora si versa la miscela in una soluzione fredda di KI (1.526 g, 9.19 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (3 mL) e si lascia procedere sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Il prodotto grezzo viene estratto con  $\text{Et}_2\text{O}$ , lavato più volte con una soluzione acquosa di  $\text{NaHSO}_3$ , e seccato su  $\text{MgSO}_4$ . Dopo filtrazione il solvente viene rimosso a bassa pressione (il grezzo di reazione si presenta come olio marrone scuro). Il prodotto viene purificato tramite FC (eluente iniziale: Cy-Hex, eluente finale: Cy-Hex/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  8:2, terza macchia dopo sviluppo) e si presenta sotto forma di solido cristallino bianco (0.540 g, resa: 42%). Mp: 46.7 °C. EA (calc.): C, 66.64; H,

10.25; I, 16.76; O, 6.34 / (exp.): C, 66.58; H, 10.34.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 6.84 (2H, s), 3.92 (4H, t,  $J = 6.5$  Hz), 3.90 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz), 1.78 (4H, m), 1.71 (2H, m), 1.45 (6H, m), 1.39-1.20 (48H, m), 0.88 (9H, t,  $J = 6.8$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 154.1, 138.5, 116.3, 85.8, 73.6, 69.5, 32.1, 30.4, 30.4, 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 26.2, 26.2, 22.9, 14.3. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3450 (w, b), 2918 (vs), 2845 (s), 1580 (w), 1493 (w), 1468 (m), 1418 (m), 1379 (w), 1303 (w), 1236 (w), 1222 (w), 1118 (s), 993 (vw), 813 (vw), 797 (w), 718 (vw), 646 (vw), 567 (vw). PM ( $\text{C}_{42}\text{H}_{77}\text{IO}_3$ ): 756.96 u.



**Acido 3,4,5-tri(dodecilossi)fenilboronico**<sup>43,48a-b,65</sup>

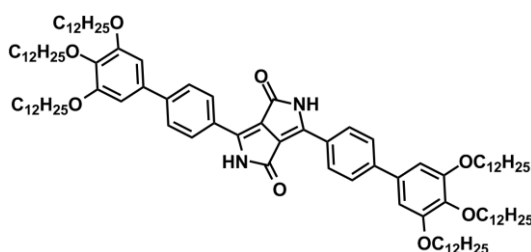
Una soluzione di 1,2,3-tridodecilossi-5-iodobenzene (1.67 g, 2.21 mmol) in THF anidro (120 mL) viene agitata sotto flusso d'argon a  $-90$  °C. Dopo 15' si aggiunge molto lentamente triisopropilborato (2.039 mL, 8.84 mmol) quindi si lascia procedere sotto agitazione per altri 15'. Si aggiunge goccia a goccia *t*-BuLi (5.890 mL, 8.84 mmol, soluzione 1.5 M in pentano), quindi si lascia procedere la reazione sotto agitazione per 48h, lasciandola rinvenire spontaneamente a temperatura ambiente. A seguito dell'idrolisi con HCl 1.0 M (20 mL) si estrae la fase acquosa con  $\text{Et}_2\text{O}$ , quindi si secca su  $\text{MgSO}_4$  e si filtra su Gooch. Il solvente viene rimosso a bassa pressione; si ottiene il prodotto sotto forma di cristalli di color giallo tenue (1.49 g, resa: 98%). EA (calc.): C, 74.75; H, 11.80; B, 1.60; O, 11.85/ (exp.): C, 74.98; H, 11.73.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.39 (2H, s), 4.09 (4H, t,  $J = 6.5$  Hz), 4.06 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz), 1.92-1.68 (6H, m), 1.60-1.43 (6H, m), 1.42-1.16 (48H, m), 0.88 (9H, t,  $J = 6.7$  Hz). PM ( $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{BO}_5$ ): 674.88 u.



**Di-terz-butil 1,4-diosso-3,6-bis(3',4',5'-tri(dodecilossi)bifenil-4-il)pirrolo  
[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon, s'introduce acido 1,2,3-tridodecilossifenilboronico (1.49 g, 2.21 mmol) seguito da toluene (120 mL) e  $\text{K}_2\text{CO}_3(\text{aq})$  2.0 M (22.1 mL di soluzione,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ : 6.103 g, 44.16 mmol), quindi si degasa la miscela gorgogliando argon e sonicando contemporaneamente per 15'. S'introduce Br-DPP-Boc (0.119 g, 0.74 mmol) e  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in quantità catalitica (0.1 eq), quindi si porta la miscela a riflusso ( $90$  °C), e si lascia procedere sotto agitazione per 24h. Si effettua il work-up rimuovendo il solvente a bassa pressione (evaporatore rotante,  $60$  °C),

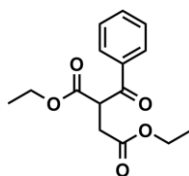
quindi estraendo la fase organica con Et<sub>2</sub>O e lavando due volte con H<sub>2</sub>O. Si discioglie con Et<sub>2</sub>O e si fa precipitare con CH<sub>3</sub>OH freddo, si isola tramite centrifugazione e si lava il precipitato ripetutamente, prima con CH<sub>3</sub>OH e poi con CH<sub>3</sub>CN. Si effettua una cromatografia flash (eluente iniziale: Cy-Hex/Et<sub>2</sub>O 9:1, eluente finale: Cy-Hex/Et<sub>2</sub>O 7:3). Il prodotto è la prima macchia visibile (di color arancione), e dopo rimozione del solvente si presenta come un solido rosso-arancione (0.96 g, resa: 75%). EA (calc.): C, 77.02; H, 10.39; N, 1.60; O, 10.99 / (exp.): C, 76.88; H, 10.35; N, 1.47. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.83 (4H, d, J = 8.4 Hz), 7.66 (4H, d, J = 8.4 Hz), 6.81 (4H, s), 4.05 (8H, t, J = 6.5 Hz), 4.01 (4H, t, J = 6.5 Hz), 1.84 (8H, m), 1.78 (4H, m), 1.56-1.45 (12H, m), 1.49 (18H, s), 1.42-1.20 (96H, m), 0.93-0.84, 0.89 (6H, t, J = 6.9 Hz), 0.88 (12H, t, J = 6.9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 159.7, 153.6, 148.6, 145.9, 144.7, 138.9, 135.3, 129.1, 127.0, 126.8, 112.4, 106.2, 85.5, 73.8, 69.5, 32.1, 32.1, 30.5, 29.9, 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 29.6, 29.5, 27.8, 27.8, 26.3, 22.8, 14.3. PM (C<sub>112</sub>H<sub>180</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>): 1746.63 u.



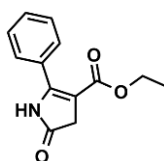
### 3,6-bis(3',4',5'-tri(dodecilossi)bifenil-4-il)pirrolo[3,4-c]pirrole-1,4(2H,5H)-dione

In un pallone ad un collo *longchains*-DPP-Boc (0.690 g, 0.40 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) viene lasciato in agitazione per 10', quindi si aggiunge TFA 99% (2.5 mL, 5% v/v) e si tappa la miscela di reazione lasciandola procedere sotto agitazione a temperatura ambiente per 1h (si effettua una TLC di controllo a 45', con miscela eluente Cy-Hex/AcOEt 9:1). Si rimuove il solvente a bassa pressione riprendendo la miscela di reazione quattro volte con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e quattro con Et<sub>2</sub>O. Si aggiunge acetone, si sonica per 15', quindi si centrifuga e si lava il precipitato quattro volte con acetone e infine due con metanolo. Una volta rimosso il solvente a bassa pressione, il prodotto desiderato si presenta come un solido rosso scuro, e viene ottenuto con resa quantitativa (0.60 g, resa: 98%). EA (calc.): C, 79.22; H, 10.69; N, 1.81; O, 8.28 / (exp.): C, 78.99; H, 10.73; N, 1.72. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 8.25 (4H, d, J = 8.5 Hz), 8.05 (2H, s), 7.75 (4H, d, J = 8.5 Hz), 6.82 (4H, s), 4.10-3.96 (12H, m), 1.90-1.72 (12H, m), 1.54-1.44 (12H, m), 1.42-1.18 (96H, m), 0.88 (6H, t, J = 6.8 Hz), 0.88 (12H, t, J = 6.8 Hz). <sup>13</sup>C non determinato a causa dell'elevata insolubilità del campione. UV-Vis (CHCl<sub>3</sub>), λ<sub>max</sub> (nm): 496, 529. Fluor. Em. (CHCl<sub>3</sub>), λ<sub>max</sub> (nm): 546. PM (C<sub>102</sub>H<sub>164</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>): 1546.40 u.

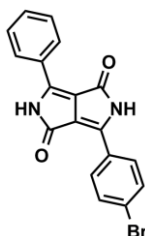


**Diethyl 2-benzoilsuccinato**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e bagno ad olio s'introduce etil-benzoilacetato (4.6 mL, 26.56 mmol), acetone (12 mL, 163.43 mmol), DME (8.8 mL, 84.74 mmol), estere bromoacetico (3.2 mL, 29.22 mmol) e  $K_2CO_3$  (4.0 g, 29.22 mmol). Si porta la miscela a riflusso (100 °C) e si lascia procedere sotto agitazione per 22h. Dopo aver raffreddato la miscela a temperatura ambiente si riprende con esano, si sonica, si filtra su imbuto Gooch, quindi si rimuove il solvente a bassa pressione. Si ottiene il prodotto desiderato sotto forma di olio marroncino (7.06 g, resa: 95%). PM ( $C_{15}H_{18}O_5$ ): 278.30u.

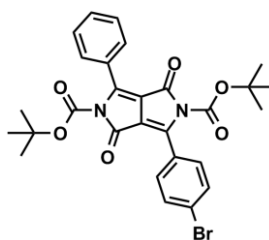
**Etil 5-osso-2-fenil-4,5-diidro-1H-pirrolo-3-carbossilato**<sup>49,50a-d</sup>

In un pallone ad un collo dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio e refrigerante s'introduce diethyl 2-benzoilsuccinato (7.06 g, 25.37 mmol), acido acetico (21 mL) e acetato d'ammonio (19.58 g, 254 mmol), quindi si porta la miscela a riflusso (175 °C) lasciandola procedere sotto agitazione. Dopo 2h 30' la miscela viene versata in un becher contenente ghiaccio tritato, quindi si filtra il precipitato su imbuto Büchner. Il filtrato, disciolto in  $CH_2Cl_2$ , viene lavato con  $H_2O$ . Le fasi organiche riunite vengono seccate su  $MgSO_4$ , quindi si rimuove il solvente a bassa pressione. Si ottiene il prodotto desiderato sotto forma di solido verdastro (3.94 g, resa: 67%).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.89 (1H, s, broad), 7.62-7.57 (2H, m), 7.49-7.42 (3H, m), 4.12 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 3.51 (2H, s), 1.19 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 163.3, 151.4, 130.8, 129.5, 128.8, 128.4, 104.6, 60.2, 38.9, 14.3. PM ( $C_{13}H_{13}NO_3$ ): 231.25 u. MS (EI, 70 eV)  $m/z$ : 231 ( $M^+$ , 39); 202 (20); 158 (100%).

**3-(4-bromfenil)-6-fenilpirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione**

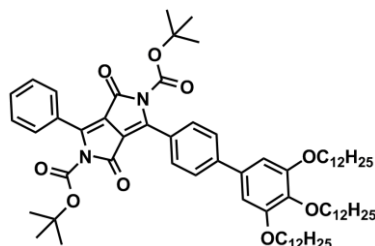
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, flusso d'argon, bagno ad olio e refrigerante s'introduce *t*-AmOH (56.8 mL, 518.92 mmol), sodio metallico (0.59 g, 25.95

mmol) e  $\text{FeCl}_3$  in quantità catalitica, quindi si porta la miscela ad  $80\text{ }^\circ\text{C}$  fino a completa dissoluzione del sodio. Dopo aver portato la T a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  s'introduce 4-bromo-benzonitrile (2.05 g, 11.24 mmol), quindi si scalda nuovamente fino a  $95\text{ }^\circ\text{C}$  e s'introduce etossifenilpirrolocarbossilato (2.0 g, 8.65 mmol). Si lascia procedere la reazione sotto agitazione per 14h, quindi si effettua il work-up raffreddando fino a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , versando la miscela di reazione in un becher contenente acqua (300 mL) e aggiungendo HCl 1.0 M (10 mL) sotto agitazione costante. La miscela viene infine filtrata su imbuto Büchner e il precipitato viene lavato accuratamente con  $\text{H}_2\text{O}$ , iPrOH e  $\text{Et}_2\text{O}$ . Il solvente viene rimosso a bassa pressione. Il prodotto, che si presenta sotto forma di solido rosso ciclamino scuro, non necessita di ulteriore purificazione (2.44 g, resa: 76%). EA (calc.): C, 58.88; H, 3.02; Br, 21.76; N, 7.63; O, 8.71 / (exp.): C, 58.64; H, 3.09; N, 7.84.  $^1\text{H}$  NMR ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11.38 (2H, s), 8.55-8.44 (2H, m), 8.40 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.81 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.67-7.52 (3H, m).  $^{13}\text{C}$  non determinato a causa dell'elevata insolubilità del campione. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3450 (m, b), 3137 (w), 1641 (vs), 1602 (s), 1560 (m), 1490 (w), 1454 (m), 1432 (w), 1384 (w), 1323 (w), 1314 (w), 1194 (w), 1141 (w), 1071 (w), 1006 (w), 830 (w), 813 (m), 699 (w), 682 (w), 660 (w), 626 (w), 455 (w). UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ),  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 502, 547. PM ( $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_2$ ): 367.20 u.



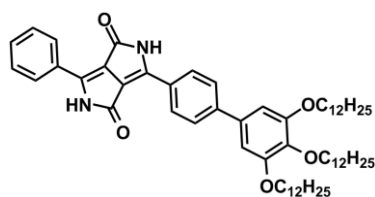
**Di-*tert*-butil 3-(4-bromofenil)-1,4-diosso-6-fenilpirrolo  
[3,4-*c*]pirrolo-2,5(1*H*,4*H*)-dicarbossilato**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, flusso d'argon, bagno ad olio e refrigerante s'introduce mono-Br-DPP (1.0 g, 2.72 mmol), THF (120 mL) e DMAP in quantità catalitica. Si lascia procedere la reazione per 15', quindi si aggiunge di-*tert*-butil dicarbonato (1.50 mL, 6.54 mmol) e si lascia procedere la reazione sotto agitazione a  $38\text{ }^\circ\text{C}$  per 48h. Si effettua il work-up rimuovendo il solvente e il di-*tert*-butil dicarbonato in eccesso a bassa pressione per qualche ora (evaporatore rotante,  $45\text{ }^\circ\text{C}$ ). Si ottiene il prodotto desiderato sotto forma di solido giallo-arancione (1.53 g, resa: 99%). EA (calc.): C, 59.27; H, 4.80; Br, 14.08; N, 4.94; O, 16.92 / (exp.): C, 59.46; H, 4.82; N, 5.11.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.77-7.70 (2H, m), 7.62 (4H, s), 7.54-7.45 (3H, m), 1.44 (9H, s), 1.40 (9H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 159.5, 159.3, 148.3, 148.1, 146.9, 145.0, 131.8, 130.0, 128.6, 128.6, 128.3, 127.2, 126.2, 112.9, 112.2, 110.3, 85.7, 85.6, 27.7, 27.6. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (w, b), 2980 (w), 2924 (w), 1751 (vs), 1709 (vs), 1622 (s), 1488 (m), 1446 (w), 1395 (w), 1370 (m), 1331 (m), 1289 (vs), 1261 (s), 1208 (m), 1146 (vs), 1104 (s), 1057 (vs), 1006 (m), 895 (vw), 875 (w), 830 (m), 805 (w), 772 (w), 752 (w), 735 (w), 721 (w), 688 (w). UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ),  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 435. PM ( $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_6$ ): 567.43 u.



**Di-*tert*-butil 1,4-diosso-3-fenil-6-(3',4',5'-tris(dodecilossi)bifenil-4-yl)pirrolo  
[3,4-*c*]pirrolo-2,5(1*H*,4*H*)-dicarbossilato**

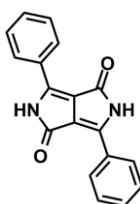
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, flusso d'argon, bagno ad olio e refrigerante s'introduce toluene (124.9 mL, 1172.40 mmol),  $K_2CO_3(aq)$  2.0 M (4.3 g, 31.19 mmol), acido 1,2,3-tridodecilossifenilboronico (0.53 g, 0.78 mmol) e mono-Br-DPP-Boc (0.29 g, 0.52 mmol). La miscela di reazione viene degasata gorgogliando argon e sonicando contemporaneamente per 15'. S'introduce quindi  $Pd(PPh_3)_4$  in quantità catalitica (0.1 eq) e si lascia procedere la miscela di reazione a riflusso (90 °C) sotto agitazione per 24h. Si effettua il work-up rimuovendo il solvente a bassa pressione ed estraendo la fase organica con  $Et_2O$ , lavandola due volte con  $H_2O$ . Il prodotto, disciolto nella minima quantità di  $Et_2O$ , viene fatto precipitare con  $CH_3OH$  freddo. Il precipitato viene centrifugato e lavato quattro volte con  $CH_3OH$ . Si ottiene il prodotto desiderato sotto forma di solido arancione (0.50 g, resa: 86%). EA (calc.): C, 75.23; H, 9.38; N, 2.51; O, 12.88 / (exp.): C, 75.02; H, 9.27; N, 2.66.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.83(2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.77-7.73 (2H, m), 7.66 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.52-7.47 (3H, m), 6.81 (2H, s), 4.05 (4H, t,  $J = 6.5$  Hz), 4.01 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 1.84 (4H, m), 1.78 (2H, m), 1.56-1.44 (6H, m), 1.48 (9H, s), 1.41 (9H, s), 1.41-1.20 (48H, m), 0.89 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz), 0.88 (6H, t,  $J = 6.8$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 159.6, 159.6, 153.6, 148.5, 148.2, 146.2, 146.1, 144.8, 138.9, 135.3, 131.6, 129.1, 128.6, 128.5, 128.5, 126.9, 126.7, 112.4, 112.3, 106.2, 85.4, 85.3, 73.7, 69.5, 32.1, 30.5, 29.9, 29.8, 29.6, 29.5, 29.5, 27.7, 27.6, 26.3, 22.8, 14.2. UV-Vis ( $CH_2Cl_2$ ),  $\lambda_{max}$  (nm): 451. PM ( $C_{70}H_{104}N_2O_9$ ): 1117.58 u.



**3-fenil-6-(3',4',5'-tris(dodecilossi)bifenil-4-yl)pirrolo[3,4-*c*]pirrolo-1,4(2*H*,5*H*)-dione**

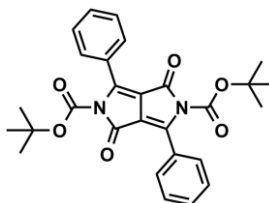
In un pallone ad un collo s'introduce mono-*longchains*-DPP-Boc (0.50 g, 0.45 mmol),  $CH_2Cl_2$  (55.46 mL, 865.23 mmol) e TFA (2.77 mL, 36.23 mmol). Si lascia procedere la reazione sotto agitazione a temperatura ambiente per 1h. Si riduce notevolmente di volume a bassa pressione, quindi si riprende la miscela quattro volte con  $CH_2Cl_2$  e quattro volte con  $Et_2O$ , rimuovendo di volta in volta il solvente a bassa pressione. Si aggiunge infine acetone, e si sonica per 15'. Il precipitato viene centrifugato e lavato quattro volte con acetone e due volte con  $CH_3OH$ . Il solvente è quindi rimosso a bassa pressione. Si ottiene un solido rosso

che non necessita di ulteriore purificazione (0.28 g, resa: 68%). EA (calc.): C, 78.56; H, 9.67; N, 3.05; O, 8.72 / (exp.): C, 78.72; H, 9.83; N, 2.89.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 8.28 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 8.25-8.15 (2H, m), 7.75 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.61-7.52 (3H, m), 6.83 (2H, s), 4.05 (4H, t,  $J = 6.6$  Hz), 4.01 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz), 1.84 (4H, m), 1.78 (2H, m), 1.56-1.44 (6H, m), 1.41-1.17 (48H, m), 0.88 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz), 0.88 (6H, t,  $J = 6.9$  Hz).  $^{13}\text{C}$  non determinato a causa dell'elevata insolubilità del campione. IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3450 (m, b), 2918 (s), 2845 (m), 1639 (vs), 1605 (s), 1499 (m), 1454 (m), 1426 (m), 1381 (w), 1337 (w), 1247 (w), 1200 (w), 1141 (w), 1116 (m), 813 (m), 682 (w), 662 (w). UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ),  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 480, 512. PM ( $\text{C}_{60}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_5$ ): 917.35 u.



### 3,6-difenilpirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione

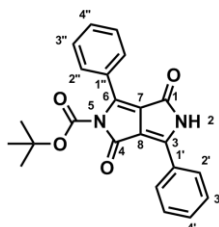
In pallone a tre colli dotato di agitazione meccanica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon, s'introduce *t*-BuOK (88.80 g, 791.4 mmol) e *t*-AmOH anidro (430 mL), quindi si innalza la temperatura fino a riflusso (130 °C). Si aggiunge benzonitrile (32.96 mL, 320.9 mmol), quindi dietil-succinato (26.6 mL, 159.9 mmol in 20 mL di *t*-AmOH) introdotto nell'arco di 8h 30' mediante *syringe-pump*. Si lascia procedere la miscela a riflusso sotto agitazione per 10h, quindi si abbassa la temperatura a 60 °C. Si aggiunge  $\text{CH}_3\text{OH}$  (400 mL) mediante imbuto gocciolatore nell'arco di 1h, seguito da  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  1.2 M (400 mL) nell'arco di 30'. Si filtra il prodotto ottenuto su imbuto Büchner, lavando il filtrato con  $\text{CH}_3\text{OH}$  (500 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  distillata bollente (600 mL), EtOH bollente (600 mL) ed infine con EtOH (700 mL). Il grezzo, che si presenta sotto forma di solido polverulento di colore rosso acceso, viene fatto seccare in pompa meccanica per 18h (28.35 g, resa: 61%).  $^1\text{H}$ NMR ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 8.47 (4H, Ar, m), 7.56 (6H, Ar, m). PM ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ): 288.30 u.



### Di-*terz*-butil 1,4-diosso-3,6-difenilpirrolo[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato

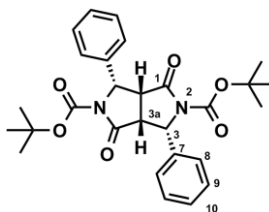
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'argon s'introduce DPP (5.0 g, 17.34 mmol) e DMAP in quantità catalitica, quindi si aggiunge THF anidro (500 mL) e si lascia procedere la reazione sotto agitazione a temperatura ambiente per 1h. S'inserisce quindi di-*terz*-butil dicarbonato (53.0 mL, 230.70 mmol), lasciando procedere la reazione sotto agitazione a temperatura ambiente per 18h, quindi si effettua il work-up

rimuovendo il solvente e l'eccesso di ABoc a bassa pressione (evaporatore rotante, 50 °C). Il grezzo di reazione viene ripreso con AcOEt, lavato con H<sub>2</sub>O acida e seccato su MgSO<sub>4</sub>. Le fasi organiche riunite sono evaporate a pressione ridotta per dare il prodotto desiderato sotto forma di solido giallo polverulento (8.47 g, resa: 99%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.74-7.23 (4H, Ar, m), 7.49-7.46 (6H, Ar, m), 1.39 (18H, Me, s). PM (C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>): 488.53 u.



### Terz-butil 1,4-diosso-3,6-bifenil-4,5-diidropirrolo[3,4-c]pirrolo-2(1H)-carbossilato

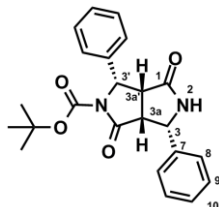
In un pallone ad un collo dotato di agitazione magnetica DPP-Boc (8.47 g, 17.34 mmol) viene disciolto in miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 9:1 (300 mL), quindi si aggiunge silice (200 g). Il solvente viene rimosso ad alto vuoto per 8h. Il reagente così adsorbito su SiO<sub>2</sub> viene lasciato in atmosfera anidra per una settimana, rinnovando il vuoto ogni 24h. Si effettua il work-up filtrando su imbuto Gooch e lavando ripetutamente la silice prima con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e poi con miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 9:1. Le fasi organiche riunite vengono evaporate a pressione ridotta fornendo il prodotto desiderato sotto forma di solido polverulento giallo-arancione (4.3 g, resa: 64%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 9.75 (1H, NH, s, broad), 8.34-8.31 (2H, H<sub>2''</sub>, m), 7.82-7.79 (2H, H<sub>2'</sub>, m), 7.56-7.53 (3H, H<sub>3'</sub> e H<sub>4'</sub>, m), 7.52-7.48 (3H, H<sub>3''</sub> e H<sub>4''</sub>, m), 1.43 (9H, H<sub>Me</sub>, s). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 163.7 (1C, C<sub>1</sub>), 159.5 (1C, C<sub>4</sub>), 146.3 (1C, C<sub>6</sub>), 144.7 (1C, C<sub>3</sub>), 132.6 (1C, C<sub>4'</sub>), 131.2 (1C, C<sub>4''</sub>), 129.2 (2C, C<sub>3'</sub>), 128.7 (1C, C<sub>1'</sub>), 128.4 (2C, C<sub>3''</sub>), 128.3 (2C, C<sub>2''</sub>), 128.1 (2C, C<sub>2'</sub>), 127.1 (1C, C<sub>1''</sub>), 107.9 (2C, C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub>), 84.9 (1C, C<sub>terz</sub>), 27.5 (3C, C<sub>Me</sub>). IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3401 (s, vb), 2977 (s), 1767 (s, b), 1653 (m), 1385 (s), 1105 (s), 940 (vs), 701 (vs), 569 (vs). PM (C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>): 388.42 u. MS (ESI) *m/z*: 411 (M<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>, 100%).



### (3S,3aR,6S,6aR)-di-terz-butyl 1,4-diosso-3,6-difeniltetraidropirrolo [3,4-c]pirrolo-2,5(1H,3H)-dicarbossilato

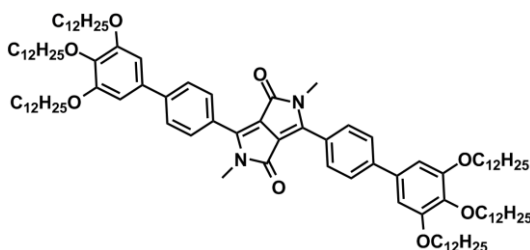
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e refrigerante s'introduce DPP-Boc(400 mg, 0.82 mmol), AcOEt (15 mL) e Pd/C 5% in quantità catalitica. Si lascia quindi procedere la reazione sotto agitazione a 50 °C per 48h in atmosfera idrogenata. Si effettua il work-up filtrando su imbuto Gooch e rimuovendo il solvente a bassa pressione. Si

ottiene il prodotto desiderato, che si presenta sotto forma di solido giallo paglierino, senza necessità di ulteriore purificazione (384 mg, resa: 95%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.38-7.32 (6H,  $\text{H}_9\text{-H}_{10}$ , m), 7.18-7.17 (4H,  $\text{H}_8$ , m), 5.47 (2H,  $\text{H}_3$ , m), 3.77 (2H,  $\text{H}_{3a}$ , m), 1.11 (18H,  $\text{H}_{t\text{-Bu}}$ , s). PM ( $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$ ): 492.56 u.



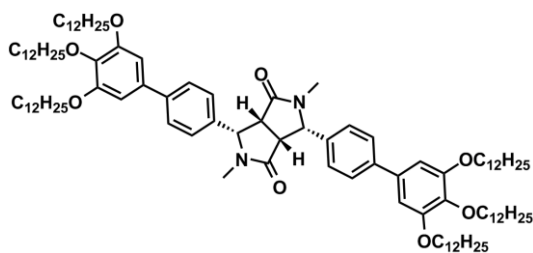
**(3S,3aR,6S,6aR)-terz-butil 1,4-diosso-3,6-difenilaidropirrollo  
[3,4-c]pirrolo-2(1H)-carbossilato**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica s'introduce DPP-mono-Boc (50 mg, 0.13 mmol), AcOEt (10 mL) e Pd/C 5% in quantità catalitica. Si lascia procedere la reazione sotto agitazione a temperatura ambiente per 48h in atmosfera idrogenata. Si effettua il work-up filtrando su imbuto Gooch e rimuovendo il solvente a bassa pressione. Si ottiene il prodotto desiderato, che si presenta sotto forma di solido giallo paglierino, senza necessità di purificazione (49 mg, resa: 96%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.44-7.32 (10H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ , m), 5.40 (1H,  $\text{H}_3$ , d,  $J = 8.0$  Hz), 5.13 (1H,  $\text{H}_3$ , d,  $J = 8.0$  Hz), 3.85 (1H,  $\text{H}_{3a}$ , t,  $J = 8.0$  Hz), 3.61 (1H,  $\text{H}_{3a}$ , t,  $J = 8.0$  Hz), 1.2 (9H,  $\text{H}_{t\text{-Bu}}$ , s). PM ( $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ ): 392.45 u.



**2,5-dimetil-3,6-bis(3',4',5'-tris(dodecilossi)bifenil-4-il)pirrolo  
[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon s'introduce NaH demineralizzato (5 mg, 0.11 mmol), *longchains*-DPP (50 mg, 0.03 mmol), quindi THF anidro (10 mL). Si innalza la temperatura a 35 °C, quindi si lascia procedere la miscela sotto agitazione per 30'. Si aggiunge metil-ioduro (20  $\mu\text{L}$ , 0.32 mmol) e si lascia procedere la reazione per 48h. Si rimuove il solvente a bassa pressione, si estrae la fase organica con AcOEt e si secca su  $\text{MgSO}_4$ . Dopo aver rimosso il solvente a bassa pressione si ottiene il prodotto desiderato, sotto forma di solido oleoso di colore rosso acceso (49.4 mg, resa: 97%). PM ( $\text{C}_{104}\text{H}_{168}\text{N}_2\text{O}_8$ ): 1574.46 u.

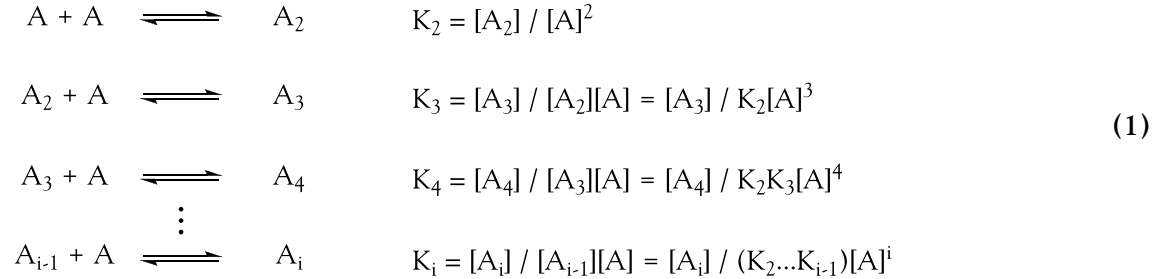


**(3S,3aR,6S,6aR)-2,5-dimetil-3,6-bis(3',4',5'-tris(dodecilossi)bifenil-4-il)  
tetraidropirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione**

In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e refrigerante s'introduce *longchains*-DPP metilato (49 mg, 0.03 mmol), AcOEt (10 mL) e Pd/C 5% in quantità catalitica. Si lascia procedere la reazione sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera idrogenata per 24h. Si effettua il work-up filtrando la miscela su imbuto Gooch e celite, lavando con AcOEt e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La rimozione del solvente a bassa pressione fornisce il prodotto desiderato, sotto forma di olio trasparente (49 mg, resa: 99%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.61 (4H, d, J = 8.5 Hz), 7.29 (4H, d, J = 8.5 Hz), 6.81 (4H, s), 4.89 (2H, m), 4.05 (6H, t, J = 6.5 Hz), 4.01 (6H, t, J = 6.5 Hz), 3.71 (2H, m), 2.62 (6H, s), 1.89-1.74 (6H, m), 1.74-1.45 (18H, m), 1.45-0.99 (82H, m), 0.99-0.55 (32H, m). PM (C<sub>104</sub>H<sub>172</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>): 1578.49 u.

## Appendice B – Modello di Zhao e Moore

Di seguito viene descritto l'approccio di Zhao e Moore utilizzato per ottenere le equazioni di *fitting* applicate nell'elaborazione dei dati. Dapprima si scrivono le equazioni (1) che descrivono gli equilibri chimici di tutte le specie coinvolte nel processo di aggregazione:



Successivamente si scrive il bilancio di massa per il monomero (2), dove  $C_T$  è la concentrazione iniziale delle specie in soluzione:

$$\begin{aligned}
 C_T &= [A] + 2[A_2] + 3[A_3] + 4[A_4] + \dots \\
 &= [A] + 2K_2[A]^2 + 3K_2K_3[A]^3 + 4K_2K_3K_4[A]^4 + \dots \\
 &= [A] (1 + 2K_2 + 3K_2K_3[A] + 4K_2K_3K_4[A]^2 + \dots)
 \end{aligned} \tag{2}$$

Quindi il bilancio di massa (3) per i prodotti di reazione,  $C_P$ :

$$\begin{aligned}
 C_P &= [A] + [A_2] + [A_3] + [A_4] + \dots \\
 &= [A] + K_2[A]^2 + K_2K_3[A]^3 + K_2K_3K_4[A]^4 + \dots \\
 &= [A] (1 + K_2 + K_2K_3[A] + K_2K_3K_4[A]^2 + \dots)
 \end{aligned} \tag{3}$$

Poiché in condizioni isodesmiche  $K_2=K_3=K_4=\dots=K_i$ , l'equazione (2) può essere riscritta nella forma seguente (4):

$$C_T = [A] (1 + 2K + 3K^2[A] + 4K^3[A]^2 + \dots) \tag{4}$$

Se si effettua il seguente cambio di variabile:

$$y = KC_T \quad x = K[A]$$

Risulta chiaro che l'equazione (4) rappresenta una serie convergente (5):

$$y = x (1 + 2x + 3x^2 + 4x^3 + \dots) = x / (1 - x)^2 \tag{5}$$



Dalla (5) si può ricavare la formula finale (6), che relaziona la concentrazione iniziale delle specie  $C_T$  con la concentrazione del monomero  $[A]$  in soluzione all'equilibrio.

$$C_T = \frac{[A]}{(1-K[A])^2} \quad [A] = \frac{2 K C_T + 1 - \sqrt{4 K C_T + 1}}{2 K^2 C_T} \quad (6)$$

In analogia con quanto dimostrato per (2), anche (3) è una serie convergente, per cui si può scrivere l'equazione seguente (7):

$$C_P = \frac{[A]}{1-K[A]} \quad (7)$$

Definendo infine la frazione molare del monomero come  $\alpha = [A]/C_T$  e il grado di polimerizzazione come  $DP = C_P/C_T$ , attraverso semplici sostituzioni si ottiene la formula finale usata per il *fitting* dei dati sperimentali (8A) e, dopo aver ricavato il valore di  $K$ , quella per il calcolo del  $DP$  (8B):

$$\alpha = \frac{2 K C_T + 1 - \sqrt{4 K C_T + 1}}{2 K^2 C_T^2} \quad (8A) \quad DP = \frac{1}{1-K[A]} \quad (8B)$$

A questo punto bisogna relazionare  $\alpha$  al parametro sperimentale misurato. Secondo la trattazione di Martin,<sup>29c</sup> per un generico dato osservabile (in questo caso il *chemical shift*) si può scrivere la seguente espressione (9):

$$\delta_{obs} = \alpha \delta_m + \beta \delta_d + \gamma \delta_t + \dots + \xi \delta_p \quad (9)$$

Dove  $\alpha, \beta, \gamma, \xi$  rappresentano tutte le frazioni molari delle specie partecipanti all'equilibrio (monomero, dimero, trimero, ... polimero). Nell'approssimazione che si possano apprezzare le variazioni di *chemical shift* dei soli monomero e polimero, la (9) può essere riscritta in forma approssimata come (10):

$$\delta_{obs} = \alpha \delta_m + \xi \delta_p \quad (10)$$

Ricordando infine che  $\alpha + \xi = 1$ , si ottiene la (11):

$$\delta_{obs} = \alpha \delta_m + (1-\alpha) \delta_p \quad (11)$$

Quest'ultima, messa a sistema con (8A), relaziona i tre parametri da ottimizzare  $K$ ,  $\delta_m$ ,  $\delta_p$  con i due parametri noti  $\delta_{obs}$  e  $C_T$ .

## Appendice C – Aggregati H e aggregati J

L'auto-assemblamento di coloranti in soluzione o all'interfaccia solido-liquido è un fenomeno che s'incontra di frequente, ed è dovuto all'instaurarsi di forze attrattive intermolecolari (van der Waals, legami a idrogeno, *stacking*  $\pi$ - $\pi$ ). Lo spettro di assorbimento degli aggregati in soluzione è differente rispetto a quello delle specie monomeriche, e la banda di assorbimento può subire uno *shift* batocromo (*red shift*) o ipsocromo (*blue shift*).<sup>56</sup>

Quando si ha uno *shift* batocromo la banda si chiama di tipo "J" ed è molto stretta (J da E. E. Jelley,<sup>66</sup> uno dei primi studiosi a indagare il fenomeno assieme a Scheibe-Peak nel 1936) mentre nel caso di uno *shift* ipsocromo si ha una banda di tipo "H" meno stretta (H da *hypsochromic*). Tale fenomeno è stato spiegato attraverso la teoria dell'accoppiamento degli eccitoni molecolari di Frenkel<sup>67</sup> (accoppiamento dei momenti di transizione delle molecole di colorante). Gli aggregati che nello spettro di assorbimento UV-Vis sono caratterizzati da una banda-J vengono detti aggregati J, mentre quelli caratterizzati da una banda-H sono detti aggregati H.

Studi approfonditi sugli aggregati H e J hanno portato a ipotizzare che tali aggregati possano esistere come un assemblato mono-dimensionale in soluzione che può originare un arrangiamento (a) "a mattoni" (*brickwork*), (b) "a scala a pioli" (*ladder*) o (c) "a scaletta" (*staircase*) (vedi figura C1).

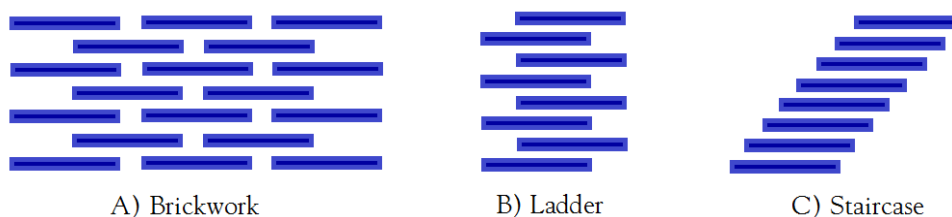


Figura C1: Tipologie di aggregazione in soluzione.

Di seguito si riporta una rappresentazione schematica della relazione tra arrangiamento dei cromofori e *shift* spettrale basato sulla teoria degli eccitoni molecolari. In accordo a tale teoria, la molecola di colorante viene considerata come un dipolo, e lo stato eccitonico dell'aggregato si divide in due livelli tramite l'interazione dei dipoli di transizione.

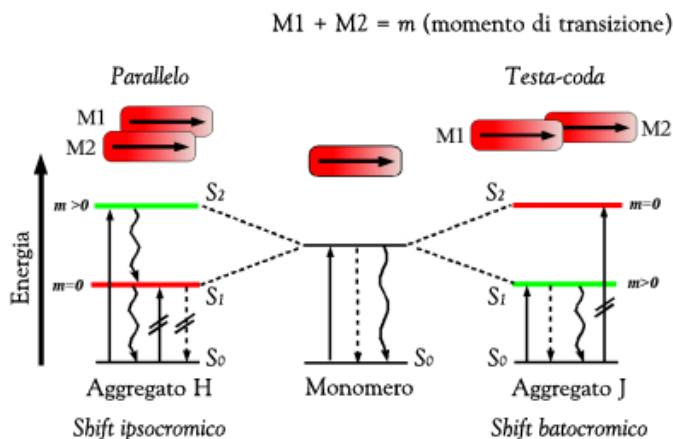


Figura C2: Schema della relazione tra *shift* spettrale e arrangiamento dei cromofori.

Le molecole di colorante possono allora aggregare (1) in modo parallelo per formare un dimero di tipo H o (2) a testa-coda per formare un dimero di tipo J. Gli aggregati J e H possono perciò essere ridefiniti come segue:

- *Aggregato J*: arrangiamento molecolare mono-dimensionale in cui i momenti di transizione dei singoli monomeri sono allineati parallelamente alla linea che passa per i loro centri.
- *Aggregato H*: arrangiamento molecolare mono-dimensionale in cui i momenti di transizione dei singoli monomeri sono allineati parallelamente tra loro ma in modo perpendicolare alla linea che passa per i loro centri.

In accordo con quanto accennato poco fa, durante l'assorbimento la transizione allo stato più alto negli aggregati paralleli di tipo H porta ad uno *shift* ipsocromico, mentre la transizione allo stato più basso negli arrangiamenti testa-coda di tipo J comporta uno *shift* batocromico.



338	0.97	0.42	0.49	49	0.95	0.65	0.65	75	0.95	0.87	0.69	83	0.94	1.17	0.73	370
339	0.97	0.41	0.46	43	0.96	0.64	0.63	68	0.95	0.86	0.67	76	0.94	1.16	0.71	341
340	0.97	0.40	0.42	38	0.96	0.63	0.60	62	0.95	0.85	0.65	69	0.95	1.15	0.69	314
341	0.98	0.39	0.38	32	0.96	0.62	0.58	55	0.96	0.84	0.62	63	0.95	1.14	0.67	288
342	0.98	0.38	0.34	27	0.97	0.61	0.55	50	0.96	0.83	0.60	57	0.95	1.13	0.65	264
343	0.98	0.37	0.29	23	0.97	0.60	0.52	44	0.96	0.82	0.57	51	0.95	1.11	0.63	241
344	0.99	0.36	0.24	18	0.97	0.59	0.48	39	0.96	0.81	0.54	46	0.96	1.10	0.61	219
345	0.99	0.35	0.19	14	0.97	0.58	0.43	34	0.97	0.79	0.51	41	0.96	1.09	0.58	199
346	0.99	0.34	0.11	10	0.98	0.56	0.40	29	0.97	0.78	0.48	36	0.96	1.08	0.56	180
347	1.00	0.32	0.05	6	0.98	0.54	0.34	25	0.97	0.76	0.45	31	0.97	1.06	0.53	162
348	1.00	0.31	0.00	2	0.98	0.53	0.30	21	0.98	0.75	0.41	27	0.97	1.05	0.50	145
349	1.00	0.31	0.00	1	0.99	0.51	0.25	17	0.98	0.73	0.37	23	0.97	1.03	0.47	128
350	1.00	0.31	0.00	1	0.99	0.50	0.19	13	0.98	0.71	0.33	20	0.97	1.00	0.44	113
351	1.01	0.31	0.00	0	0.99	0.48	0.13	10	0.98	0.70	0.29	16	0.98	0.98	0.40	99
352	1.01	0.31	0.00	0	0.99	0.46	0.07	7	0.99	0.68	0.25	13	0.98	0.96	0.37	85
353	1.01	0.31	0.00	0	1.00	0.44	0.02	4	0.99	0.65	0.20	10	0.98	0.94	0.33	72
354	1.02	0.31	0.00	0	1.00	0.44	0.01	1	0.99	0.62	0.15	7	0.99	0.91	0.29	60
355	1.02	0.31	0.00	0	1.00	0.43	0.00	1	1.00	0.60	0.06	3	0.99	0.89	0.25	49
356	1.02	0.31	0.00	0	1.01	0.43	0.00	1	1.00	0.58	0.04	2	0.99	0.86	0.21	38
357	1.02	0.31	0.00	0	1.01	0.43	0.00	0	1.00	0.58	0.03	1	0.99	0.83	0.11	19
358	1.03	0.31	0.00	0	1.01	0.43	0.00	0	1.00	0.58	0.02	1	1.00	0.80	0.04	7
359	1.03	0.31	0.00	0	1.01	0.43	0.00	0	1.01	0.58	0.01	0	1.00	0.77	0.02	2
360	1.03	0.31	0.00	0	1.02	0.43	0.00	0	1.01	0.58	0.01	0	1.00	0.77	0.01	1
361	1.04	0.31	0.00	0	1.02	0.43	0.00	0	1.01	0.58	0.01	0	1.00	0.77	0.00	0
362	1.04	0.31	0.00	0	1.02	0.43	0.00	0	1.02	0.58	0.00	0	1.01	0.77	0.00	0
363	1.04	0.31	0.00	0	1.02	0.43	0.00	0	1.02	0.58	0.00	0	1.01	0.77	0.00	0
364	1.04	0.31	0.00	0	1.03	0.43	0.00	0	1.02	0.58	0.00	0	1.01	0.77	0.00	0
365	1.05	0.31	0.00	0	1.03	0.43	0.00	0	1.02	0.58	0.00	0	1.02	0.77	0.00	0
366	1.05	0.31	0.00	0	1.03	0.43	0.00	0	1.03	0.58	0.00	0	1.02	0.77	0.00	0
367	1.05	0.31	0.00	0	1.04	0.43	0.00	0	1.03	0.58	0.00	0	1.02	0.77	0.00	0
368	1.06	0.31	0.00	0	1.04	0.43	0.00	0	1.03	0.58	0.00	0	1.02	0.77	0.00	0

**BIBLIOGRAFIA**

- 1 (a) Brunsveld, L.; Folmer, B. J. B.; Meijer, E. W.; Sijbesma, R. P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 4071-4097. (b) Hoeben, F. J. M.; Jonkheijm, P.; Meijer, E. W.; Schenning, A., *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1491. (c) De Greef, T. F. A.; Smulders, M. M. J.; Wolffs, M.; Schenning, A. P. H. J.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W., *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5687-5754.
- 2 Carothers, W. H. *Chem. Rev.* **1931**, *8*, 353.
- 3 Staudinger, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1920**, *53*, 1073.
- 4 (a) Wang, X.; Guerin, G.; Wang, H.; Wang, Y.; Manners, I.; Winnik, M. A. *Science* **2007**, *317*, 644. (b) Schappacher, M.; Deffieux, A. *Science* **2008**, *319*, 1512. (c) Tang, C.; Lennon, E. M.; Fredrickson, G. H.; Kramer, E. J.; Hawker, C. J. *Science* **2008**, *322*, 429. (d) Ruokolainen, J.; Makinen, R.; Torkkeli, M.; Makela, T.; Serimaa, R.; Ten Brinke, G.; Ikkala, O. *Science* **1998**, *280*, 557. (e) Pochan, D. J.; Chen, Z.; Cui, H.; Hales, K.; Qi, K.; Wooley, K. L. *Science* **2004**, *306*, 94. (f) Cui, H.; Chen, Z.; Zhong, S.; Wooley, K. L.; Pochan, D. J. *Science* **2007**, *317*, 647. (g) Cornelissen, J. J. L. M.; Fischer, M.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Nolte, R. J. M. *Science* **1998**, *280*, 1427. (h) Fréchet, J. M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4782. (i) Kato, T.; Mizoshita, N.; Kishimoto, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 38. (l) Kato, T.; Hirai, Y.; Nakaso, S.; Moriyama, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1857. (m) Sivakova, S.; Rowan, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 9. (n) Pollino, J. M.; Weck, M. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 193. (o) Weck, M. *Polym. Int.* **2007**, *56*, 453. (p) Percec, V.; Dulcey, A. E.; Balagurusamy, V. S. K.; Miura, Y.; Smidrkal, J.; Peterca, M.; Nummelin, S.; Edlund, U.; Hudson, S. D.; Heiney, P. A.; Duan, H.; Magonov, S. N.; Vinogradov, S. A. *Nature* **2004**, *430*, 764. (q) Feldman, K. E.; Kade, M. J.; de Greef, T. F. A.; Meijer, E. W.; Kramer, E. J.; Hawker, C. J. *Macromolecules* **2008**, *41*, 4694.
- 5 (a) Krische, M. J.; Lehn, J.-M. *Struct. Bonding (Berlin)* **2000**, *96*, 3-29. (b) Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 24-32. (c) Fredericks, J. R.; Hamilton, A. D. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Lehn, J.-M., Ed.; Pergamon: New York, **1996**, cap. 16.
- 6 (a) Jorgenson, W. L.; Pranata, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2008-2010. (b) Pranata, J.; Wierschke, S. G.; Jorgenson, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2810-2819.
- 7 (a) Sessler, J. L.; Wang, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1726-1729. (b) Kolotuchin, S. V.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *37*, 1726-1729. (c) Corbin, P. S.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9710-9711. (d) Beijer, F. H.; Sijbesma, R. P.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6761-6769. (e) Beijer, F. H.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 75-78.
- 8 (a) Fouquey, C.; Lehn, J.-M.; Levelut, A.-M. *Adv. Mater.* **1990**, *2*, 254-257. (b) Lehn, J.-M. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **1993**, *69*, 1-17.
- 9 Gulik-Krczywicki, T.; Fouquey, C.; Lehn, J.-M. *Adv. Mater.* **1990**, *2*, 254-257.
- 10 (a) Kotera, M.; Lehn, J.-M.; Vigneron, J.-P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 197-199. (b) Kotera, M.; Lehn, J.-M.; Vigneron, J.-P. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1953-1972.
- 11 (a) Sijbesma, R. P.; Beijer, F. H.; Brunsveld, L.; Folmer, B. J. B.; Hirschberg, J. H. K. K.; Lange, R. F. M.; Lowe, J. K. L.; Meijer, E. W. *Science* **1997**, *278*, 1601-1604. (b) Folmer, B. J. B.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1999**, *217*, 39.
- 12 Palmans, A. R. A.; Vekemans, J. A. J. M.; Fischer, H.; Hikmet, R. A. M.; Meijer, E. W. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 300-307.
- 13 Palmans, A. R. A.; Vekemans, J. A. J. M.; Havinga, E. E.; Meijer, E. W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2648-2651.
- 14 Green, M. M.; Peterson, N. C.; Sato, T.; Teramoto, A.; Lifson, S. *Science* **1995**, *268*, 1860-1866.
- 15 Smulders, M. M. J.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (2), 606-611.
- 16 (a) Yasuda, Y.; Iishi, E.; Inada, H.; Shirota, Y. *Chem. Lett.* **1996**, 575-576. (b) Hanabusa, K.; Koto, C.; Kimura, M.; Shirai, H.; Kakehi, A. *Chem. Lett.* **1997**, 429-430.
- 17 Markvoort, A. J.; Ten Eikelder, H. M. M.; Hilbers, P. A. J.; de Greef, T. F. A.; Meijer, E. W. *Nature Communications* **2011**, *2*.
- 18 Hirschberg, J. H. K. K.; Brunsveld, L.; Ramzi, A.; Vekemans, J. A. J. M.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Nature* **2000**, *407*, 167-170.
- 19 Sheu, E. Y.; Liang, K. S.; Chiang, L. Y. *J. Phys. (Paris)* **1989**, *50*, 1279-1295.
- 20 (a) Markovitsi, D.; Bengs, H.; Ringsdorf, H. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1992**, *88*, 1275-1279. (b) Markovitsi, D.; Bengs, H.; Pfeffer, N.; Charra, F.; Nunzi, J.-M.; Ringsdorf, H. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1993**, *89*, 37-42.

- 21 Gollivan, J. P.; Schuster, G. B. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2423-2429.
- 22 Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117-162.
- 23 (a) Edwards, R. G.; Henderson, J. R.; Pinning, R. L. *Mol. Phys.* **1995**, *86*, 567-598. (b) Henderson, J. R. *J. Chem. Phys.* **2000**, *133*, 5965-5970.
- 24 van Nostrum, C. F.; Nolte, R. J. M. *Chem. Commun.* **1996**, 2385-2392.
- 25 (a) Sielcken, O. E.; van Tilborg, M. M.; Roks, M. F. M.; Hendriks, R.; Drenth, W.; Nolte, R. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4261-4265. (b) Kobayashi, N.; Lever, A. B. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7433-7441.
- 26 van Nostrum, C. F.; Picken, S. J.; Nolte, R. J. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2173-2175.
- 27 (a) McKeown, N. B.; Painter, J. J. *Mater. Chem.* **1994**, *4*, 1153-1156. (b) Kroon, J. M.; Koehorst, R. B. M.; van Dijk, M.; Sanders, G. M.; Sudhölter, E. J. R. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 615-624.
- 28 Michelsen, U.; Hunter, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *29*, 764-767.
- 29 (a) Ciferri, A. *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 511. (b) Dudowicz, J.; Freed, K. F.; Douglas, J. F. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 12645. (c) Martin, R. B. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3043. (d) van der Schoot, P. "Theory of Supramolecular Polymerization" in *Supramolecular Polymers – 2nd edition*, Ciferri, A. ed., Taylor & Francis: London (U.K.), **2005**. (e) Henderson, J. R. *Phys. Rev. E* **1997**, *55*, 5731. (f) Douglas, J. F.; Dudowicz, J.; Freed, K. F. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 224901. (g) Mukerjee, P.; Ghosh, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6408. (h) Connors, K. A. *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*; Wiley: New York, **1987**. (i) Zhao, D.; Moore, J. S. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3471.
- 30 Braswell, E. H. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 3653.
- 31 Coggeshall, N. D.; Saier, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5414.
- 32 Bierzynski, A.; Kozłowska, H.; Wierchowski, K. L. *Biophys. Chem.* **1977**, *6*, 213. (b) Gajewska, J.; Bierzynski, A.; Bolewska, K.; Wierchowski, K. L.; Petrov, A. I.; Sukhorukov, B. I. *Biophys. Chem.* **1982**, *15*, 191.
- 33 Broom, A. D.; Schweizer, M. P.; Ts'o, P. O. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3612.
- 34 Gilligan, T. J.; Schwarz, G. *Biophys. Chem.* **1976**, *4*, 55.
- 35 Price, W. S.; Tsuchiya, F.; Arata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11503.
- 36 Tojo, H.; Horiike, K.; Shiga, K.; Nishina, Y.; Watari, H.; Yamano, T. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 12607.
- 37 Greer, S. C. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2002**, *53*, 173.
- 38 Apperloo, J. J.; Janssen, R. A. J.; Malenfant, P. R. L.; Frechet, J. M. J. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7038.
- 39 Smulders, M. M. J.; Nieuwenhuizen, M. M. L.; de Greef, T. F. A.; van der Schoot, P.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 362-367.
- 40 (a) van Gorp, J. J.; Vekemans, J. A. J. M.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14759. (b) Brunsveld, L.; Schenning, A. P. H. J.; Broeren, M. A. C.; Janssen, H. M.; Vekemans, J. A. J. M.; Meijer, E. W. *Chem. Lett.* **2000**, 292. (c) Wilson, A. J.; Masuda, M.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 2275.
- 41 Burnworth, M.; Tang, L.; Kumpfer, J. R.; Duncan, A. J.; Beyer, F. L.; Fiore, G. L.; Rowan, S. J.; Weder, C., *Nature* **2011**, *472*, 334.
- 42 Phadke, A.; Zhang, C.; Arman, B.; Hsu, C.-C.; Mashelkar, R. A.; Lele, A. K.; Tauber, M. J.; Arya, G.; Varghese, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4383.
- 43 Lincker, F.; Bourgun, P.; Masson, P.; Didier, P.; Guidoni, L.; Bigot, J.-Y.; Nicoud, J.-F.; Donnio, B.; Guillon, D. *Organic Letters* **2005**, *7*(8), 1505-1508.
- 44 Uemura, S.; Toshimitsu, A.; Okano, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1977**, 1076-1079.
- 45 (a) Putala, M.; Kastner-Pustet, N.; Mannschreck, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3333-3342. (b) Bellamy, F. D.; Ou, K. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 839. (c) Bellamy, F. D.; Ou, K. *Tetrahedron Letters* **1984**, *26*, 1362. (d) Gilbert, A. M.; Katz, T. J.; Geiger, W. E.; Robben, M. P.; Rehingold, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3199. (e) Ling, C.; Lahti, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8784. (f) Eguchi, S.; Yamashita, K.; Matsushita, K.; Kakehi, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4006.
- 46 (a) Yelamaggad, C. V.; Achalkumar, A. S.; Rao, D. S. S.; Prasad S. K. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8308-8318. (b) Secrist, J. A.; Logue, M. W. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 335. (c) Rogers, M. E.; Averill, B. A. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3308. (d) Lee, M.; Lown, J. W. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5717. (e) Manabe, K.; Okamura, K.; Date, T.; Koga, K. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6692. (f) Mendenhall, G.D.; Smith, P. A. S. *Org. Syn. Coll.* **1973**, *5*, 829. (g) Burdeska, K. *Synthesis* **1982**, 940. (h) Sleath, P. R.; Noar, J. B.; Eberlein, G. A.; Bruce, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3328.
- 47 (a) Filimonov, V. D.; Semenischeva, N. I.; Krasnokutskaya, E. A.; Tretyakov, A. N.; Hwang, H. Y.; Chi, K.-W. *Synthesis* **2008**, 185-187. (b) Krasnokutskaya, E. A.; Semenischeva, N. I.; Filimonov, V. D.; Knochel, P. *Synthesis* **2007**, 81-84.

- 48 (a) Schultz, A.; Laschat, S.; Diele, S.; Nimtz, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2829-2839. (b) Moleele, S. S.; Michael, J. P.; de Koning, C. B. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2831-2844.
- 49 Morton, C. J. H.; Gilmour, R.; Smith, D. M.; Lightfoot, P.; Slawin, A. M. Z.; MacLean, E. J., *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5547-5565.
- 50 (a) Demir, A. S.; Emrullahoglu, M.; Ardahan, G. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 461-468. (b) Metten, B.; Martinez, K.; Thomas, J.; Qin, W.; Smet, M.; Boens, N.; Dehaen, W. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2587-2591. (c) Morton, C. J. H.; Riggs, R. L.; Smith, D. M.; Westwood, N. J.; Lightfoot, P.; Slawin, A. M. Z. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 727-738. (d) Vynuchal, J.; Lunák, S.; Hatlapatková, Hrdina, R.; Lycka, A.; Havel, L.; Vynuchalová, K.; Jirásko, R. *Dyes Pigm.* **2008**, *77*, 266-276.
- 51 Zambounis, J. S.; Hao, Z.; Iqbal, A. *Canadian Patent* **1995**, PN: CA2.117.865.
- 52 Chen, Z.; Stepanenko, V.; Dehm, V.; Prins, P.; Siebbeles, L. D. A.; Seibt, J.; Marquetand, P.; Engel, V.; Würthner, F. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 436-449.
- 53 Ky Hirschberg, J. H. K.; Brunsveld, L.; Ramzi, A.; Vekemans, J. A. J. M.; Sijbesma, R. P. *Nature* **2000**, *407*, 167-170.
- 54 Würthner, F.; Hanke, B.; Lysetska, M.; Lambright, G.; Harms, G. S. *Org. Lett.* **2005**, *7*(6), 967-970.
- 55 (a) Brunsveld, L.; Zhang, H.; Glasbeek, M.; Vekemans, J. A. J. M.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6175-6182. (b) Jonkheijm, P.; Hoeben, F. J. M.; Kleppinger, R.; van Herrikhuyzen, J.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15941-15949.
- 56 Würthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha-Möller, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3376-3410.
- 57 Jonkheijm, P.; van der Schoot, P.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. *Science* **2006**, *313*, 80-83.
- 58 Fernández, G.; Stolte, M.; Stepanenko, V.; Würthner, F. *Chemistry – A European Journal* **2012**, n/a.
- 59 Yagai, S.; Nakano, Y.; Seki, S.; Asano, A.; Okubo, T.; Isoshima, T.; Karatsu, T.; Kitamura, A.; Kikkawa, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*.
- 60 Yagai, S.; Nakano, Y.; Seki, S.; Asano, A.; Okubo, T.; Isoshima, T.; Karatsu, T.; Kitamura, A.; Kikkawa, Y. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10186-10190.
- 61 Langhals, H.; Potrawa, T.; Noth, H.; Linti, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 478.
- 62 Yagai, S.; Nakano, Y.; Seki, S.; Asano, A.; Okubo, T.; Isoshima, T.; Karatsu, T.; Kitamura, A.; Kikkawa, Y. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10186-10190.
- 63 Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
- 64 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- 65 (a) Fukuda, T.; Sudo, E.-I.; Shimokawa, K.; Iwao, M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 328-338. (b) Lee, H.; Kim, D.; Lee, H.-K.; Qiu, W.; Oh, N.-K.; Zin, W.-C.; Kim, K. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 1019-1022. (c) Liang, J.; Zhang, J.; Zhu, L.; Duarandin, A.; Young, V. G.; Geacintov, N. Jr.; Canary, J. W. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 11196-11208. (d) Rosen, B. M.; Wilson, D. A.; Wilson, C. J.; Peterca, M.; Won, B. C.; Huang, C.; Lipski, L. R.; Zeng, X.; Ungar, G.; Heiney, P. A.; Percec, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17500-17521.
- 66 (a) Jelley, E. E. *Nature* **1936**, *138*, 1009-1010. (b) Jelley, E. E. *Nature* **1937**, *139*, 631. (c) Scheibe, G. *Angew. Chem.* **1936**, *49*, 563. (d) Scheibe, G. *Angew. Chem.* **1937**, *50*, 212.
- 67 Frenkel, J. *Phys. Rev.* **1931**, *37*, 17.



### 3. IDROGEL DALL'ACIDO IALURONICO PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE



### 3.1. Introduzione

#### 3.1.1. Acido ialuronico: chimica e utilizzo<sup>1</sup>

L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride lineare idrosolubile formato dalla condensazione di migliaia di unità disaccaridiche costituite da residui di acido D-glucuronico e *N*-acetil-D-glucosamina, legati tra loro alternativamente da legami glicosidici  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3 e da una fitta rete di legami a idrogeno intra- e inter- molecolari. Chiamato anche glicosaminoglicano (GAG), si trova nei tessuti di tutti i vertebrati, e viene prodotto anche da particolari ceppi batterici. È presente in maniera ubiquitaria nel corpo umano, dall'umore vitreo dell'occhio alla matrice extracellulare (ECM) dei tessuti cartilaginei,<sup>2</sup> dai tessuti connettivi a quelli epiteliali,<sup>3</sup> raggiungendo talvolta concentrazioni di qualche mg/mL.<sup>4</sup> L'HA, che di fatto è una macromolecola polianionica altamente idratata, presenta pesi molecolari compresi tra 100'000 Da (siero) e 8'000'000 Da (umore vitreo), corrispondenti ad una lunghezza polisaccaridica compresa tra 2000 e 25000 unità.

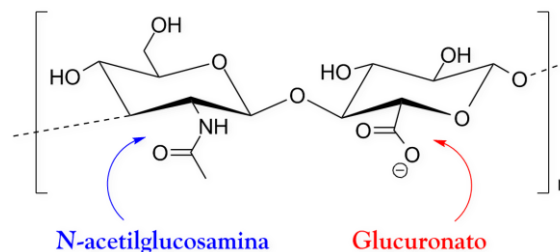


Figura 3.1: Struttura disaccaridica di base dell'acido ialuronico (HA).

L'HA è un componente essenziale della matrice extracellulare e possiede proprietà strutturali, reologiche, fisiologiche e biologiche che mediano attività nella segnalazione cellulare, nella riparazione delle ferite, nella morfogenesi e nell'organizzazione della matrice.<sup>5</sup> L'HA interagisce con le proteine, con i proteoglicani e altre molecole attive come i fattori di crescita, ma contribuisce attivamente anche al bilanciamento del quantitativo d'acqua cellulare agendo sulla pressione osmotica e sulla resistenza al flusso, setacciando la diffusione del plasma e delle proteine della matrice.<sup>6</sup> In altre aree, a causa dell'alta viscosità se posto in soluzione acquosa, agisce da lubrificante proteggendo le superfici delle cartilagini articolari. A livello molecolare l'HA espleta una funzione addizionale, ovvero contribuisce allo smaltimento dei radicali liberi.<sup>7</sup> Per di più, l'acido ialuronico viene metabolizzato molto rapidamente nel corpo grazie all'enzima ialuronidasi (ialuronato 4-glicanoidrolasi) che ne idrolizza i legami  $\beta$ -1,4 glicosidici con un tempo di dimezzamento compreso tra alcune ore e qualche giorno.<sup>8</sup>

HA e derivati vengono utilizzati clinicamente come prodotti medici da oltre trent'anni (*i.e.* come viscosupplementanti),<sup>3,9</sup> ma solo di recente ne è stato riconosciuto l'uso come struttura di supporto per la creazione di nuovi biomateriali utili nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria tissutale.<sup>10</sup> In passato infatti la fabbricazione di nuovi biomateriali è stata preclusa dalle deboli proprietà biomeccaniche dell'acido ialuronico, che essendo idrosolubile viene riassorbito dal corpo molto rapidamente. L'acido ialuronico

dev'essere perciò modificato per modificarne e potenziarne le proprietà, dall'attività biologica all'idrofobicità, creando materiali chimicamente e meccanicamente più robusti.<sup>4,11</sup> I derivati risultanti presentano caratteristiche chimico-fisiche che possono differire sostanzialmente dal polimero nativo, ma mantengono quasi sempre la biocompatibilità e la biodegradabilità. La modifica più classica prevede la conversione da forma sol viscosa a idrogel reticolato, in condizioni neutre o debolmente basiche (fig. 3.2 A). Altri metodi prevedono invece di funzionalizzare l'HA con determinati gruppi funzionali per ottenere nuovi reagenti per studi biochimici e fisiologici, o con farmacofori a rilascio mirato e controllato nel tempo (fig. 3.2 B). L'acido ialuronico può inoltre essere innestato in polimeri naturali o sintetici, per creare nuovi materiali con proprietà biomeccaniche e fisiologiche innovative.

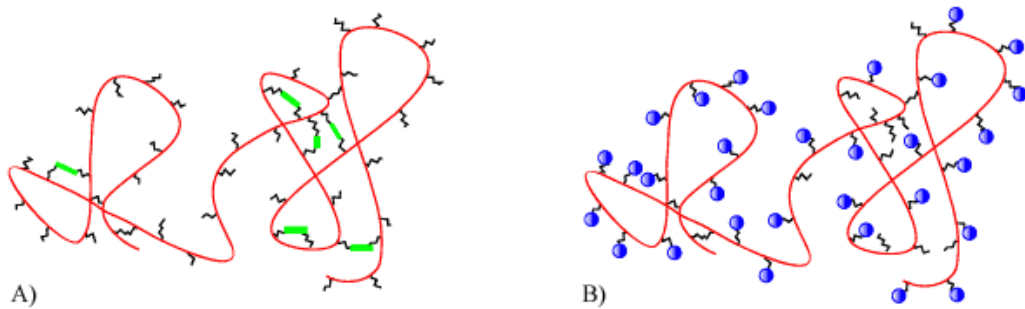


Figura 3.2: HA-idrogel reticolato (A) e HA con farmacofori (B).

Le modifiche chimiche sono state recensite in maniera molto approfondita,<sup>12</sup> e riguardano tre gruppi funzionali: l'acido carbossilico dell'acido glucuronico, i gruppi ossidrilici primari e secondari e il gruppo *N*-acetilico. Nella maggior parte dei casi i carbossilati vengono modificati tramite reazioni mediate da carbodiimmidi, esterificazione e amidazione, mentre gli ossidrili tramite eterificazione, *crosslinking* divinilsolfonico, esterificazione e *crosslinking* bis-epossidico.

Verrà ora affrontato un breve *excursus* sulle principali modifiche chimiche attuabili alla struttura dell'HA, seguito dalle potenziali applicazioni mediche di questi nuovi biomateriali.

### 3.1.2. Idrogel

Gli idrogel sono materiali polimerici ad alto contenuto d'acqua con proprietà fisiche variabili, progettati per somigliare alla matrice extracellulare dei tessuti corporei umani, in modo da essere impiegati nella medicina rigenerativa, come biosensori o come dispositivi per il rilascio controllato di farmaci.<sup>13</sup> Sono reti tridimensionali costituite da catene polimeriche idrofiliche reticolate, che possono essere modellate in qualsiasi forma e dimensione, assorbendo acqua fino ad aumentare di migliaia di volte il loro peso. Di recente decine di prodotti a base di idrogel, basati su polimeri naturali o di sintesi, sono stati utilizzati in ambito medico. Si pensi ad esempio alle lenti a contatto, costituite da acido poli(idrossietilmetacrilico),<sup>14</sup> ad alcuni adesivi biologici a base di fibrina o albumina, che vengono impiegati nelle operazioni chirurgiche,<sup>15</sup> o ancora ai riempitivi a base di acido ialuronico impiegati per svariate necessità cliniche.<sup>3</sup> Ultimamente sono emerse nuove applicazioni per gli idrogel, per lo più nell'ambito della proliferazione delle cellule staminali, della ricerca contro il cancro, della terapia cellulare, dell'ingegneria tissutale<sup>16</sup> e della diagnostica *in vitro*.<sup>13,17</sup> Tali applicazioni richiedono agli idrogel una versatilità chimico-meccanica maggiore: è richiesta soprattutto una compatibilità cellulare basata sull'imitazione della matrice extracellulare (ECM).<sup>18</sup> Ad oggi la progettazione di nuovi idrogel si concentra sullo sviluppo di caratteristiche adatte all'ambito biomedico, incluse proprietà di trasporto, interazioni tissutali (bioattività) e stabilità chimica (*i.e.* biodegradabilità). La biodegradazione degli idrogel è essenziale per quelle applicazioni biomediche che richiedono un riassorbimento *in vivo* controllato e/o una dissoluzione locale per facilitare la morfogenesi cellulare.<sup>13</sup> Il gruppo di ricerca di Patterson, ad esempio, ha creato composti bioattivi riassorbibili per il tessuto osseo sfruttando la fotopolimerizzazione dell'HA modificato con differenti quantità di glicidil-metacrilato GMA (usato come reticolante). La concentrazione relativa di GMA nell'HA è proporzionale alla velocità di riassorbimento dell'idrogel *in vivo*, e ciò di conseguenza influenza la formazione di nuovo tessuto osseo.<sup>19</sup>

La bioadesione è un'altra proprietà molto importante, che permette alle cellule e ai tessuti di aderire agli idrogel, rendendone possibile l'utilizzo in interventi di riparazione chirurgica o come strutture di supporto induttive per la rigenerazione tissutale. Sebbene alcuni idrogel come la fibrina o il collagene manifestino di per sé proprietà bioadesive, la maggior parte degli idrogel naturali e sintetici non ne possiede. Caratteristiche bioadesive vengono perciò indotte nell'idrogel usando delle molecole leganti che rendano possibili interazioni covalenti o non-covalenti tra l'idrogel e l'ambiente circostante, come oligopeptidi derivati dalla fibronectina.<sup>20</sup>

### 3.1.3. Biomateriali derivati dall'acido ialuronico

Nell'ultimo decennio il numero di derivati dell'HA con un potenziale clinico rilevante è aumentato sempre più. Storicamente, la biologia tissutale ha sempre ispirato chimici, medici e ingegneri a sviluppare tecnologie innovative per avvicinarsi all'architettura e alla complessità biologica degli organi *target*, ma questo senza avere un pieno riscontro sul mercato.<sup>21</sup> Un approccio economicamente più sostenibile<sup>10b,22</sup> prevede invece che i prodotti siano semplici e a composizione chimica definita, per un utilizzo immediato da parte dei medici. Di seguito viene riportata la struttura dell'acido ialuronico con i due siti più comunemente sfruttati per le modifiche di natura covalente: l'acido carbossilico e la funzionalità ossidrilica (fig. 3.3).

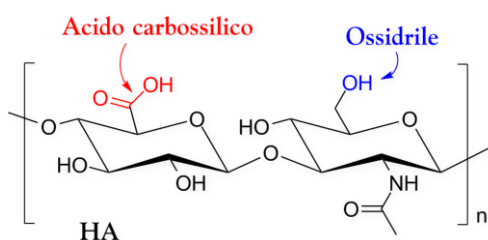


Figura 3.3: Siti primari per la modifica chimica dell'acido ialuronico.

#### a) Reazioni al gruppo carbossilico

##### HA – estere<sup>23</sup>

Un'esterificazione tipica al gruppo carbossilico dell'HA (parziale o totale) avviene per alchilazione del sale di tetrabutylammonio (HATBA) con un alogenuro alchilico in un solvente aprotico (DMF o DMSO) a temperatura controllata.<sup>24</sup> Materiali HYAFF® e ONCOFID® (*Fidia Advanced Biopolymers*)<sup>4</sup> vengono invece ottenuti tramite esterificazione del gruppo carbossilico del residuo glucuronico con diversi tipi di alcol (alifatici, aril-alifatici, cicloalifatici, *etc.*). Tale modifica chimica riduce i gruppi carbossilici idrofilici dell'HA, aumentandone di conseguenza la componente idrofobica: per alte percentuali di esterificazione gli HYAFF® risultano infatti insolubili in acqua. Si può ottenere una grande varietà di polimeri semplicemente variando il tipo di gruppo estereo introdotto o modulando la percentuale di gruppi carbossilici esterificati. Gli esteri possono quindi essere estrusi per produrre membrane e fibre, liofilizzati per ottenere spugne, o processati fino ad ottenere microsfele. In generale sono polimeri dotati di buona forza meccanica quando seccati, mentre sono meno robusti se vengono idratati. Gli esteri etilici e benzilici dell'HA, denominati rispettivamente HYAFF® 7 e HYAFF® 11, sono tra gli esteri dell'HA più caratterizzati da un punto di vista fisico-chimico e biologico. Prodotti a partire da HA avente PM pari a 200 kDa, quando viene incrementata la percentuale di esterificazione la solubilità in acqua diminuisce drasticamente.<sup>25</sup> Questo sia perché viene ridotto il numero di cariche anioniche dei carbossili, sia perché viene aumentata la componente idrofobica lungo la catena del glicosaminoglicano. Il grado di esterificazione influenza perciò direttamente la dimensione delle aree idrofobiche, originando un reticolo polimerico più rigido, stabile e meno

suscettibile alla degradazione enzimatica. È stato dimostrato come, a livello di biocompatibilità e di biodegradabilità,<sup>24,26</sup> lo HYAFF® 11 totalmente esterificato rappresenta il derivato più adatto per lo sviluppo di culture cellulari.<sup>4</sup> Uno dei vantaggi principali dell'impiego di HYAFF® 11 come struttura di supporto è la buona adesività delle cellule anche senza alcun trattamento di condizionamento superficiale, spesso richiesto invece dalle altre matrici artificiali.<sup>27</sup> È stato anche valutato il rilascio di steroidi (idrocortisone e  $\alpha$ -metilprednisolone) da microsfere fabbricate da diversi derivati di HYAFF®, con l'unità farmacofora dispersa o legata direttamente al polimero. Mentre l'idrocortisone esce dalle microsfere in 10', il rilascio del farmaco legato covalentemente avviene in un tempo molto più prolungato (100h per rilasciarne metà), tramite idrolisi dell'estere.

Tali esteri vengono utilizzati anche come reti o spugne per la crescita di culture di fibroblasti o per la cultura di condrociti e cellule mesenchimali derivate dal midollo osseo per la riparazione delle cartilagini o di difetti ossei.

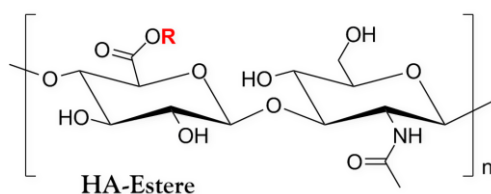
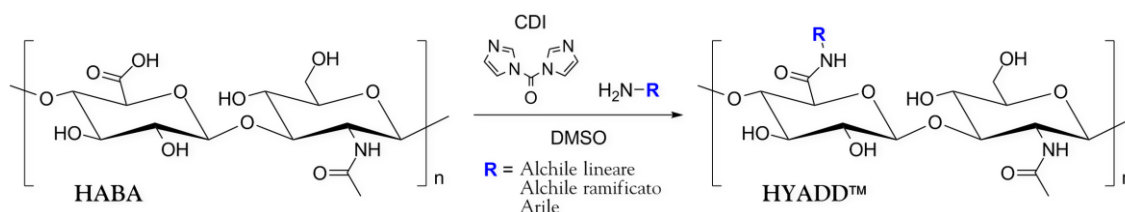


Figura 3.4: Struttura dimerica dell'HA-estere.

### HA – ammidi

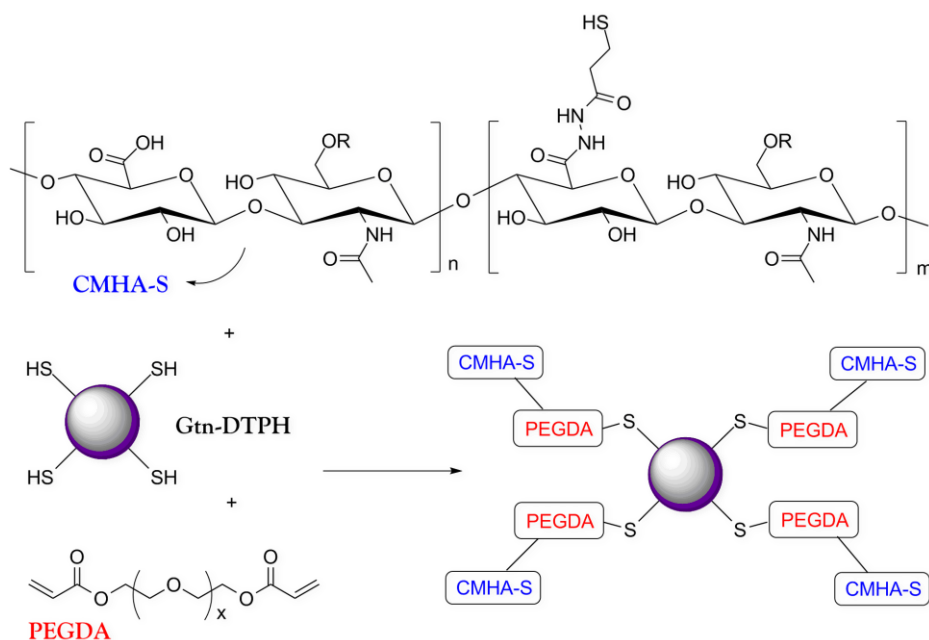
Per modificare le proprietà chimico-fisiche e reologiche dell'acido ialuronico, aumentandone il tempo di resistenza *in vivo* prima della biodegradazione, la *Fidia Advanced Biopolymers* ha messo a punto ed ottimizzato una procedura di sintesi che agisce sul gruppo carbossilico del residuo glucuronico, creando un derivato ammidico dell'HA, denominato HYADD® (schema 3.1).<sup>28</sup> Tale tipologia di viscosupplementante si realizza con una derivatizzazione molare dell'1-15%, e presenta *performance* reologiche fortemente aumentate, oltre ad una solubilità in acqua variabile in base alla percentuale di derivatizzazione. All'interno di tale categoria l'HYMOVIS®, derivato che si ottiene funzionalizzando l'HA con esadecilammina, diventa un idrogel ad alta viscoelasticità in soluzione acquosa dopo trattamento termico.



Schema 3.1: Sintesi di HYADD.

## HA – tiolo

Per creare matrici extracellulari sintetiche (sECM) modulari e versatili per l'uso in medicina rigenerativa<sup>29</sup> è stata sviluppata una chimica che introduce tioli, basata sulla modificazione dei gruppi carbossilici dell'HA usando reagenti idrazidici contenenti un legame disolfuro.<sup>30</sup> Macromonomeri HA-derivati con gruppi tiolici ossidabili reticolano all'aria, lentamente ma spontaneamente, per formare idrogel che possono poi essere essiccati per originare un film sottile o liofilizzati per produrre spugne porose.<sup>31</sup> Il *crosslinking* con elettrofili bifunzionali<sup>32</sup> può essere eseguito in presenza o in assenza di cellule, per dare idrogel iniettabili e biocompatibili. Le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione dell'idrogel (vedi schema 3.2) possono essere alterate variando parecchi parametri,<sup>33</sup> tra cui: (1) il PM dell'HA di partenza, (2) la percentuale di funzionalizzazione con tioli, (3) la concentrazione di HA tiolato (CMHA-S, carbossimetil-HA tiol-modificato) e di gelatina tiolata (Gtn-DTPH), (4) il PM del *crosslinker* bifunzionale poli(etilen-glicole)-diacrilato (PEGDA) e infine (5) il rapporto tra tioli e acrilati. Oltre alla struttura dell'idrogel sotto riportata, esistono tipologie più semplici di derivati dell'HA con gruppi tiolici che, in seguito ad ossidazione a temperatura ambiente, originano ponti S-S tra catene dello stesso polimero o tra catene di polimeri diversi adiacenti. Tuttavia di recente è stato dimostrato come la sintesi di derivati tiolici dell'HA sia un processo che può influire negativamente sulla struttura originaria dell'HA, riducendone il PM.<sup>30a</sup> Per di più l'inclusione di tioli potrebbe complicare le reazioni di reticolazione in presenza di peptidi contenenti cisteina o di proteine.<sup>34</sup> Queste possono infatti reagire con i gruppi tiolici con formazione di legami disolfuro, alterando la struttura e la funzione dei gruppi precedentemente introdotti.



Schema 3.2: ECM sintetica reticolata formata da CMHA-S e Gtn-DTPH.

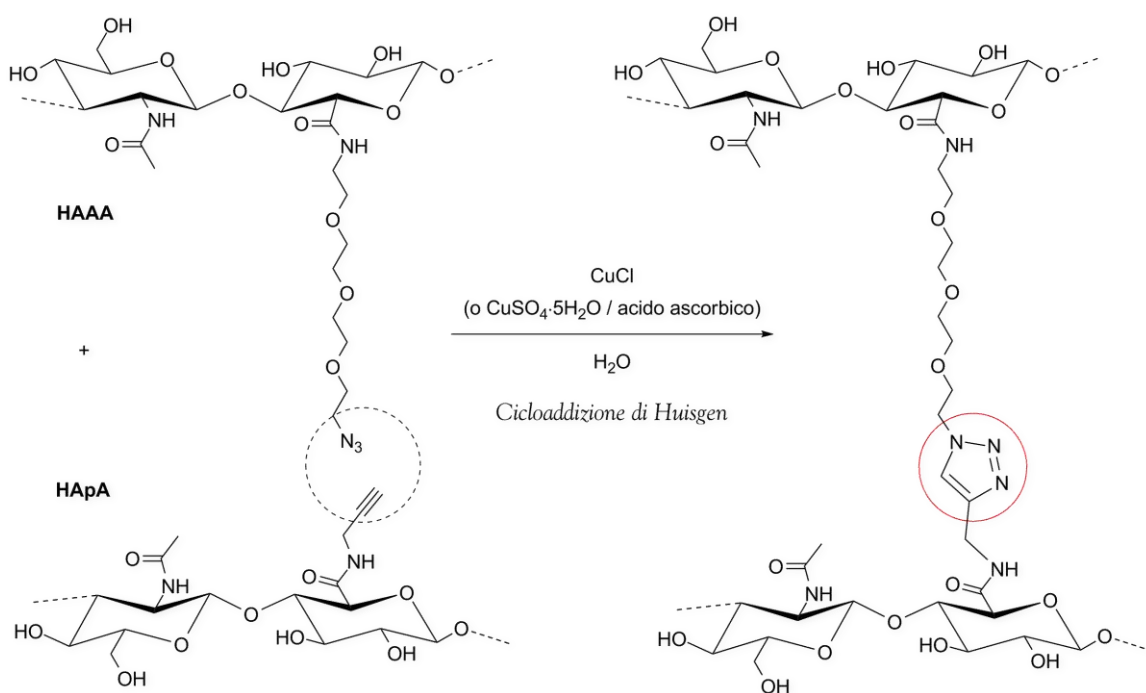


### Reazioni mediate da carbodiimmide<sup>35</sup>

La modifica chimica delle funzionalità carbossiliche dell'HA con carbodiimmidi viene generalmente effettuata in acqua con valori di pH attorno a 4.75: per tale valore l'acido carbossilico è protonato, ma una piccola percentuale dell'ammina basica può restare in forma nucleofila per produrre un addotto covalente.

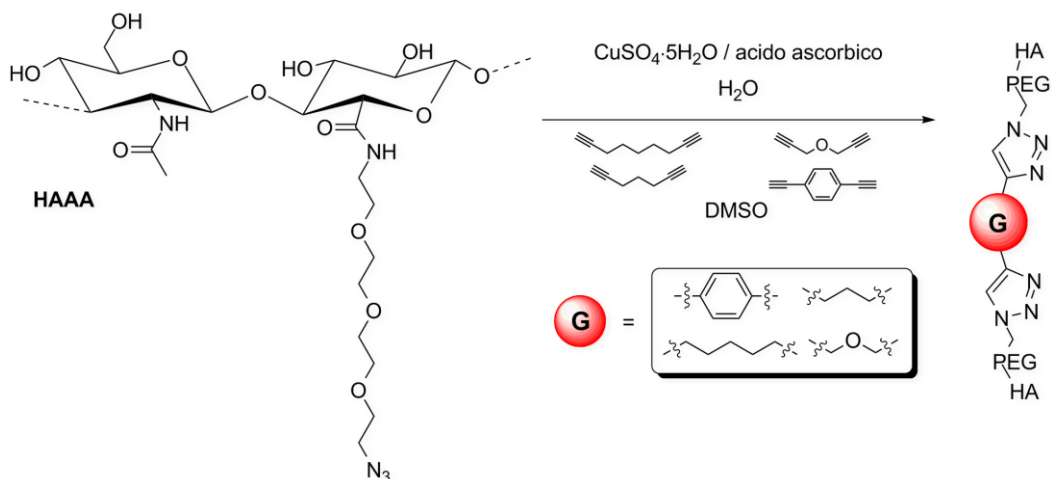
#### 1. Cicloaddizione di Huisgen

La reazione di cicloaddizione di Huisgen<sup>36</sup> di azidi con alchini per produrre triazoli, processo tipico della *click chemistry*,<sup>37</sup> viene sfruttata per produrre idrogel derivati dall'acido ialuronico, talvolta con incapsulamento di cellule di lieviti durante la reticolazione<sup>38</sup> o con farmaci quali benzidamina o doxorubicina. I carbossilati dell'HA vengono modificati usando la chimica della carbodiimmide sia con amidi propargiliche sia con amidi azidotrietilenglicoliche, solitamente utilizzando un catalizzatore di rame a temperatura ambiente (i.e. CuCl, CuI, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O).<sup>39</sup> La cicloaddizione avviene in sospensione acquosa senza pericolo per cellule eventualmente incluse, dal momento che i gruppi azidici e alchinnici reagiscono esclusivamente tra loro. Il primo *click-gel* derivato dall'HA non si poteva usare in ambito clinico, per la complessità della preparazione chimica e per la tossicità del preparato. Di recente invece l'incapsulamento diretto di cellule in un *click-gel* PEG-peptidico è stato raggiunto usando alchini macromolecolari e precursori azidici in combinazione con la *click chemistry* del difluorocicloottino (in assenza di rame).<sup>40</sup> Questo risultato innovativo suggerisce un potenziale approccio alternativo per la preparazione di idrogel biocompatibili e più complessi dal punto di vista funzionale. Il prodotto finale che si ottiene è un gel molto compatto ("parete-parete") ma allo stesso tempo facilmente estraibile.



**Schema 3.3:** Reazione azide-alchino con formazione di un anello triazolico (*click-gel*).

Sono state studiate inoltre le reazioni del derivato azidico dell'HA (HAAA) con differenti alchini,<sup>41</sup> come illustrato nello schema 3.4, valutandone di volta in volta la capacità di rilascio controllato di farmacofori e l'entità dello *swelling* (rigonfiamento del gel per assorbimento d'acqua). Il vantaggio principale rispetto alla procedura appena vista è che si parte da un'unica tipologia di composto.



**Schema 3.4:** Reazione tra HAAA e alchini.

Si è notato come i valori di *swelling* siano generalmente crescenti al diminuire della concentrazione di polimero in soluzione, e crescenti (a parità di polimero) al diminuire della quantità di  $\text{CuSO}_4$  utilizzato. Poca influenza sembra avere invece la quantità di acido ascorbico, utilizzato comunque sempre in eccesso rispetto al rame. Ad ogni modo i diversi alchini portano a valori di *swelling* differenti a parità di condizioni di reazione: catene dialchiniche più lunghe portano a valori di *swelling* inferiori. Tale andamento non è attribuibile alla lunghezza del *linker* in sé, ma ad un maggior grado di reticolazione del gel in presenza di dialchini con uno *spacer* più lungo.

## 2. HA – diidrazide

Un passo importante nella chimica dell'acido ialuronico fu la scoperta che le idrazidi mantengono la loro nucleofilicità a  $\text{pH} = 4.75$ , e reagiscono in maniera molto efficiente con i residui carbossilici attivati dalla carbodiimmide.<sup>42</sup> La modifica originale dell'HA prevedeva l'utilizzo della diidrazide adipica (ADH),<sup>43</sup> anche se in seguito vennero usate altre mono- e poli- diidrazidi.<sup>44</sup> L'HA-ADH, dotato di gruppi idrazidici multipli pendenti, è stato spesso impiegato per la capacità di formare legami idrazonici con aldeidi e chetoni, consentendo l'addizione di gruppi idrofobici e l'inserimento di medicinali, polipeptidi, agenti reticolanti o *probe* biochimici. I gruppi idrazidici di un HA-ADH possono essere "caricati" perciò con principi attivi farmacologici e quindi reticolati all'interno di un idrogel (il farmaco è perciò presente nel *bulk* dell'idrogel). In alternativa si può reticolare un numero limitato di gruppi idrazidici mentre i gruppi idrazidici rimanenti dell'idrogel possono essere dotati di farmacofori. Altre reazioni mediate da carbodiimmide hanno sfruttato specie con idrossilammina per ottenere esteri attivati dell'HA.

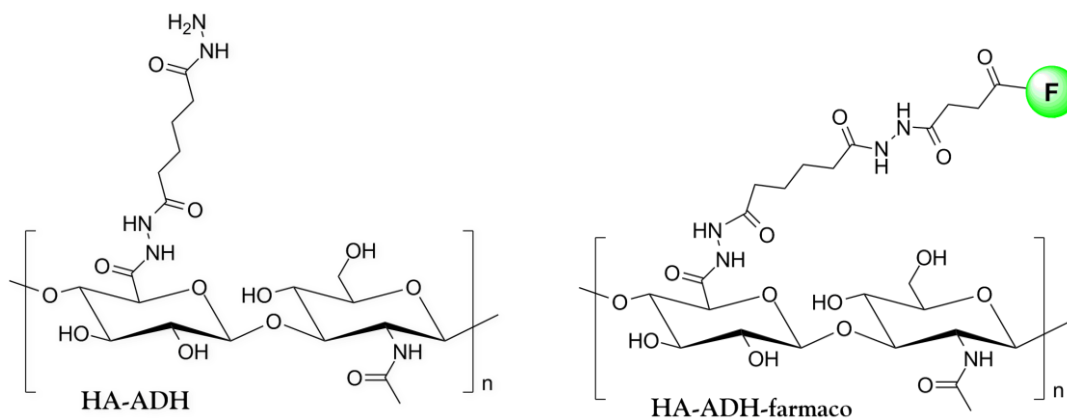


Figura 3.5: Struttura dimerica dell'HA-ADH, senza e con farmaco.

### HA – tirammide

Di recente è stato descritto un idrogel che sfrutta un *crosslinking* enzimatico *in situ*, in cui l'abbinamento di tirammina con una piccola percentuale di carbossilati dell'HA produce HA-tiramamide<sup>45</sup> (vedi figura 3.6). La reticolazione viene indotta per aggiunta di acqua ossigenata a soluzioni di HA-tiramamide a cui è stato aggiunto HRP (*horseradish* perossidasi), sia in presenza che in assenza di cellule. La reazione di perossidasi risultante forma radicali fenolato, che isomerizzano e dimerizzano per formare addotti di-tirammina fluorescenti sotto forma di robusti idrogel reticolati.

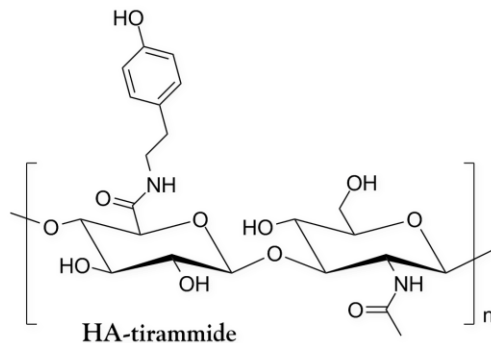


Figura 3.6: Struttura dimerica di HA-tiramamide.

### b) Reazioni al gruppo ossidrilico

#### HA – solfato (HAS<sub>x</sub>)

Per ottenere un materiale biocompatibile come rivestimento medicale è stata sperimentata la solfatazione dei gruppi ossidrilici dell'HA. La metodologia sintetica prevede come materiale di partenza HA a 200 kDa, e un grado di solfatazione compreso tra 0.5% e 3.5%. Si ottengono così derivati altamente solubili in acqua, con attività anticoagulante, antitrombotica e antinfiammatoria. La solfatazione con il complesso piridina-zolfo triossido (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>NSO<sub>3</sub>) in DMF dà luogo a differenti gradi di solfatazione, con formazione di composti a formula generica HAS<sub>x</sub> (con 1 < x < 4 per ciascun disaccaride). L'HAS<sub>3.5</sub> è stato quindi immobilizzato in polietilene (PE) processato al plasma, usando un derivato diamminico del

PEG e una carbodiimmide idrosolubile. Inoltre l'HAS<sub>x</sub> è stato anche convertito in un derivato azidofenilamminico fotolabile, e foto-immobilizzato su un film di poli-etilene-terefalato (PET).<sup>46</sup> Le superfici rivestite con HA solfato presentano un'evidente riduzione nell'adesione cellulare e nella crescita batterica, se confrontate alle superfici non trattate, e il rivestimento risulta stabile alla degradazione della ialuronidasi e della condroitinasi.

#### HA – bromoacetato

Sono stati sintetizzati derivati dell'HA bromoacetati (HABA) con un grado di sostituzione pari al 18% in soluzione acquosa, usando un eccesso di anidride bromoacetica.<sup>47</sup> La reazione procede quasi esclusivamente sui gruppi idrossilici primari più reattivi dei residui N-acetilglucosaminici.

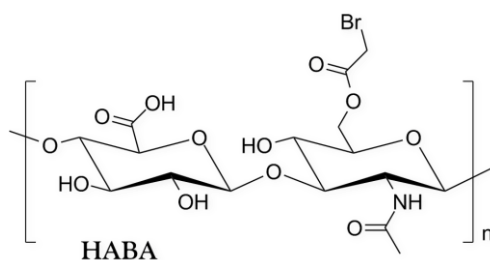


Figura 3.7: Struttura dimerica dell'HABA.

#### HA – aldeide

In passato per la cura delle corde vocali sono stati proposti idrogel reticolati e microgel a base di HA con viscoelasticità modulabile. Questi materiali presentano particelle di acido ialuronico in cui le funzionalità alcoliche secondarie vicinali vengono ossidate con periodato di sodio per produrre funzionalità bis-aldeidiche superficiali. Partendo da questo HA attivato con periodato, un *coupling* riduttivo con un'ammina primaria può dare reticolazione, possibilità di legare peptidi, o materiali immobilizzati. L'aggiunta di una soluzione di HA-ADH crea infine una rete doppiamente reticolata (DXN, *double-crosslinked*), che genera un gel elastico stabile ma più duro. Queste reti DXN presentano una gerarchia strutturale e proprietà meccaniche adatte per la riparazione di tessuti morbidi.<sup>48</sup>

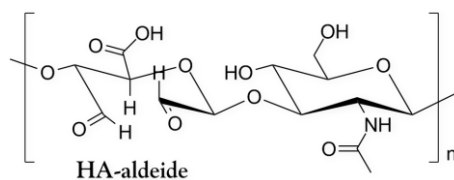


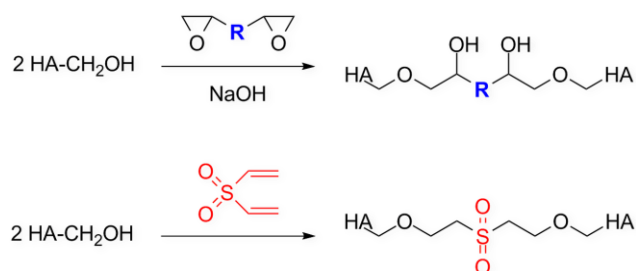
Figura 3.8: Struttura dimerica di HA-DXN.

#### c) *Reazioni di polimerizzazione e fotopolimerizzazione*<sup>16f,49</sup>

I processi che verranno affrontati di seguito sfruttano quasi sempre le reazioni appena viste, ma vengono descritti a parte per focalizzarsi sul processo impiegato per convertire l'HA tal quale in un materiale meccanicamente più robusto.

### Crosslinking bis-epossidico o con divinilsolfone<sup>50</sup>

Il gruppo di ricerca di Laurent<sup>51</sup> ha preparato idrogel reticolati da HA in soluzione di NaOH diluito utilizzando bis-epossibutano e NaBH<sub>4</sub>, con una strategia sviluppata inizialmente per il *crosslink* dell'agarosio. Anche la reazione dell'HA con etilenglicole-diglicidil etere in soluzione etanolica di NaOH 0.1 M a 60 °C origina idrogel, con un altissimo contenuto d'acqua, mentre idrogel preparati da HA e 1,4-butendiolo-diglicidil etere sono molto porosi.<sup>52</sup> Questi ultimi vengono attivati con periodato e modificati con un peptide a 18 aminoacidi contenente un sito per il legame cellulare, l'Arg-Gly-Asp (RGD), in grado di rafforzare l'attacco cellulare all'idrogel. Con *medium* basici per reticolare l'HA si utilizza anche divinilsolfone, per lo più tramite reazione dei gruppi ossidrilici.



Schema 3.5: Crosslinking epossidico o con divinilsolfone.

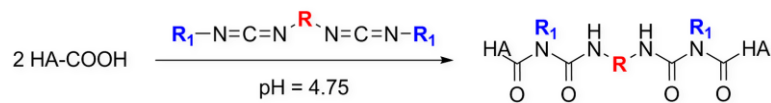
### Esterificazione interna

Il polimero auto-reticolante ACP<sup>®</sup> (*autocrosslinked-polymer*, Fidia Farmaceutici S.p.A.) è un derivato esterificato dell'HA, in cui si ha la formazione di legami inter- ed intramolecolari tra i gruppi ossidrilici e carbossilici.<sup>53</sup> La stabilità del polimero in questo caso viene ottenuta creando legami di reticolazione intra- ed inter- molecolari, senza aggiunta di sostanze chimiche addizionali.<sup>4</sup> Dal punto di vista tossicologico, l'idea di avere solamente HA con un legame estereo esclude la tossicità, seppur minima, derivante dall'impiego di qualsiasi agente di reticolazione. L'ACP<sup>®</sup> può essere liofilizzato in forma di polvere bianca o idratato per ottenerne un gel trasparente, da essere utilizzato come struttura di supporto per la crescita cellulare nella riparazione di difetti tissutali. Spugne porose a base di ACP<sup>®</sup> inserite per via sottocutanea, opportunamente pre-trattate con condrociti o osteoblasti, favoriscono la rigenerazione di tessuti cartilaginei ed ossei danneggiati.

### Reticolazione mediata da carbodiimmide

La *Anika Therapeutics* ha sviluppato in passato Incert<sup>®</sup>, una spugna bio-assorbibile preparata dal *crosslinking* di HA con bis-carbodiimmide in isopropanolo acquoso.<sup>54</sup> La procedura di sintesi sfrutta l'indesiderata propensione della carbodiimmide a reagire con l'HA per formare *N*-acilurea. In questa applicazione infatti la formazione di due legami *N*-acilurea genera una reticolazione chimicamente stabile e senza sottoprodotti. A causa dell'idrofobicità delle bis-carbodiimmidi usate, Incert<sup>®</sup> aderisce ai tessuti senza il bisogno di suture e mantiene

l'efficacia anche in presenza di sangue. Di recente ne è stata confermata l'efficacia anche come agente di prevenzione per le adesioni post-chirurgiche.

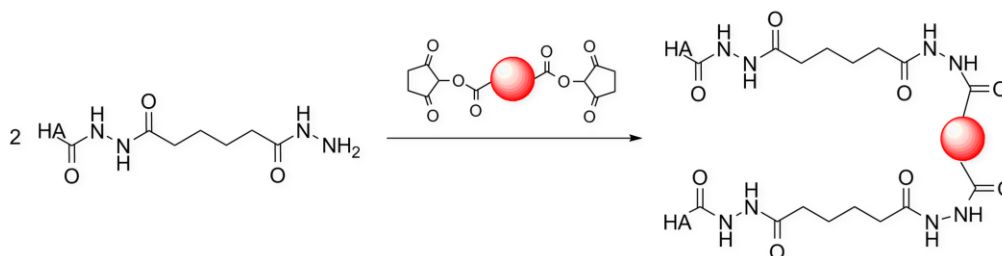


**Schema 3.6:** Sintesi mediata da carbodiimide.

### Reticolazione tramite idrazidi

Sfruttando la chimica dell'idrazide prima descritta, sono stati preparati degli idrogel che vedono l'uso di bis-idrazide, tris-idrazide e idrazide polivalente come *crosslinker*. Con il perfezionamento delle condizioni di reazione e dei rapporti molari tra i reagenti, si possono ottenere gel con proprietà fisico-chimiche diverse, da gel estremamente morbidi a gel meccanicamente più rigidi e friabili. L'HA-ADH può essere reticolato utilizzando piccole molecole di agenti reticolanti omo-bifunzionali commerciali (vedi schema 3.7).

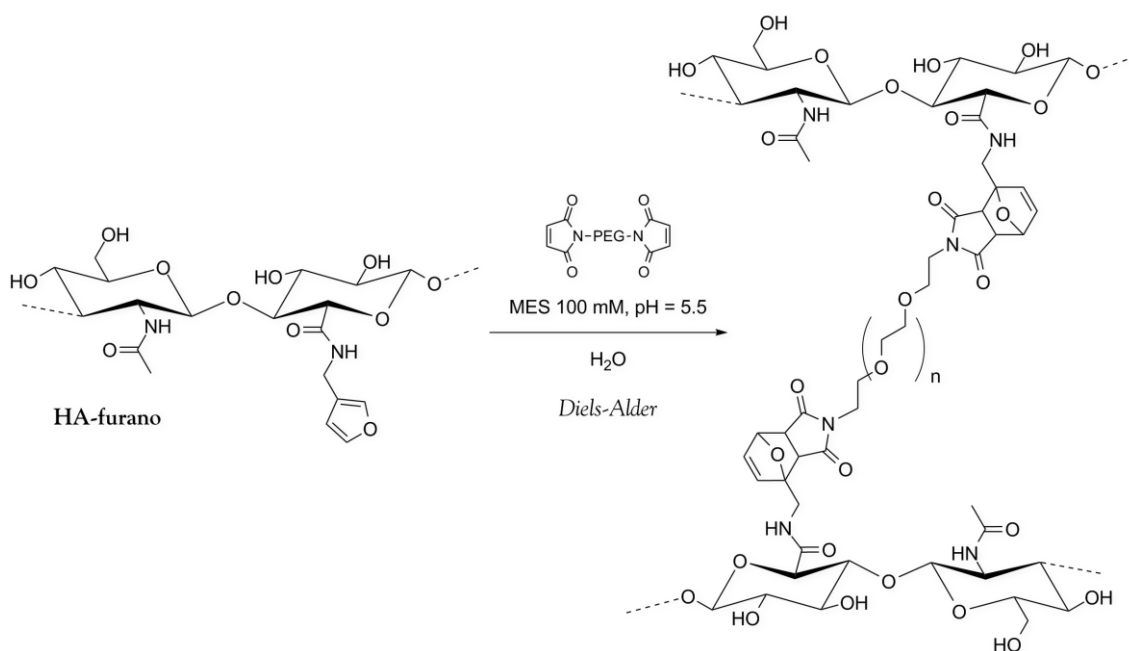
Di recente è stata invece sviluppata una tecnica di polimerizzazione *in situ* che prevede il *crosslinking* tra HA-ADH e PEG-dialdeide, un agente reticolante macromolecolare, in soluzione fisiologica.<sup>55</sup> Dopo evaporazione del solvente si riescono ad ottenere dei film di idrogel ialuronico biocompatibili e biodegradabili, con una resistenza meccanica ben definita. Questi nuovi idrogel consentono un rilascio più lento di farmaci macromolecolari, ed inoltre è stato dimostrato che accelerano la ri-epitelizzazione nella guarigione delle ferite.



**Schema 3.7:** Sintesi mediata da idrazidi.

### Reazione di Diels-Alder

Nel 2011 il gruppo di ricerca di Shoichet<sup>34</sup> ha messo a punto la sintesi per l'ottenimento di un derivato furanico dell'HA (vedi schema 3.8). Questo, in ambiente acquoso<sup>56</sup> e con l'aggiunta di PEG-dimalimide, reticola mediante una cicloadizione "click" di Diels-Alder [4+2] tra diene e dienofilo,<sup>37</sup> senza necessità di catalizzatori o fotoiniziatori potenzialmente citossici. Controllando il rapporto molare furano/maleimide si può inoltre agire sulle proprietà meccaniche e di degradazione dell'idrogel risultante.



Schema 3.8: Crosslinking dell'HA-furano.

### Polimerizzazione radicalica

Un'altra metodologia per la formazione di idrogel basati sull'acido ialuronico si basa sulla polimerizzazione radicalica. Le polimerizzazioni radicaliche vengono attualmente utilizzate a livello clinico per la formazione di biomateriali *in situ*, ad esempio come cementi ossei o riempitivi delle carie in applicazioni odontoiatriche.<sup>57</sup> Le polimerizzazioni radicaliche implicano la formazione di radicali a seguito dell'applicazione di una sorgente che agisca da iniziatore (*i.e.* luce, temperatura, redox, *etc.*), che reagisca con un gruppo reattivo dell'HA per creare reticolazione. È stato dimostrato che le polimerizzazioni radicaliche presentano numerosi vantaggi,<sup>58</sup> tra cui la possibilità di controllare la reazione e la capacità di reagire in soluzione acquosa.

Le polimerizzazioni indotte da radiazione elettromagnetica rappresentano l'esempio più comune di polimerizzazioni radicaliche utilizzate per la formazione di idrogel a base di acido ialuronico. La fotopolimerizzazione è di per sé molto vantaggiosa, dal momento che l'utilizzo della luce come iniziatore radicalico permette un controllo spaziale e temporale della reticolazione. Ad esempio il *crosslinking* degli idrogel può essere controllato spazialmente modulando il fascio luminoso incidente con dei laser o delle maschere, con l'ottenimento di idrogel avanzati e biomateriali complessi. Se le condizioni di iniziazione sono abbastanza tenui si può anche effettuare un incapsulamento cellulare diretto, in modo che la concentrazione radicalica o le intensità luminose non creino danni alla salute delle cellule.<sup>35d,59</sup>

I gruppi comuni più reattivi utilizzati nelle polimerizzazioni radicaliche sono gli acrilati e i metacrilati, dal momento che reagiscono molto rapidamente con i radicali.<sup>60</sup> La reazione più semplice e comunemente diffusa è quella tra HA e anidride metacrilica in condizioni basiche, per formare l'HA metacrilato (MeHA) la cui struttura è riportata in

figura 3.9 assieme a quelle di altri derivati radicalici.<sup>61</sup> Questa reazione venne usata la prima volta dal gruppo di ricerca di Grinstaff<sup>61</sup> e sebbene non fosse molto efficiente, era semplice e molto efficace. Questo gruppo di materiali venne impiegato subito come sigillante per le lacerazioni corneali, dando ottimi risultati.<sup>62</sup> Ovviamente il sistema MeHA può essere adottato per moltissime altre applicazioni, da struttura di supporto per la rigenerazione tissutale ai microdispositivi. Uno dei vantaggi degli idrogel formati a partire da MeHA è che le proprietà del reticolo che si forma possono essere modellate tramite modifica del PM dell'HA, del numero di gruppi reattivi, e della concentrazione dell'HA stesso.<sup>63</sup>

Un metodo alternativo prevede la reazione dell'HA con glicidil-metacrilato per formare coniugati denominati GMHA.<sup>64</sup> La fotopolimerizzazione di GMHA altamente modificati genera gel robusti fortemente reticolati, ma si possono ottenere altresì gel ed emulsioni viscoelastiche, così come microgel elastici da microsferi centrifugate.<sup>65</sup> In ogni caso la citocompatibilità è risultata buona, con un responso positivo per esposizione cellulare diretta.<sup>66</sup> Sono stati inoltre realizzati degli idrogel molto stabili da GMHA combinati con PEG acrilati e PEG-peptidi.<sup>67</sup> Allo stesso modo GMHA sono stati combinati con idrossietil-acrilato in un ampio intervallo di combinazioni per produrre idrogel a proprietà variabili.<sup>68</sup>

Sebbene le modifiche all'HA fin qui descritte permettano la fabbricazione di idrogel stabili e degradabili da enzimi, ci sono circostanze in cui serve un controllo ulteriore sul comportamento di degradazione del gel. In particolare, idrogel che non si degradano o si degradano molto lentamente possono limitare la migrazione cellulare e i contatti intercellulari, mentre un sistema a degradazione controllata può essere usato per il trasporto di molecole biologiche o per modellare alcune proprietà temporanee. Per soddisfare questi requisiti sono stati sintetizzati degli HA che formano idrogel degradabili sia tramite idrolisi dei gruppi esteri, sia per via enzimatica.<sup>69</sup> Questi sono stati ottenuti introducendo esteri idroliticamente degradabili (*i.e.* acido lattico o caprolattone, con formazione di MeLAHA MeCLHA rispettivamente) tra la struttura dell'HA e i gruppi fotoreattivi. La cinetica della degradazione degli idrogel e il rilascio molecolare sono stati controllati attraverso la densità di reticolazione dell'idrogel, la tipologia di unità degradabile e la copolimerizzazione con macromeri completamente degradabili per via enzimatica.

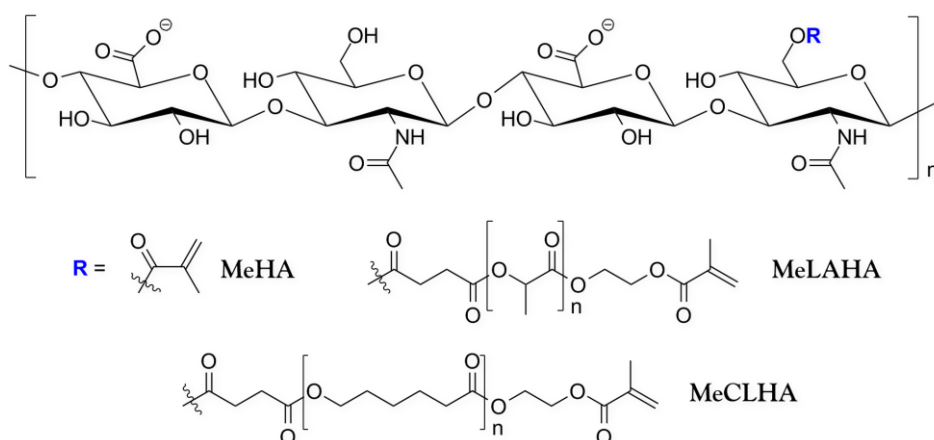


Figura 3.9: Strutture di HA fotopolimerizzabili.



### 3.1.4. Applicazioni

L'età media dell'uomo è in aumento, e con essa la percentuale della popolazione (oltre il 50%) che soffre di dolori osteoarticolari causati dal danneggiamento dei tessuti cartilaginei.<sup>70</sup> Negli adulti la cartilagine degradata ha infatti una capacità di auto-riparazione molto bassa, soprattutto per l'esigua quantità di condrociti presenti. Nell'ambito della riparazione cartilaginea si introducono perciò condrociti, o cellule staminali che possono differenziarsi in condrociti, nelle aree danneggiate dove occorre rigenerare il tessuto. La matrice che contiene tali cellule, inserita nel tessuto originario, deve resistere alla frizione e alle alte pressioni in maniera simile alle superfici cartilaginee originali.<sup>71</sup>

Un trattamento classico per la rigenerazione cartilaginea prevede il rilascio di cellule staminali mesenchimali dal midollo alla superficie ossea, per permeare la zona cartilaginea danneggiata. Qui le cellule staminali si differenziano mediante condrogenesi per accelerare la riparazione tessutale, nonostante si ottenga un tessuto fibrillare. Tecniche recenti invece prevedono la cultura *in vitro* di condrociti prelevati da una regione cartilaginea sana, e il trapianto nelle regioni danneggiate per promuovere la rigenerazione tessutale.<sup>72</sup>

Un nuovo e promettente approccio impiega invece matrici di supporto altamente sofisticate, progettate per richiamare cellule esistenti dai tessuti circostanti. Le cellule col tempo provocano la degradazione della struttura e il rilascio di molecole di *signaling* precedentemente inglobate nella matrice; queste stimolano così le cellule ad una rigenerazione tessutale più veloce ed efficiente.<sup>73</sup> Ad oggi l'ingegneria tessutale sfrutta sempre una combinazione di matrici supportanti, cellule e molecole di *signaling* per indurre la condrogenesi.<sup>74</sup> Le matrici di supporto vengono inserite, auto-assemblate o gelificate all'interno delle lesioni delle cartilagini, e devono essere quanto più bioadesive. Una struttura supportante ottimale dev'essere infatti biocompatibile, avere proprietà meccaniche e di permeazione simili a quelle della cartilagine sana<sup>75</sup> e una biodegradabilità non eccessiva, per non essere eliminata prematuramente dagli enzimi.<sup>76</sup>

Attualmente il mercato offre tipologie di strutture che fungono da supporto biomedico naturali, semi-naturali, e sintetiche. Queste sono state a lungo sperimentate per valutarne la biocompatibilità e la biodegradabilità sia *in vitro* sia *in vivo*.<sup>77</sup> L'acido ialuronico si presenta in quest'ambito come una molecola molto promettente come struttura di supporto adatta alla crescita cellulare.<sup>4</sup>

### 3.1.5. Cumarina

#### a) Chimica e classificazione<sup>78</sup>

La cumarina (5,6-benzo-2-pirone), lattone dell'acido cumarico, è un composto precursore benzopiranicolo isolato per la prima volta nel 1820 dai semi della *Dipteryx odorata*, una leguminosa tropicale del Sud America, nota anche come *Coumarona odorata* (fig. 3.10). A temperatura ambiente si presenta sotto forma di composto cristallino incolore, di odore gradevole, che fonde a 67 °C e bolle a 290 °C. I suoi derivati sono presenti nelle foglie, nei fiori, nei semi e nelle radici di più di settecento specie vegetali (tra cui *Imperatoria*, *Panace*, *Pastinaca*, *Trifoglio*, *Meliloto*, *Ippocastano*, *Pilosella*, *Bergamotto*, *etc.*). La struttura benzopiranicola tipica delle cumarine si può preparare tramite sintesi di Bertagnini-Perkin, che vede la reazione di aldeide salicilica con anidride acetica e acetato sodico. Essa deriva dallo scheletro fenilacrilico dell'acido cinnamico, che subisce orto-idrossilazione, isomerizzazione *trans-cis* del doppio legame della catena laterale, con successiva ciclizzazione e formazione del lattone.

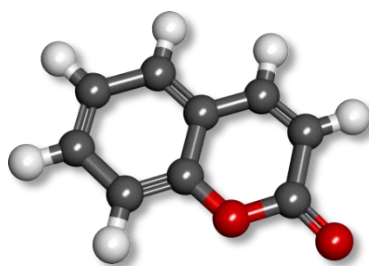
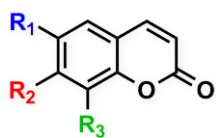


Figura 3.10: Struttura molecolare della cumarina.

In ambito industriale le cumarine trovano impiego come aromatizzanti nella produzione dei profumi e del tabacco, ma la loro grande eterogeneità strutturale si riflette soprattutto in un altrettanto ampia variabilità farmacologico-terapeutica. I cumarino-derivati possono dimostrare infatti un'azione antinfiammatoria, analgesica, flebotonica, antiflogistica, antibatterica, antivirale,<sup>79</sup> antiossidante,<sup>80</sup> antitumorale<sup>81</sup> e anticoagulante (per le cumarine idrossilate in posizione 4, somministrate per via endovenosa).<sup>82</sup>



Nucleo cumarinico

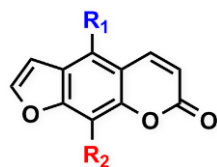
Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Umbelliferone	H	OH	H
Erniarina	H	OCH <sub>3</sub>	H
Esculetina	OH	OH	H
Scopoletina	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Fraxetina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH

Tabella 3.1: Derivati della cumarina.

In base alla loro struttura chimica, le cumarine si possono classificare in quattro gruppi: cumarine semplici, idrossi-cumarine, furano-cumarine e pirano-cumarine. Alla prima categoria appartiene essenzialmente la cumarina che viene estratta dai fiori del meliloto (*Melilotus officinalis*), a proprietà flebotoniche e antiedematose.<sup>83</sup>

Tra le idrossicumarine invece, che possono essere anche metossilate, si possono ricordare l'umbelliferone, il cumarolo, l'esculetina e la scopoletina. L'umbelliferone si trova nelle parti aeree della Pilocella (*Hieracium pilosella*) e nelle resine prodotte da molte *Umbelliferae*. Composto a potente azione antibiotica,<sup>84</sup> assorbe le radiazioni UV al di sotto dei 315 nm e viene utilizzato perciò per la realizzazione di filtri solari. L'esculetina è invece l'aglicone dell'esculina, un glucoside presente nella corteccia e nelle foglie dell'Ippocastano (*Aesculus hippocastanum*). È una sostanza antinfiammatoria, batteriostatica e antifungina, utilizzata assieme alla scopoletina (derivata dalla corteccia del *Viburnum prunifolium* e del *Viburnum opulus*) come spasmolitica per curare ipertensione e dismenorrea. Ha inoltre un'azione astringente, vasocostrittrice e flebotonica (diminuisce la permeabilità dei capillari e ne aumenta la resistenza),<sup>83</sup> e come l'umbelliferone viene utilizzata nella produzione di filtri solari.

Le furano-cumarine<sup>85</sup> possiedono un anello furanico condensato con il nucleo della cumarina. La presenza di un esteso sistema di doppi legami coniugati rende questi derivati in grado di esaltare l'azione cutanea dei raggi solari, in particolare dei raggi UV, con conseguente azione fotosensibilizzante. Questi effetti sono propri delle 6,7-furano-cumarine, mentre non si riscontrano nelle 7,8-furano-cumarine, a causa di una minore estensione del sistema coniugato di elettroni  $\pi$  nel gruppo cromoforo. Pertanto, farmaci contenenti elevate percentuali di furano-cumarine sono controindicati in caso di esposizione prolungata alla luce solare, per il rischio di ustioni e melanomi. Esempi di 6,7-furano-cumarine sono lo psoralene e i suoi derivati, il bergaptene, l'imperatorina e la xantotossina.<sup>86</sup>



Nucleo psoralenico

Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Psoralene	H	H
Bergaptene	OCH <sub>3</sub>	H
Xantotossina	H	OCH <sub>3</sub>
Imperatorina	H	CH <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Tabella 3.2: Derivati dello psoralene.

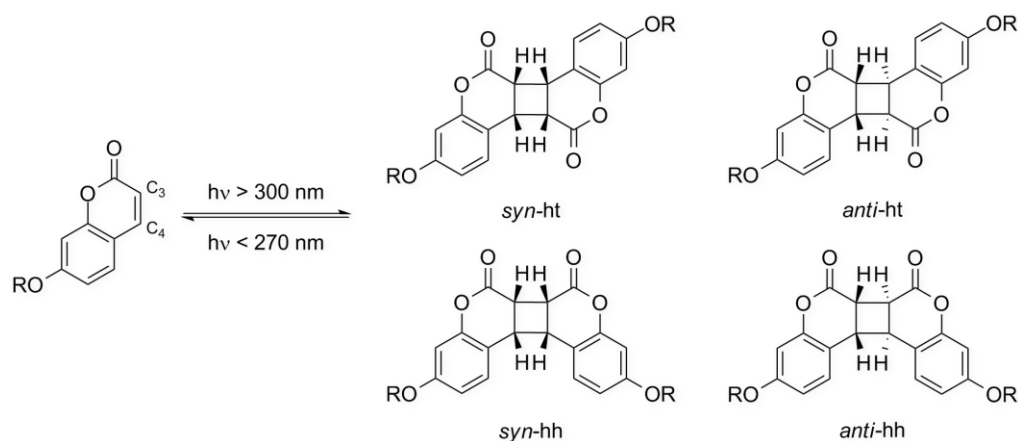
Il bergaptene si trova in elevata percentuale nell'olio essenziale di agrumi come il Bergamotto, il Pompelmo e l'Arancio amaro. Altre fonti naturali di psoraleni sono i frutti dell'Ammi (*Ammi majus*), ricchi di bergaptene, imperatorina e xantotossina, ed il lattice prodotto dalle foglie del *Ficus carica*, ricco di bergaptene e psoralene. Gli psoraleni vengono utilizzati nella terapia fotodinamica, che consiste nell'esposizione a radiazioni UVA (320-400 nm) in seguito ad applicazione di preparazioni a base di psoraleni ad azione fotosensibilizzante. Questa tecnica viene utilizzata nella vitiligine per stimolare la pigmentazione cutanea e, in misura minore, nella psoriasi, nell'alopecia aerata e nella micosi fungoide con alterazioni del sistema immunitario.

Le pirano-cumarine possiedono un anello piranico condensato con il nucleo della cumarina. Come le furano-cumarine, inducono fotosensibilizzazione e possiedono spesso azione antinfiammatoria e spasmolitica.

## b) Fotoreattività

Nel 1902 Ciamician e Silber<sup>87</sup> dimostrarono per la prima volta la reazione di fotodimerizzazione reversibile di due molecole di cumarina con formazione di un anello ciclobutanico, risultato dalla cicloaddizione  $[2\pi + 2\pi]$ . Da allora, la cumarina e i suoi derivati 7-alcossilici sono stati ampiamente studiati per le loro proprietà fotochimiche caratteristiche.<sup>87,88</sup>

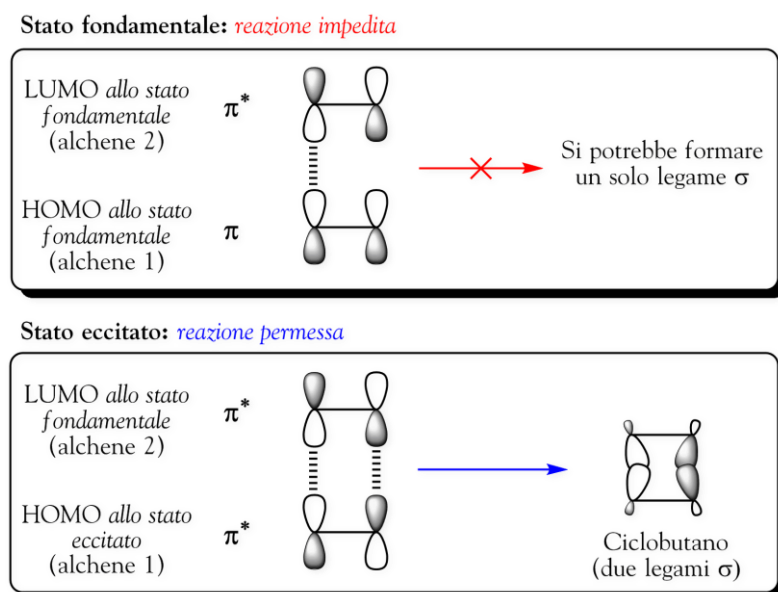
A fianco a numerosissimi studi effettuati in soluzioni omogenee<sup>88d,89</sup> esistono pubblicazioni sul comportamento chimico di cristalli allo stato solido<sup>88m-1,90</sup> e di matrici polimeriche in forma di film sottile.<sup>91</sup> La cumarina e i suoi derivati 7-alcossilici, se irradiati con una radiazione elettromagnetica a lunghezza d'onda maggiore di 300 nm, sono in grado di dimerizzare in maniera reversibile in quattro possibili stereoisomeri: *syn* o *anti* testa-testa (hh) e *syn* o *anti* testa-coda (ht) (vedi schema 3.9).<sup>92</sup> Utilizzando in seguito una lunghezza d'onda inferiore a 270 nm<sup>93</sup> si può indurre la rottura fotochimica dei legami covalenti appena formati,<sup>94</sup> con ripristino delle molecole monomeriche di partenza. Da qui, la possibilità di modulare queste reazioni opposte tramite uno stimolo esterno permette l'accesso a due architetture molecolari elettronicamente e strutturalmente molto diverse.<sup>92b</sup>



**Schema 3.9:** Fotodimerizzazione e rottura fotochimica di cumarino-derivati.

La cicloaddizione  $[2\pi + 2\pi]$  è una reazione fotochimica concertata che avviene tra orbitali di frontiera ad energia molto simile. Essendo una reazione che non coinvolge un numero "Huckel" di elettroni ( $4n+2$ ), essa non può essere indotta da semplice riscaldamento ed avvenire tra HOMO (*highest occupied molecular orbital* – OM di legame,  $\pi$ ) e LUMO (*lower unoccupied molecular orbital* – OM di antilegame,  $\pi^*$ ) tra molecole allo stato fondamentale, ma necessita di una radiazione elettromagnetica che consenta il passaggio allo stato eccitato. Nello specifico la cicloaddizione avverrà tra una molecola di cumarina allo stato eccitato ed un'altra allo stato fondamentale. Si tratta di una reazione che non richiede né produce altre specie chimiche, e comporta la rottura di due legami  $\pi$  a favore di due nuovi legami  $\sigma$  più stabili. Per questo motivo, se si vuole rompere la struttura ciclobutanica di neo-formazione per ottenere le molecole di partenza, occorre fornire una radiazione elettromagnetica ad energia maggiore ( $\lambda < 270 \text{ nm}$ ). Il vantaggio dato da questo sistema risiede sul fatto che,

utilizzando una radiazione elettromagnetica avente  $\lambda > 300$  nm, si fornisce un quantitativo di energia tale da promuovere solamente gli elettroni del doppio legame  $\pi$ , lasciando inalterata la struttura ciclobutanica che viene a crearsi.



**Figura 3.11:** Fotoreattività di due legami  $\pi$  allo stato fondamentale e allo stato eccitato.

In passato sono stati studiati sistemi a base cumarinica per la realizzazione di *self-assembled monolayers* (SAMs): il concetto di SAMs con un gruppo di testa specifico è un'idea sofisticata per progettare superfici funzionalizzate a livello molecolare. Nel 1997 il gruppo di ricerca di Fox riportò la sintesi di cumarine modificate con gruppi tiolici, capaci di formare SAMs su superfici d'oro.<sup>95</sup> Oltre alla formazione di questi *monolayer* su superfici d'oro, i sistemi più ampiamente studiati sono quelli delle SAMs di alchilsilani funzionalizzati su superfici di silicio.<sup>96</sup> Nel 2001 il gruppo di ricerca di Fang<sup>97</sup> presentò la sintesi e la fotodimerizzazione di SAMs a base di 7-(8-trimetossisililottilossi)cumarina e la loro abilità di allineare cristalli liquidi nematici. Nel 2010 il gruppo di ricerca di Hampp<sup>92a</sup> studiò il comportamento di SAMs formati da 7-(11-triclorosililundecilossi)cumarina su vetri di mica e quarzo, dimostrando tramite spettroscopia di assorbimento UV e di fluorescenza che la cicloaddizione fotochimica dei residui cumarinici era completamente reversibile, anche in atmosfera non inerte, utilizzando radiazioni a lunghezza d'onda pari a 355 e 254 nm.

Sempre nel 2010, il gruppo di ricerca di Kuroda<sup>98</sup> sintetizzò un nuovo derivato cumarinico, la 7-(10-trietossisilil)decossicumarina, contenente un gruppo alchilico a catena lunga assieme ad un gruppo trietossisililico. Si dimostrò che film ibridi lamellari mesostrutturati presentano una velocità e una resa di dimerizzazione dei residui cumarinici maggiori rispetto a quelle di film ibridi disordinati o di sistemi in soluzione. Con un arrangiamento controllato dei gruppi cromofori si ha una dimerizzazione più efficiente perché essa avviene quando i legami C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> dei cromofori sono disposti parallelamente ad una distanza inferiore di 0.42 nm.<sup>99</sup> Per derivati cumarinici sostituiti in posizione 7, il dimero si può formare anche se tra i legami c'è una rotazione fino a 65°. Nel 2007 invece il gruppo di ricerca di Aida<sup>90c</sup> sviluppò una struttura *esa-peri-esabenzocorononica* con pendagli cumarinici

in grado di auto-assemblarsi per formare nanotubi grafatici. In questo caso la dimerizzazione procedeva allo stato solido fino all'80% in 10', ed ugualmente in una sospensione alcolica di nanotubi (0.1 mg in 10 mL), venendo monitorata tramite FT-IR.

Lo spettro di assorbimento UV caratteristico della cumarina e dei suoi derivati presenta due bande di assorbimento specifiche.<sup>92a</sup> Una transizione  $\pi-\pi^*$  tra i 250 e i 300 nm attribuibile agli elettroni del sistema  $\pi$  coniugato,<sup>100</sup> ed una transizione  $n-\pi^*$  tra i 310 e i 340 nm associata agli elettroni del gruppo carbonilico. Durante la dimerizzazione si hanno cambiamenti spettrali evidenti:<sup>94c,99,101</sup> la lunghezza del sistema  $\pi$  coniugato diminuisce, con conseguente scomparsa della banda di assorbimento tra 310 e 340 nm e una diminuzione d'intensità della banda di assorbimento tra 250 e 300 nm. Inoltre nello spettro di emissione di fluorescenza si ha la scomparsa del picco a  $\lambda=399$  nm, dovuto alla presenza dei gruppi cumarinici.

### 3.2. Scopo della tesi

Negli ultimi anni la ricerca per nuovi materiali biocompatibili e biodegradabili si è concentrata sulla creazione di serie innovative di polimeri naturali modificati.<sup>4</sup> In particolare, alcune classi di materiali basate su differenti tipologie di derivati dell'acido ialuronico (HA) sembrano essere molto promettenti in un ampio intervallo di applicazioni cliniche, grazie alle loro molteplici proprietà biologiche. Nello specifico, l'impiego di biopolimeri che subiscano un'alterazione delle proprie caratteristiche meccaniche una volta impiantati nel sito d'azione, passando *i.e.* da soluzioni poco viscosi a gel tridimensionali, trova sempre più ampio impiego nel rilascio controllato di farmaci<sup>41</sup> ma soprattutto nella medicina rigenerativa. Si pensi ad esempio alla ricostruzione di parti di osso, cartilagine e muscoli, tramite l'utilizzo di derivati opportunamente modificati dell'acido ialuronico (Par. 3.1). Sistemi di *gel-forming in situ* rappresentano una tematica molto interessante per moltissime applicazioni biomediche, perché permettono di ottenere forme complesse che aderiscono perfettamente alle strutture tessutali, cartilaginee o ossee.<sup>41</sup>

L'obiettivo di questo capitolo di tesi, nato da una collaborazione tra l'Università Ca' Foscari Venezia e la Fidia Farmaceutici S.p.A. di Abano Terme, azienda leader nella produzione di derivati dell'acido ialuronico, consiste nella creazione di un prototipo dell'HA allo stato liquido, che origini un idrogel "parete-parete" quando sottoposto ad uno stimolo chimico-fisico esterno. In passato sono stati realizzati vari sistemi del genere, per cui la polimerizzazione avveniva tramite innalzamenti di pH (CAP, PAA, PMMA), introduzione di ioni di carica opposta rispetto alle cariche del polimero (*i.e.* Gelrite<sup>®</sup> polimerizza con Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, mentre l'alginate di sodio con Ca<sup>2+</sup>), variazioni di temperatura (l'agarosio gelifica per T<55-60 °C, PNIPAAm gelifica per T>37 °C, microgel di poli(vinil alcol)/poli(metacrilato)-co-N-isopropil acrilammide gelificano a 37 °C e pertanto sono adatti per il rilascio controllato di farmaci quali doxorubicina)<sup>102</sup> o *crosslinking* covalente come visto nella parte introduttiva. La nostra idea consiste invece nel funzionalizzare l'acido ialuronico con dei residui cumarinici, per poter indurre mediante irraggiamento ultravioletto un *crosslinking* inter- molecolare, generato dalla cicloaddizione fotochimica [2π+2π] tra unità cumariniche adiacenti.

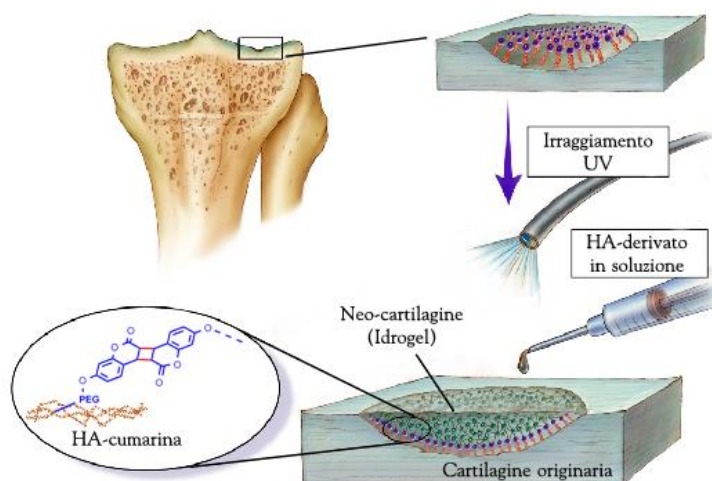
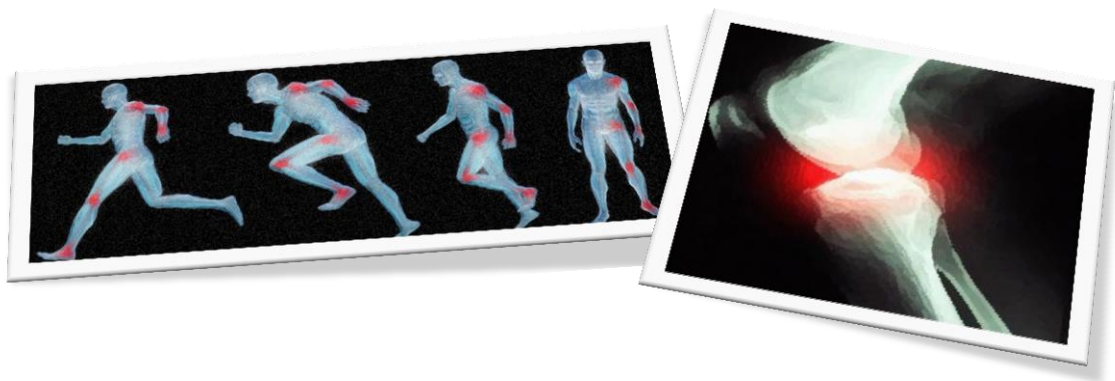


Figura 3.12: Formazione di un idrogel "parete-parete" a seguito di irraggiamento UV.

In altre parole s'intende progettare un biopolimero che possa essere iniettato in forma liquida (*medium* acquoso) all'interno delle cavità cartilaginee, e che assuma uno stato fisico di idrogel *in situ* mediante irraggiamento ultravioletto esterno, ma con un *crosslinking* che non necessiti di catalizzatori o fotoiniziatori, evitando così a priori un possibile aumento della citotossicità del sistema.<sup>34,60b,103</sup> Il sistema iniziale dev'essere liquido sia per poter riempire perfettamente le cavità, assumendone la stessa forma, sia per la possibilità di mescolamento con materia cellulare prima dell'iniezione e della reticolazione.

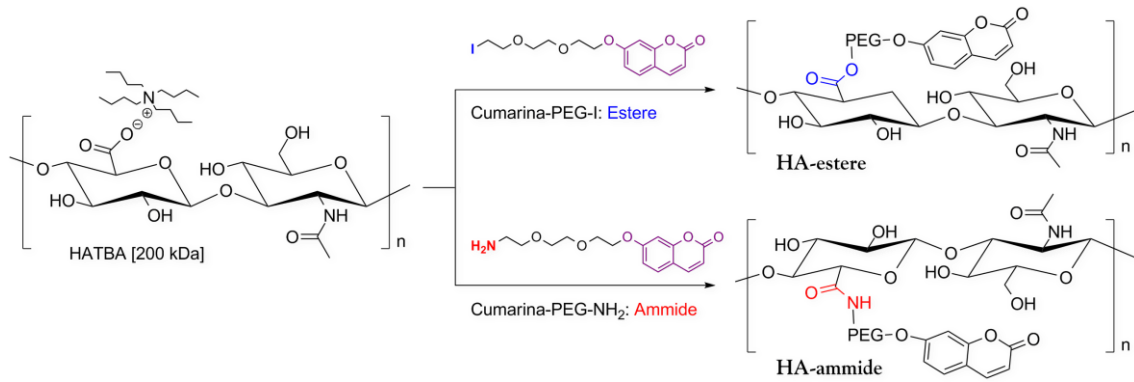
Il prototipo che si vuole realizzare dovrebbe essere utilizzato in ambito ortopedico, per la rigenerazione di microfratture cartilaginee, subcondrali, ossee o meniscali. Gli idrogel che si originano, oltre a soddisfare il requisito fisico (gel 3D "parete-parete"), devono risultare compatibili con i tessuti biologici e favorire la proliferazione cellulare, rappresentando una vera e propria struttura di supporto per la ricostruzione tissutale. Tra le molte tecniche considerate interessanti (*gel forming* attraverso *crosslinking* o mediante legami covalenti), si è scelta la via fotochimica perché non prevede l'impiego di sostanze addizionali per indurre la reticolazione dell'acido ialuronico. Ad ogni modo, la chimica alla base di queste reazioni dovrebbe risultare efficace (in termini di capacità di reticolazione con formazione di idrogel), sicura e accessibile (in considerazione dell'impiego), e possibilmente semplice da realizzare in una prospettiva di industrializzazione del processo.





### 3.3. Sintesi

Di seguito si riporta lo schema di sintesi generico che s'intende affrontare per ottenere dei derivati dell'HA funzionalizzati con il residuo cumarinico. Il progetto consiste nel creare delle formulazioni acquose con tali derivati (esteri e ammidi dell'HA), che possano originare idrogel "parete-parete" quando sottoposte ad una radiazione ultravioletta.



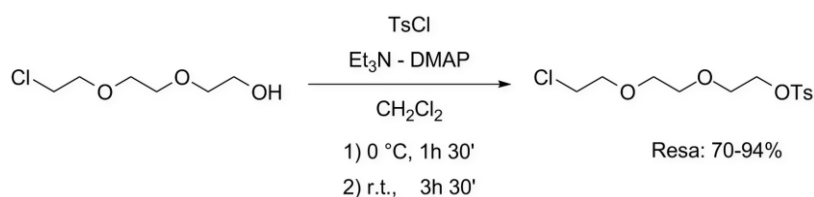
Schema 3.10: Strategia di sintesi per ottenere derivati HA-cumarina.

### 3.3.1. Linker

Dallo schema 3.10 appare evidente come il gruppo cumarinico venga legato ad un *linker*, la cui funzione principale è favorire l'incontro tra i gruppi cumarinici a livello intermolecolare per facilitarne la cicloaddizione fotochimica. Si utilizza un PEG a sei atomi di carbonio, struttura altamente compatibile con solventi acquosi e organici, affinché risulti utile per le reazioni di esterificazione, ma soprattutto per quelle di ammidazione. Le ammidi dell'HA sono infatti molto stabili, ma di contro presentano un'idrosolubilità inferiore rispetto agli esteri: la presenza di una catena PEG idrosolubile permette allora di coniugare la stabilità con l'idrosolubilità necessaria per realizzare soluzioni in *medium* acquosi. Catene di tipo PEG vengono spesso incluse negli idrogel a base di acido ialuronico per variarne le proprietà meccaniche, ma anche la dimensione dei pori all'interno della struttura molecolare.<sup>34,104</sup> Le due strategie di sintesi sono state prese in considerazione per motivi precisi. La reazione di esterificazione *one-step* risulta un processo più semplice rispetto all'ammidazione, che richiede uno *step* in più per l'attivazione dell'HA (vedi Par. 3.3.5). D'altro canto le ammidi dell'HA potrebbero portare a prodotti con un tempo di permanenza *in vivo* maggiore rispetto agli esteri. L'obiettivo finale del presente progetto sarà trovare il giusto compromesso fra fattibilità di sintesi, ottenimento di prodotti aventi le caratteristiche desiderate (gelificazione per via fotochimica), con una buona biodegradabilità per l'uso cui sono destinati.

#### a) Cumarina-PEG-I

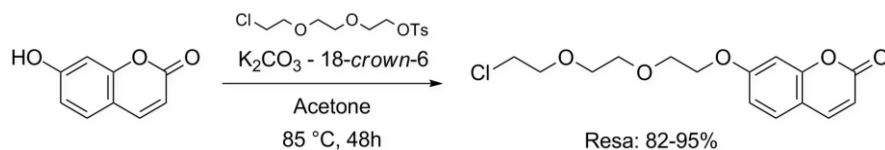
Nello schema di sintesi sottostante vengono riportati i primi passaggi sintetici affrontati per l'ottenimento del primo *linker* bifunzionale, da sfruttare per reazioni di esterificazione dell'acido ialuronico. Inizialmente l'ossidrile del *linker* viene tosilato, per avere un buon gruppo uscente nella reazione successiva. La tosilazione,<sup>105</sup> che avviene in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro in atmosfera inerte, a 0 °C per 1h 30' quindi a temperatura ambiente per 3h 30', porta all'ottenimento del prodotto desiderato sotto forma di olio giallino trasparente, che non necessita di ulteriore purificazione. Le condizioni di reazione vengono ottimizzate fino ad ottenere una resa pari al 94%.



Schema 3.11: Sintesi linker tosilato.

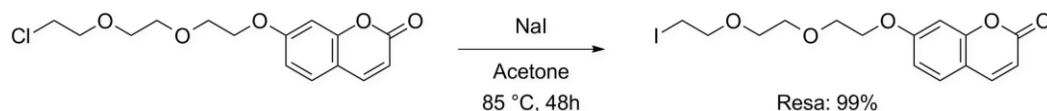
Il passaggio successivo consiste nel legare il residuo cumarinico al *linker* tosilato partendo dall'umbelliferone (7-idrossicumarina), reagente poco costoso e facilmente reperibile in commercio. La reazione<sup>90c</sup> procede in acetone a refluxo, utilizzando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come base e 18-crown-6 in quantità catalitica, e prevede l'aggiunta di aliquote successive di umbelliferone (in eccesso rispetto alla quantità stechiometrica) per consumare completamente il *linker* tosilato fino a raggiungere una resa quantitativa. La rimozione del solvente, a seguito di

filtrazione su imbuto Gooch e celite, porta all'ottenimento del prodotto desiderato sotto forma di cristalli bianchi che non necessitano di ulteriore purificazione.



**Schema 3.12:** Sintesi linker cumarino-PEG-clorurato.

Il terzo ed ultimo passaggio per la sintesi del *linker* prevede la sostituzione dell'atomo di Cl con un atomo di I attraverso una sostituzione nucleofila  $S_N2$  di *Finkelstein*, semplice e veloce,<sup>90c,106</sup> per ottenere un derivato iodurato che reagisca in condizioni blande con l'HA nell'esterificazione. Lo scambio dell'alogenuro, reazione d'equilibrio, viene spostata verso la formazione dell'alchil-ioduro grazie all'alta insolubilità del NaCl in acetone. Al termine della reazione la miscela viene filtrata su imbuto Gooch e celite, con ottenimento del prodotto desiderato sotto forma di bianchi cristalli che non necessitano di ulteriore purificazione.

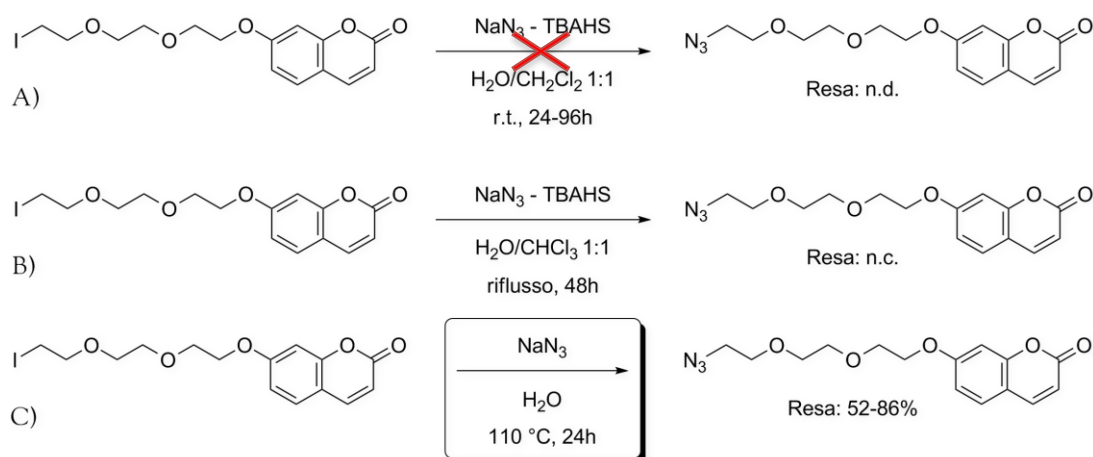


**Schema 3.13:** Sintesi linker cumarino-PEG-iodurato.

La reazione viene ripetuta più volte perché, come si vedrà a breve, il *linker* cumarino-PEG-iodurato rappresenta un prodotto utilizzato per più percorsi sintetici: sia come agente funzionalizzante per la reazione di esterificazione, sia come precursore per la sintesi del *linker* cumarino-PEG-ammina. Si è scelto di sintetizzare un *linker* con un alogenuro proprio perché facilmente sostituibile con un gruppo amminico.<sup>107</sup> La reazione di *Finkelstein* viene scalata quindi fino a 37.8 g di substrato iniziale, ottenendo il prodotto desiderato con una resa del 71% a seguito di FC, utilizzando miscele eluenti di Cy-Hex/AcOEt in rapporti variabili a seconda delle dimensioni della colonna e della quantità di prodotto da cromatografare.

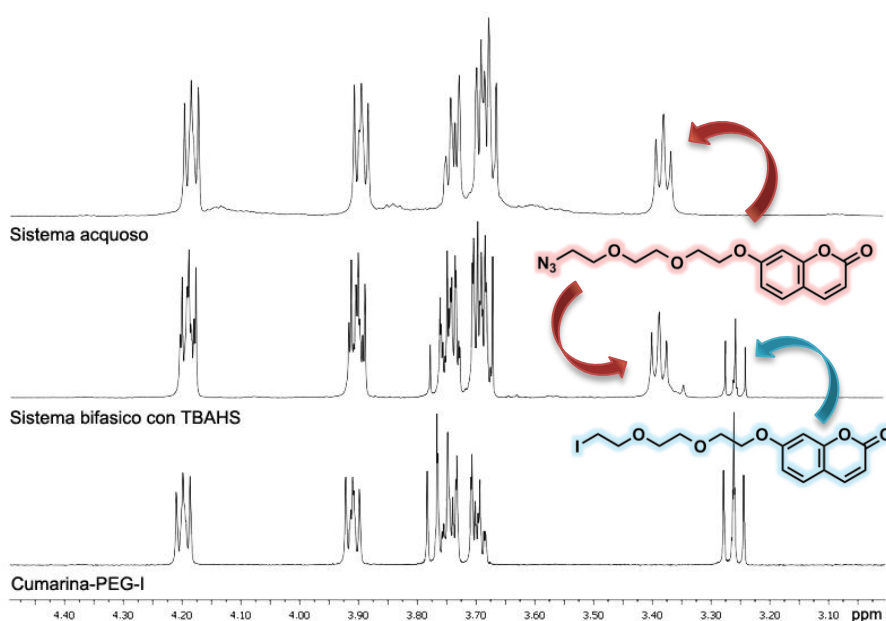
#### b) *Cumarina-PEG-NH<sub>2</sub>*

Il percorso di sintesi per l'ottenimento del *linker* cumarina-PEG-NH<sub>2</sub> da utilizzare in reazioni di amidazione dell'HA prevede la sostituzione dello ioduro del *linker* cumarina-PEG-I con un gruppo azidico, e la successiva riduzione ad ammina. Di seguito vengono riportati i tentativi di sintesi affrontati per l'introduzione dell'azide (schema 3.14).



**Schema 3.14:** Tentativi di sintesi del linker cumarino-PEG-azide.

L'utilizzo di un sistema bifasico  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1 a temperatura ambiente con TBAHS come trasferitore di fase (caso A), non ha portato all'ottenimento del prodotto desiderato neppure prolungando molto i tempi di reazione rispetto alle fonti di letteratura.<sup>108</sup> La reazione è stata pertanto provata a temperatura maggiore (caso B) sia in un sistema bifasico analogo ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$  1:1), sia in un sistema interamente acquoso<sup>109</sup> (caso C). In quest'ultimo caso la reazione va a completamento in meno di 24h, mentre utilizzando il sistema bifasico la reazione procede in maniera più lenta.



**Figura 3.13:** Spettri  $^1\text{H}$  NMR relativi ai tentativi di sintesi del linker cumarino-PEG-azide.

Da un confronto degli spettri  $^1\text{H}$  NMR relativi ai grezzi di reazione dopo 20h (fig. 3.13) appare evidente come nel sistema bifasico con TBAHS permanga una notevole quantità di linker cumarino-PEG-ioduro, mentre nel sistema acquoso si abbia l'esclusiva presenza del segnale relativo ai protoni del carbonio azidico. Come condizioni definitive per l'inserimento dell'azide si scelgono pertanto quelle relative al caso illustrato nello schema 3.13 C: la reazione viene monitorata tramite TLC, e porta all'ottenimento del prodotto

desiderato sotto forma di olio semitrasparente (solido bianco se raffreddato a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a seguito di FC (miscela eluente Cy-Hex/AcOEt 3:1). Le condizioni di reazione e di purificazione del grezzo vengono migliorate fino a raggiungere una resa dell'86% in appena 4h di reazione. Per avere conferma analitica sulla formazione dell'azide si effettua un'analisi di spettroscopia IR allo stato liquido (fig. 3.14):<sup>109b,110</sup> risulta evidente il segnale di *stretching* asimmetrico tipico delle azidi a  $2101\text{ cm}^{-1}$  così come la presenza di segnali attribuibili allo *stretching* simmetrico (tra  $1343$  e  $1177\text{ cm}^{-1}$ ).

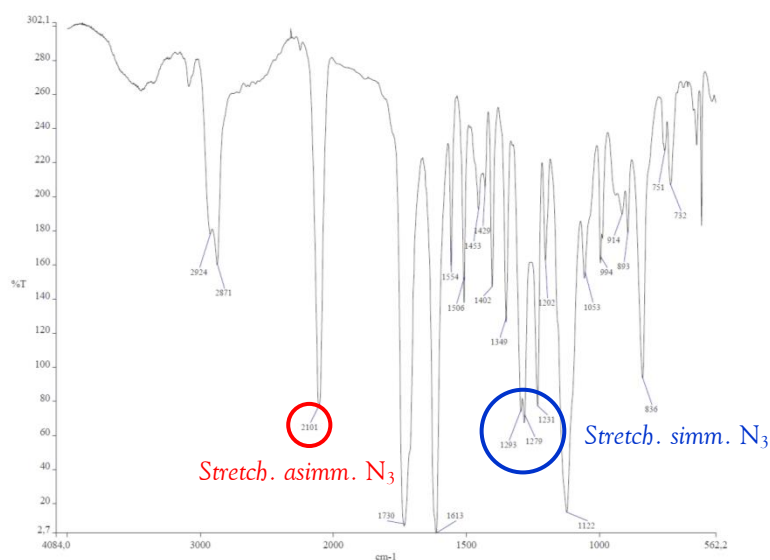
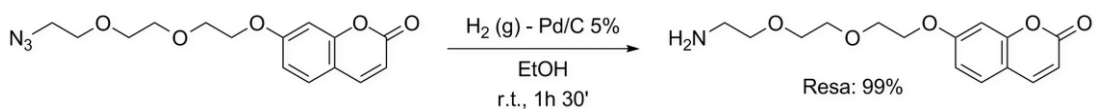


Figura 3.14: Spettro FT-IR del linker cumarino-PEG-azide.

La riduzione dell'azide ad ammina, ultimo passaggio sintetico per l'ottenimento del linker da utilizzare per le reazioni di amidazione, viene inizialmente tentata con  $\text{SnCl}_2$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$  a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,<sup>111</sup> ma senza portare al risultato sperato. Tentativi di riduzione con  $\text{PPh}_3$  in un sistema bifasico  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ <sup>112</sup> vengono invece tralasciati per problematiche di purificazione: l'estrazione acida non permette una sufficiente purificazione del prodotto, mentre prove di separazione cromatografica su  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a  $\text{pH}\approx 9-10$  risultano difficoltose e provocano un'ingente perdita di materiale. La soluzione potrebbe consistere nell'utilizzo di  $\text{PPh}_3$  supportata su polimero (200-400 mesh),<sup>113</sup> ma viene scartata a priori per i costi troppo elevati con conseguente impossibilità di industrializzazione del processo.

A seguito di un accurato esame di tutte le fonti disponibili della letteratura, si decide di intraprendere una riduzione catalitica classica con idrogeno gassoso e  $\text{Pd/C}$ ,<sup>114</sup> inizialmente scartata perché molto probabilmente avrebbe interessato anche il ciclo  $\alpha$ - $\beta$  insaturo della cumarina. La reazione procede invece in  $\text{EtOH}$  a temperatura ambiente in 1h 30' (vedi spettro  $^1\text{H NMR}$  in figura 3.15), portando al composto desiderato (olio trasparente giallino) con resa quantitativa e senza necessità di ulteriore purificazione.



Schema 3.15: Sintesi del linker cumarino-PEG-ammina.

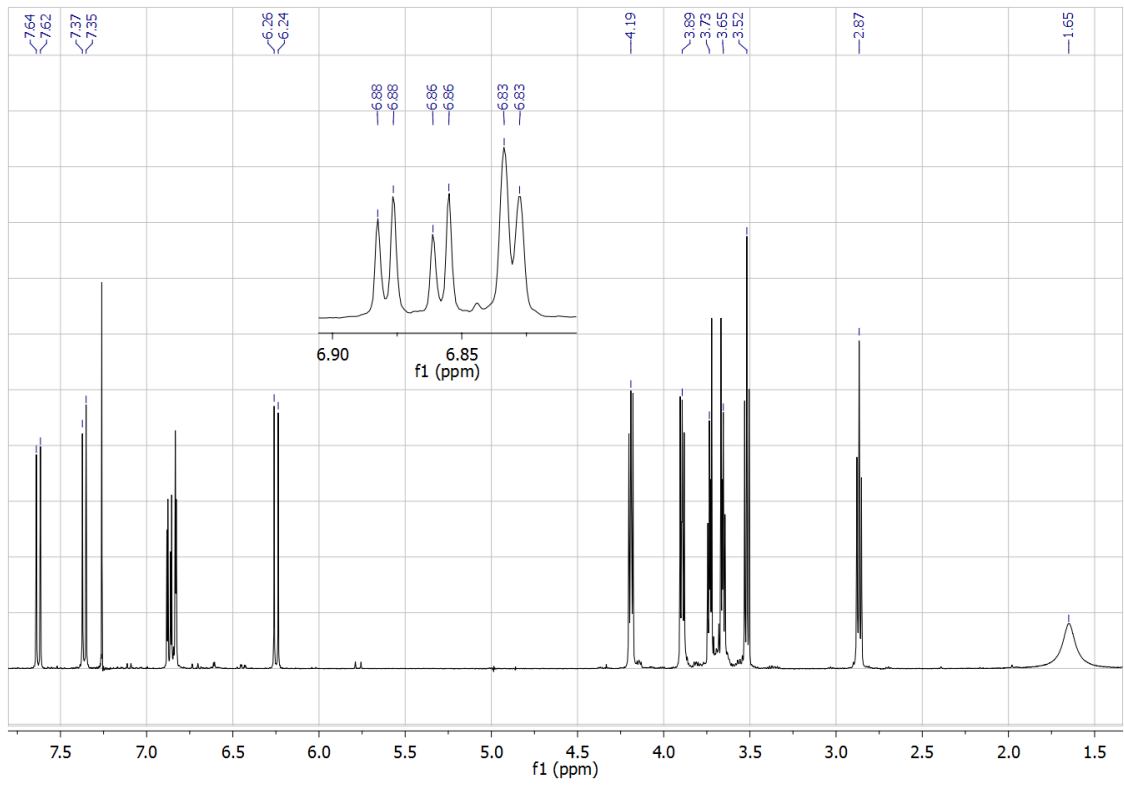
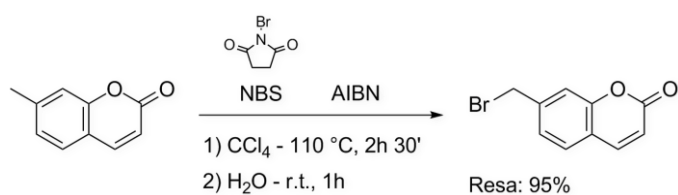


Figura 3.15: Spettro  $^1\text{H}$  NMR del linker cumarino-PEG-ammina.

### 3.3.2. 7-(bromometil)-cumarina

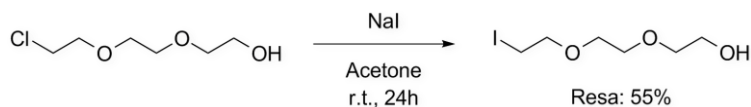
Per valutare l'effettiva utilità della catena PEG come *linker* idrofilico tra la struttura dell'acido ialuronico e il residuo cumarinico nella fase di preparazione degli idrogel, nonché nella reticolazione indotta da raggi UV, s'intende sintetizzare un derivato dell'HA con un residuo cumarinico sprovvisto di PEG. L'unità utile per la funzionalizzazione diretta dell'HA si ottiene bromurando la 7-(metil)-cumarina,<sup>115</sup> prodotto facilmente reperibile in commercio. La reazione procede in CCl<sub>4</sub> utilizzando *N*-bromosuccinimide come agente bromurante e AIBN (azobis-isobutirronitrile) come iniziatore radicalico. Il prodotto, che si ottiene a seguito di filtrazione su Gooch e rimozione del solvente a bassa pressione con resa pressoché quantitativa, non necessita di ulteriore purificazione e si presenta sotto forma di solido polverulento giallino.



**Schema 3.16:** Sintesi 7-(bromometil)-cumarina.

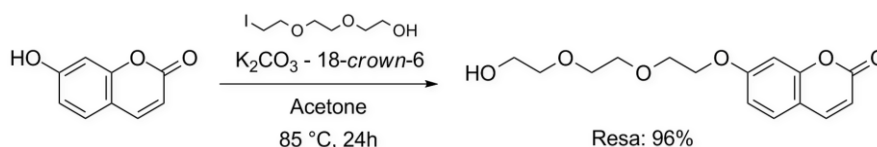
### 3.3.3. 7-(idrossi)-PEG-cumarina

Per avere uno standard da utilizzare in misure HPLC (vedi par. 3.5) si sintetizza un *linker* analogo, terminante con una funzionalità ossidrilica anziché con un alogeno. Il primo passaggio di sintesi prevede la sostituzione dell'atomo di Cl del *linker* bifunzionale iniziale con un atomo di I tramite una sostituzione nucleofila  $SN_2$  di *Finkelstein*.<sup>90c,106</sup> La reazione procede in acetone a temperatura ambiente in 24h, utilizzando NaI come agente iodurante. Il prodotto, ottenuto con una resa del 55%, si presenta sotto forma di liquido giallino.



**Schema 3.17:** Sintesi 2-(2-(2-iodoetossi)etossi)etanolo.

Il secondo *step* prevede l'introduzione del residuo cumarinico utilizzando umbelliferone in acetone a refluxo. Si utilizza  $K_2CO_3$  come base e 18-crown-6 come agente metallo-coordinante. Il prodotto viene ottenuto con resa pressoché quantitativa, e si presenta sotto forma di solido viscoso di colore giallo.

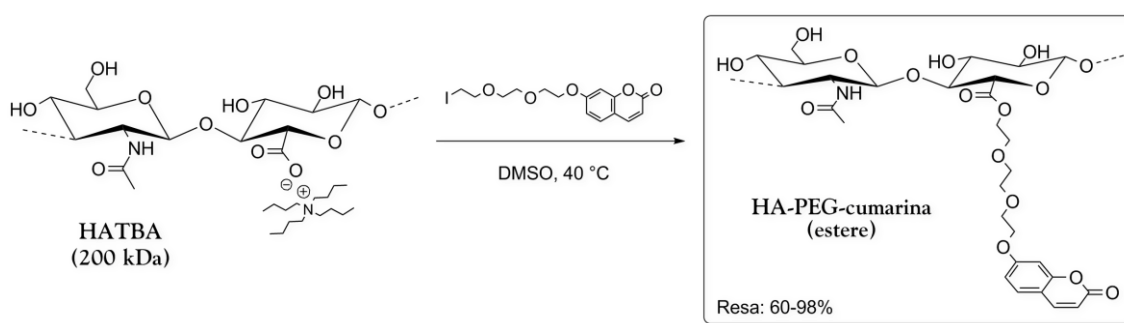


**Schema 3.18:** Sintesi 7-(idrossi)-PEG-cumarina.



### 3.3.4. HA-PEG-cumarina (estere)

Di seguito si riporta lo schema di sintesi generico (schema 3.19) per l'ottenimento del derivato cumarinico dell'HA mediante esterificazione, partendo dal sale di tetrabutilammonio (HATBA) solubile in DMSO, DMF e NMP, seguendo una procedura di esterificazione generica già messa a punto nei laboratori di Fidia Farmaceutici S.p.A. La reazione procede in DMSO anidro a 40 °C e prevede la pre-solubilizzazione dell'HABTA a temperatura ambiente, con successivo impiego del *linker* cumarino-PEG-ioduro sintetizzato in precedenza (vedi Par. 3.3.1 a) come agente funzionalizzante. Questo viene introdotto nella miscela di reazione in quantità stechiometricamente variabile a seconda del grado di derivatizzazione (teorico) che si vuole raggiungere (*i.e.* si aggiungono 0.4 eq di *linker* per una derivatizzazione teorica pari al 40%). Il prodotto finale conterrà perciò parte dei gruppi carbossilici funzionalizzati con il *linker*, e i rimanenti in forma di carbossilati liberi, che possono essere poi opportunamente salificati.



**Schema 3.19:** Schema generico di sintesi per HA-PEG-cumarina (estere).

Nella sintesi di derivati esterei o ammidici dell'acido ialuronico il *work-up* riveste un'importanza fondamentale: anche se la reazione avviene con esiti positivi, per poter separare adeguatamente il prodotto dalla miscela di reazione occorre seguire una metodologia precisa. Inizialmente si porta la miscela a temperatura ambiente e si aggiunge sotto agitazione  $\text{NaBr}_{(\text{aq})}$  saturo (in modo da indurre lo scambio ionico tra  $\text{Na}^+$  e  $\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3^+$  con formazione del sale sodico dell'HA e di tetrabutilammonio-bromuro), quindi si fa precipitare l'HA per lenta aggiunta di EtOH freddo. Il prodotto viene infine purificato dai sali e da eventuale *linker* cumarino-PEG-ioduro non reagito tramite ripetuti lavaggi idroalcolici (con rapporti EtOH 96%/H<sub>2</sub>O variabili a seconda del grado di derivatizzazione), e rimozione dei solventi residui a pressione ridotta per almeno 96h. I prodotti si presentano sotto forma di solidi polverulenti bianchi.

La tabella seguente riassume tutti i lotti sintetizzati secondo lo schema 3.19, con le condizioni di reazione utilizzate, le rese ottenute e la percentuale di derivatizzazione effettiva (quando disponibile), calcolata tramite HPLC.<sup>1</sup>

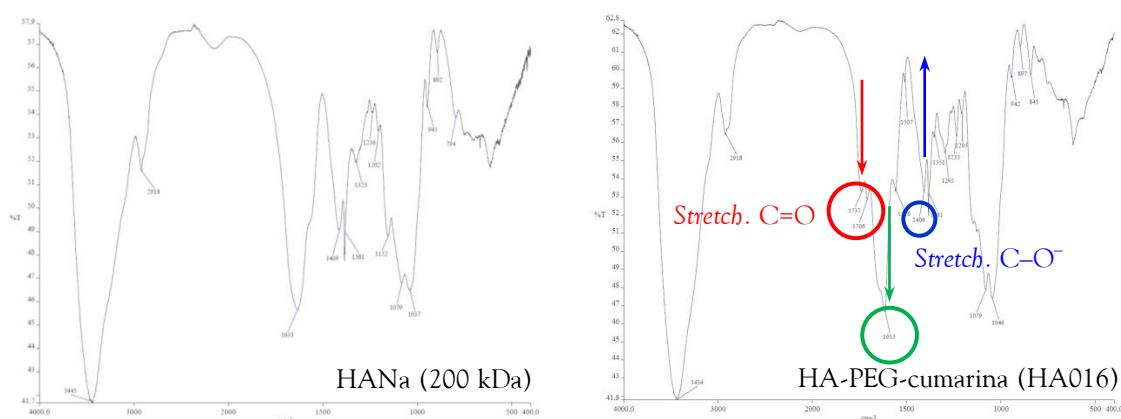
<sup>1</sup> Per una discussione dettagliata sul metodo HPLC utilizzato si veda il Par. 3.5.

Lotto #	Massa substrato (HATBA) [g]	Durata [h]	Resa [%]	Massa prodotto [g]	Derivatizzazione % (teorica)	Derivatizzazione % (effettiva)
006	0.52	24	63	0.26	40	n.c.
008	0.50	24	60	0.29	80	n.c.
010	0.50	48	81	0.33	40	29.9
011	1.00	24	77	0.63	40	n.c.
016	1.00	48	80	0.65	40	36.8
019	0.50	96	60	0.24	40	n.c.
022	0.50	48	77	0.30	40	33.5
023	0.50	48	71	0.28	40	32.5
027	2.00	96	92	1.43	40	32.0
033	2.00	96	92	1.44	40	33.0
034	2.00	96	95	1.46	40	31.0
036	2.00	96	95	1.46	40	30.0
037	2.00	96	93	1.44	40	32.0
044	2.00	48	87	1.41	40	n.c.
046	2.00	72	87	1.41	40	n.c.
048	2.00	120	78	1.65	100	n.c.
049	2.00	120	75	1.59	100	n.c.
055	2.00	48	98	1.44	40	n.c.
066	2.00	48	88	1.30	40	n.c.
067	2.00	48	89	1.31	40	n.c.

Tabella 3.3: Lotti di HA-PEG-cumarina (estere) sintetizzati.

Una corretta valutazione di tutti i parametri in gioco e dell'andamento cinetico della reazione (mediante HPLC) permette di ottimizzare le condizioni di reazione, regolando tempi di reazione e metodologia di *work-up*. Quest'ultima in particolare viene calibrata sulla base del quantitativo iniziale di substrato: reazioni su scala maggiore necessitano di lavaggi con una miscela idroalcolica a basso contenuto acquoso ( $\leq 10\%$ ), e di durata decisamente inferiore. *Work-up* estremamente dispendiosi in termini di tempo e resa finale portano inoltre ad abbandonare la sperimentazione che riguarda la sostituzione del DMSO con NMP, tentata per lo sviluppo di un odore piuttosto sgradevole durante la fase di solubilizzazione acquosa, imputabile a residui di DMSO. Le rese migliori (comprese tra 92-95%), con derivatizzazioni effettive buone (31.6% con 0.4 eq di agente funzionalizzante), si hanno mediamente per tempi di reazione pari a 96h. La reazione viene scalata da 0.5 g a 2.0 g, quantitativo massimo consentito per l'utilizzo di specifici reattori in vetro con camicia termostatabile, capaci di contenere per lo più 300 mL di solvente. Globalmente la resa media della reazione di esterificazione con il *linker* cumarino-PEG-ioduro risulta pari all'82%, con una derivatizzazione media effettiva pari all'80% di quella teorica. I lotti 048 e 049, con una derivatizzazione del 100% (teorica), vengono realizzati per effettuare delle prove di solubilità in solventi alternativi all'acqua, per l'ottenimento di materiali processabili per la realizzazione di fibre, tessuti, *etc.* Si verifica allora che un grado di funzionalizzazione così elevato diminuisce notevolmente l'idrosolubilità del prodotto, incrementandone quella nei solventi organici (*i.e.* DMSO, fino 50 mg/mL). In quest'ultimo caso pertanto non è più necessario l'utilizzo del *linker* a base di PEG, che invece rappresenta un requisito fondamentale per migliorare la solubilità dei derivati in solvente acquoso, con possibilità di creare soluzioni in un ampio intervallo di concentrazioni.

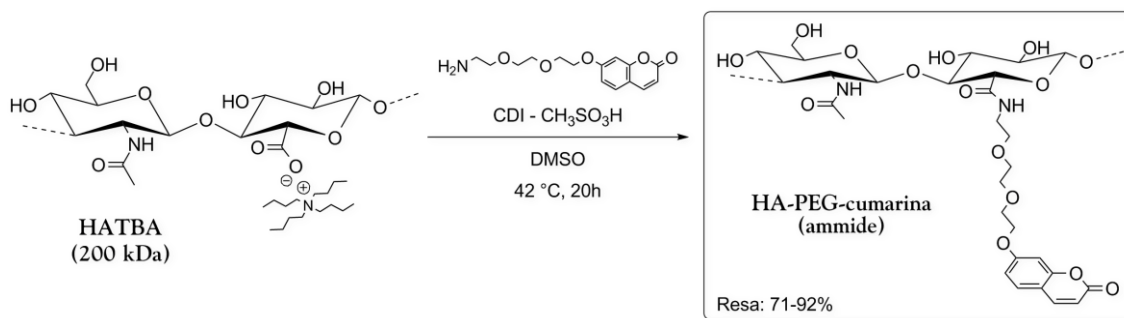
Di seguito vengono riportati gli spettri di assorbimento IR del sale sodico dell'HA (HANa, 200 kDa), standard di riferimento, e di un derivato estereo ottenuto seguendo lo schema 3.19. In questo caso l'analisi di spettroscopia IR rappresenta infatti la tecnica analitica più adatta per un riscontro diretto e immediato sull'esito della reazione. Nello spettro del derivato estereo (*i.e.* HA016) si può osservare la comparsa di due picchi tra 1750 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  (1737  $\text{cm}^{-1}$  e 1706  $\text{cm}^{-1}$  nello spettro di fig. 3.16), relativi allo *stretching* dei gruppi carbonilici dell'estere dell'HA e del residuo cumarinico, la comparsa di un picco a 1613  $\text{cm}^{-1}$  (dovuto allo *stretching* C=C dell'anello cumarinico)<sup>98</sup> e la diminuzione qualitativa del picco a 1406  $\text{cm}^{-1}$  (relativo allo *stretching* simmetrico del carbossilato). Si osserva inoltre che all'aumentare del grado di derivatizzazione aumenta l'intensità dei picchi relativi agli *stretching* carbonilici, mentre diminuisce ulteriormente il segnale indicativo del gruppo carbossilico. Questa prima evidenza sperimentale suggerisce che la derivatizzazione sia avvenuta con successo, ma per avere conferma dell'effettiva natura chimica del prodotto si decide di effettuare uno studio di spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR (vedi Par. 3.4).



**Figura 3.16:** Spettri FT-IR di HANa e HA-PEG-cumarina.

### 3.3.5. HA-PEG-cumarina (ammide)

Di seguito si riporta lo schema di sintesi generico (schema 3.20) per l'ottenimento del derivato cumarinico dell'HA mediante ammidazione, partendo dal sale di tetrabuttilammonio (HATBA), seguendo una procedura generica di ammidazione già messa a punto nei laboratori di Fidia Farmaceutici S.p.A.<sup>28</sup> La reazione, che avviene in DMSO a 42 °C, prevede l'utilizzo di CDI come attivante del carbonile (introdotto in quantità stechiometricamente equivalente alla percentuale di derivatizzazione che si vuole raggiungere), e di CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (solitamente dal 5 al 30% mol/mol), che oltre a migliorare la reazione di attivazione, induce l'HA ad assumere una conformazione più distesa, migliorandone di conseguenza l'omogeneità di derivatizzazione. L'ammina viene invece introdotta in largo eccesso, anche per evitare reazioni di *auto-crosslinking* dell'HA. Le reazioni procedono con una buona resa, variabile tra il 71 e il 92%, ma con un *work-up* più articolato a causa di filtrazioni su Gooch notevolmente rallentate. Questo, in modo analogo a quanto già visto per i derivati esterei, consiste nell'aggiunta di NaBr<sub>(aq)</sub> saturo per indurre lo scambio ionico, seguito da precipitazione con EtOH freddo e lavaggi idroalcolici di purificazione.



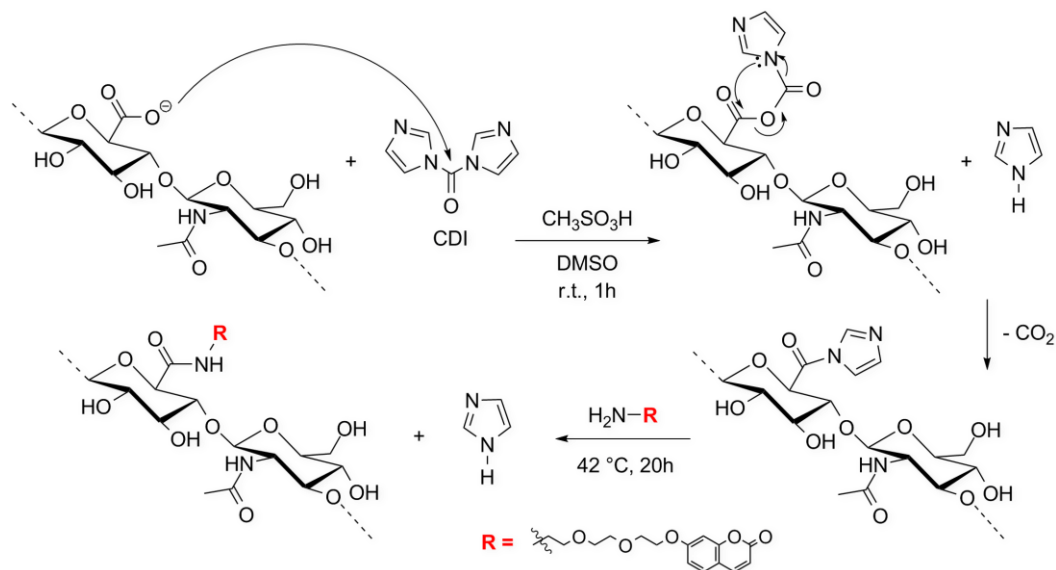
Schema 3.20: Schema generico di sintesi per HA-PEG-cumarina (ammide).

Dalla tabella seguente (tab. 3.4), che riporta le condizioni di reazione per tre lotti in cui s'impiegano sempre 0.3 eq di CDI (per una derivatizzazione teorica del 30%), emerge come la resa ponderale migliore si abbia senza l'aggiunta di CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H. Tuttavia in questo caso si hanno difficoltà notevoli nella fase di *work-up* del prodotto: si ottiene infatti un precipitato più fino, che impiega ore ad essere filtrato su Gooch dopo ciascun lavaggio. Come condizioni ottimali si considerano pertanto le seguenti: introduzione del 15% mol/mol di CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H per favorire una derivatizzazione omogenea dell'HA, e dell'ammina in largo eccesso (almeno 6 eq).

Lotto #	071	074	075
Durata [h]	20	20	20
CDI [eq]	0.3	0.3	0.3
CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H [%mol]	30	15	-
Ammina [eq]	3.3	6.4	6.4
Resa [%]	71	79	92

Tabella 3.4: Lotti di HA-PEG-cumarina (ammide) sintetizzati.

Di seguito si riporta un meccanismo di sintesi già noto (schema 3.21) per la funzionalizzazione dell'acido ialuronico via ammido:



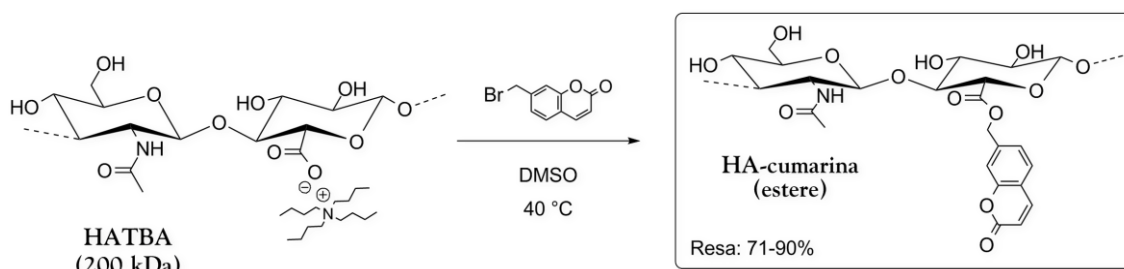
Schema 3.21: Meccanismo di sintesi per HA-PEG-cumarina (via ammido).

L'attivante CDI viene inizialmente attaccato dal carbossilato con formazione di un'anidride imidazol-carbossilica e liberazione di 1H-imidazolo. Il rilascio di CO<sub>2</sub> porta all'ottenimento di un chetone HA-imidazolico facilmente attaccabile dall'ammina linker cumarinica precedentemente sintetizzata, con liberazione di una seconda molecola di 1H-imidazolo e del derivato ammidico dell'HA.

Come già detto in precedenza, derivati ammidici dell'HA vengono sintetizzati in quanto prodotti più stabili degli esteri, sterilizzabili per via termica anziché per microfiltrazione. A priori esistono tuttavia degli svantaggi: la ridotta idrosolubilità del derivato ammidico, strettamente dipendente dal grado di derivatizzazione, la relativa stabilità dell'attivante (CDI) impiegato, la difficoltà analitica nel determinare il grado di derivatizzazione, e l'eventuale verifica e monitoraggio della reazione secondaria di *auto-crosslinking* in seguito all'attivazione del carbossile.

### 3.3.6. HA-cumarina (estere)

La sintesi di un derivato estereo dell'HA con un residuo cumarinico, ma sprovvisto di catena PEG,<sup>24,115a</sup> serve come già detto per valutare l'effettiva utilità della catena come *linker* idrofilico tra la struttura dell'acido ialuronico e il residuo cumarinico. Questo sia in fase di preparazione della soluzione di partenza, ma soprattutto durante il *crosslinking* indotto da raggi UV. La reazione avviene in condizioni simili a quanto già visto per la sintesi dell'HA-PEG-cumarina (vedi Par. 3.3.4), in DMSO anidro a 40 °C per 24h, con una resa oscillante tra il 70% e il 90%. La 7-(bromometil)-cumarina viene introdotta in quantità variabile a seconda del grado di derivatizzazione teorico che si vuole raggiungere (vedi tabella 3.5).



Schema 3.22: Schema di sintesi per HA-cumarina (estere).

Lotto #	009	014	015	017	047
Massa HATBA [g]	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
Durata [h]	48	24	24	24	72
Deriv. % (teorica)	100	20	40	60	40
Massa prodotto [g]	0.305	0.278	0.312	0.310	1320
Resa [%]	71	81	85	80	90

Tabella 3.5: Lotti di HA-cumarina (estere) sintetizzati.

Anche in questo caso, un grado di derivatizzazione maggiore si riflette in una minore idrosolubilità. Il lotto 009 infatti, sintetizzato per avere uno standard di riferimento chiaro del segnale carbonilico dell'estere in spettroscopia IR, risulta pressoché insolubile in acqua (<5 mg/mL), a differenza dei derivati con una percentuale di derivatizzazione compresa tra il 20-60%. Un'indagine mediante spettroscopia IR di tutti i lotti sintetizzati permette di osservare in particolare l'aumento d'intensità del picco compreso tra 1750-1700  $\text{cm}^{-1}$  (relativo allo *stretching* del carbonile dell'estere), all'aumentare della percentuale di derivatizzazione (fig. 3.17).

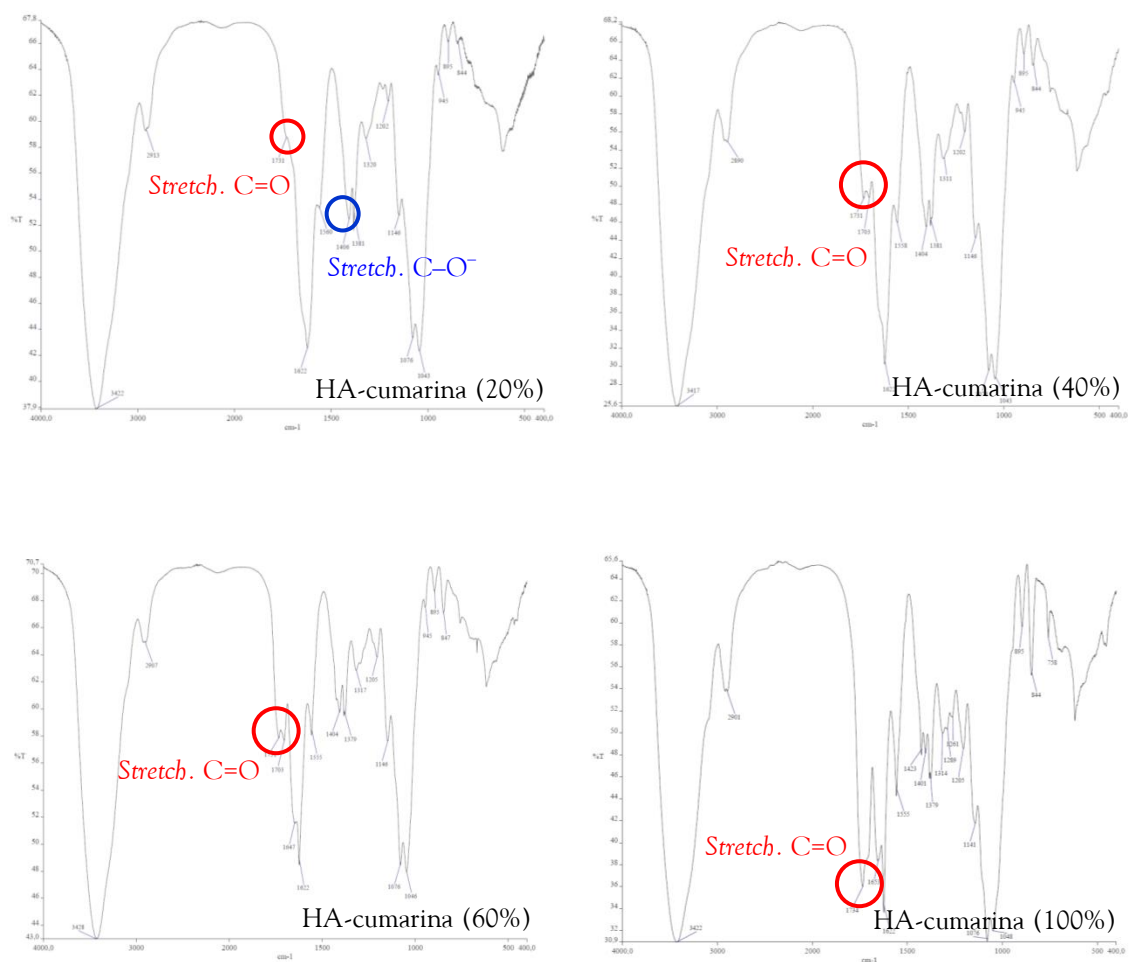


Figura 3.17: Spettri FT-IR di HA-cumarina a diverso grado di derivatizzazione.

### 3.4. Esperimenti di spettroscopia NMR per lo studio dei derivati esterei

Nell'ambito dello sviluppo dei derivati esterei dell'HA l'indagine di spettroscopia IR rappresenta, come già visto, uno strumento rapido e diretto per un primo riscontro sull'esito della reazione. Tuttavia, per verificare con certezza la formazione del nuovo legame covalente tra l'ossigeno del carbossilato e il carbonio terminale del PEG, escludendo che il residuo PEG-cumarinico sia semplicemente inglobato all'interno dell'HA (come ioduro o come alcol), conviene indagare il fenomeno attraverso esperimenti di spettroscopia NMR.

Per prima cosa viene confrontato lo spettro  $^1\text{H}$  NMR dell'HANA artificiale (ritrovato anche in letteratura)<sup>116</sup> con quello dell'HA-PEG-cumarina (estere) ottenuto tramite lo schema di reazione 3.19 (lotto 006), effettuando analisi in  $\text{D}_2\text{O}$  a  $40^\circ\text{C}$ . Occorre innalzare la temperatura per favorire la dissoluzione dell'acido ialuronico in acqua, diminuendone al contempo la viscosità. Nello spettro del derivato (fig. 3.18, in azzurro) si rileva chiaramente la presenza dei segnali protonici della cumarina tra 6.0 e 8.5 ppm, nonché la presenza di EtOH residuo dai lavaggi di purificazione (tripletto a 1.17 ppm e quartetto a 3.64 ppm).

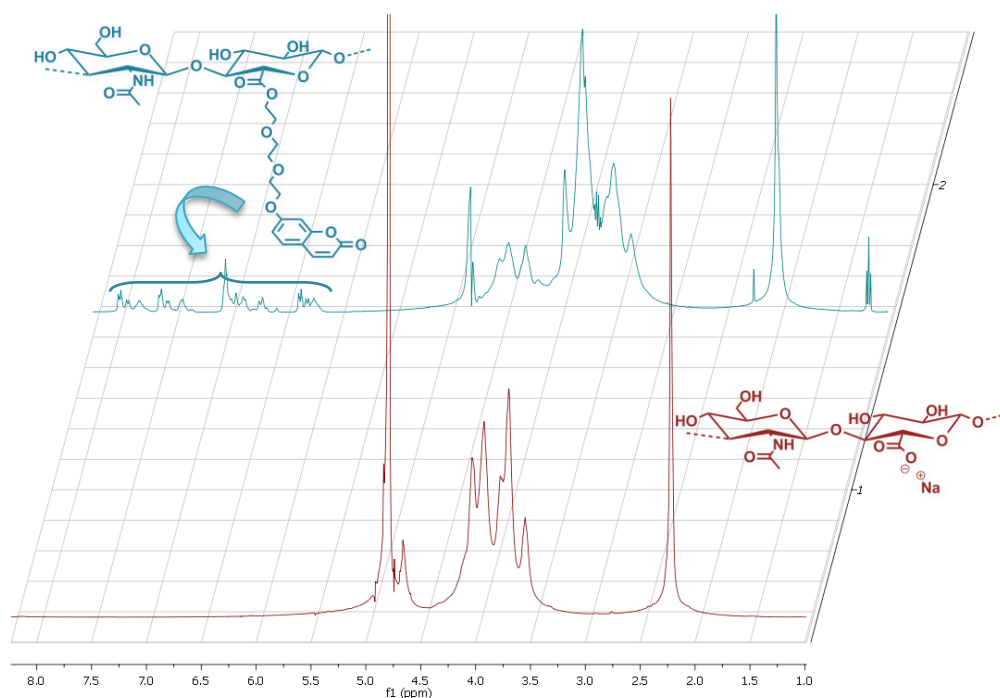


Figura 3.18: Spettri  $^1\text{H}$  NMR di HANA e HA-PEG-cumarina ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ).

La situazione risulta ancor più chiara confrontando gli spettri  $^{13}\text{C}$  relativi ai reagenti (HANA e linker cumarino-PEG-I) con quello del prodotto (vedi figura 3.19). Si può notare infatti come scompare il segnale riferito all'atomo di carbonio direttamente legato allo iodio, e ciò porta ad escludere la presenza di linker non reagito. Si ha un nuovo segnale (62.6 ppm) che potrebbe corrispondere verosimilmente all'atomo di carbonio del nuovo legame covalente tra HA e linker, ed infine emergono i segnali dei carboni relativi al residuo cumarinico.



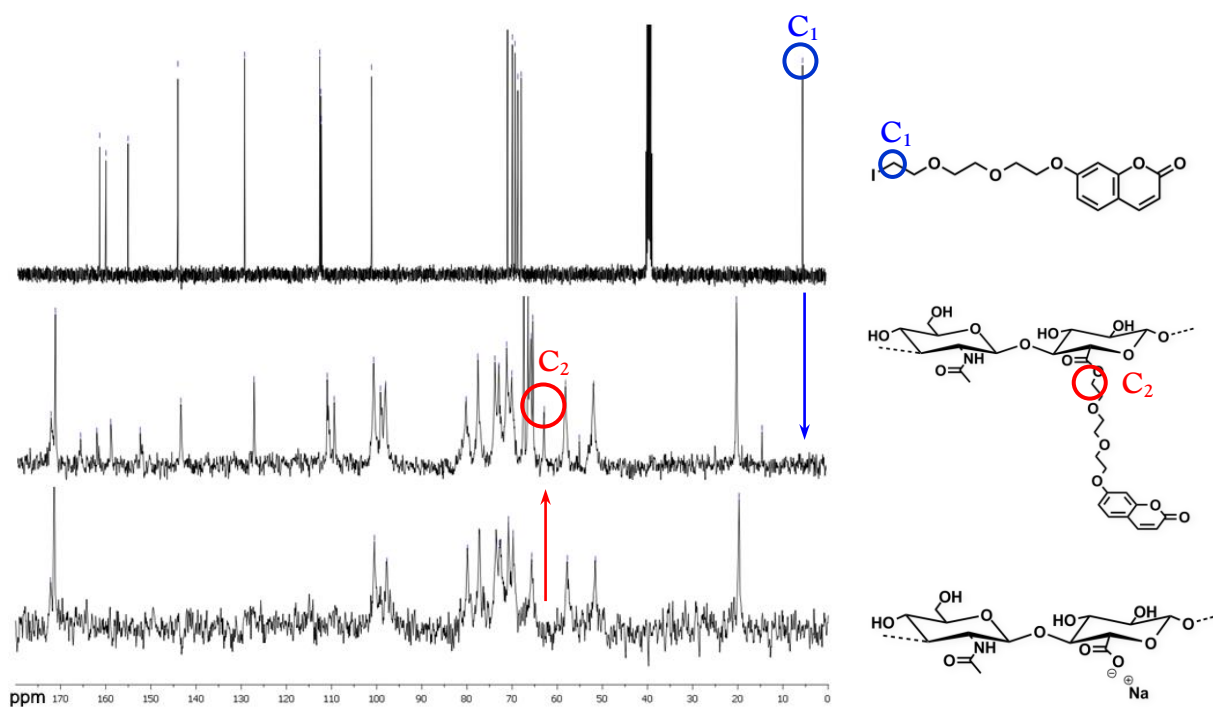


Figura 3.19: Spettri  $^{13}\text{C}$  NMR di HANA, e HA-PEG-cumarina e linker cumarino-PEG-I ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ).

Di seguito si riportano spettri NMR bidimensionali NOESY riferiti al prodotto HA-PEG-cumarina (estere, lotto 006). Questa spettroscopia dà risultati di segno diverso in funzione del “*tumbling time*” della molecola in oggetto.<sup>117</sup> Il “*tumbling time*” si definisce come il tempo che la molecola impiega a ruotare di un angolo pari ad un radiante, alle date condizioni di viscosità del solvente e di temperatura. Molecole a basso peso molecolare hanno un “*tumbling time*” piccolo, mentre molecole a grande peso molecolare un “*tumbling time*” maggiore. Questo fatto si traduce nello spettro NOESY nel diverso segno del segnale, che viene convenzionalmente considerato positivo ed indicato con il colore rosso per molecole piccole, mentre viene considerato negativo ed indicato con il colore blu per molecole grandi.

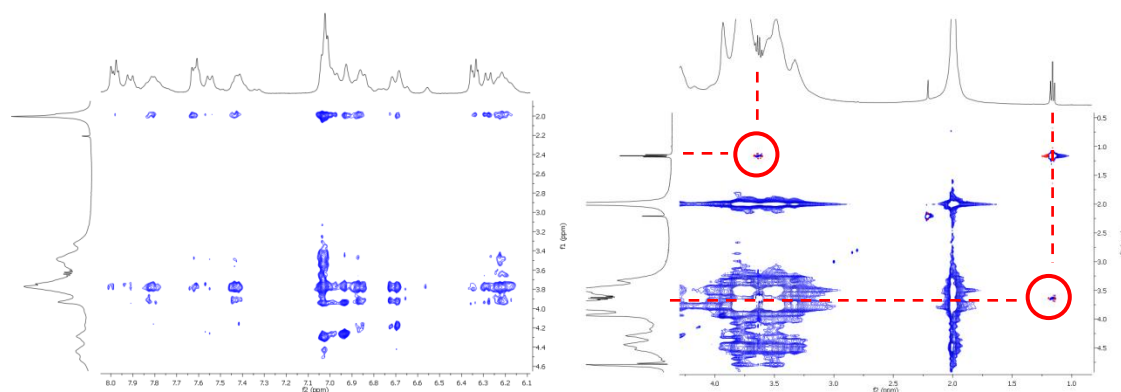
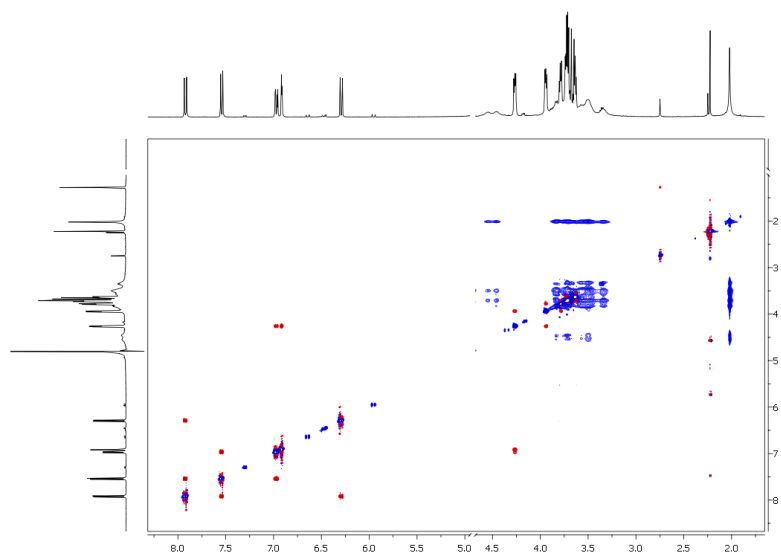


Figura 3.20: Spettri bidimensionali NOESY di HA-PEG-cumarina (estere).

In accordo con questa premessa, dallo spettro NOESY di figura 3.20 si osserva come i segnali della macromolecola di HA-PEG-cumarina (grande) siano negativi ed indicati in blu, mentre quelli relativi all'etanolo residuo (molecola piccola) siano positivi ed evidenziati in rosso. Il metile dell'acido ialuronico è spazialmente vicino a tutta la regione aromatica della

cumarina, così come tutti i restanti protoni dei cicli dell'acido ialuronico. Tale studio permette quindi di affermare con certezza che il *linker* cumarino-PEG è legato covalentemente all'acido ialuronico.

Come ulteriore conferma si effettua un'analisi bidimensionale NOESY di un campione preparato in D<sub>2</sub>O miscelando assieme HANa (40 mg/mL) e 0.4 eq di 7-(idrossi)-PEG-cumarina (vedi Par. 3.3.3). In questo caso osservando il NOESY si rilevano molte interazioni positive, che si riferiscono alla presenza di molecole piccole (residui cumarinici non legati covalentemente alla struttura dell'HA).



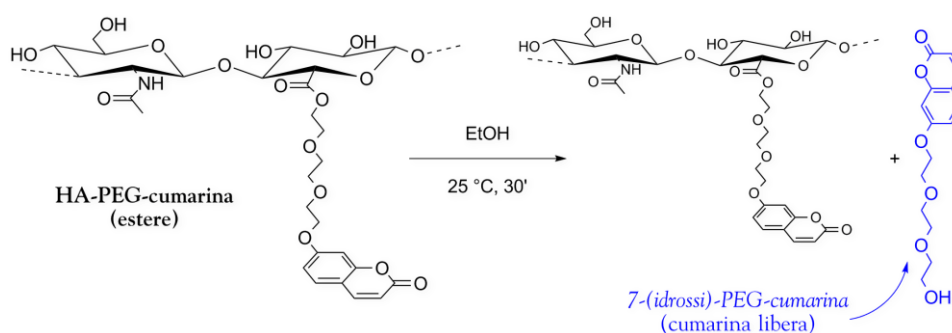
**Figura 3.21:** Spettro bidimensionale NOESY di HANa e 7-(idrossi)-PEG-cumarina (miscela).

### 3.5. Valutazione del grado di derivatizzazione e della cinetica di reazione tramite HPLC

Per effettuare una valutazione quantitativa del grado di derivatizzazione (effettivo) dei composti esterei dell'HA, sintetizzati utilizzando il *linker* cumarino-PEG-ioduro, si è utilizzata la cromatografia HPLC (per il metodo vedi Appendice E – Metodo HPLC per la valutazione del grado di derivatizzazione). Di seguito vengono riportate le due procedure sperimentali attuate per il rilascio di cumarina, lavaggio alcolico e idrolisi basica, che permettono di distinguere rispettivamente la (1) cumarina libera inglobata nell'acido ialuronico (sotto forma di 7-(idrossi)-PEG-cumarina)<sup>II</sup> dalla (2) cumarina legata covalentemente.

#### 1) Lavaggio alcolico (*cumarina libera*)

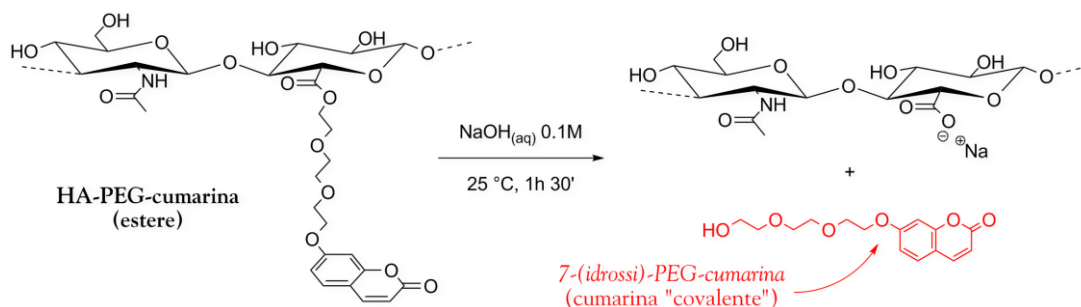
In un pallone ad un collo s'introduce HA-PEG-cumarina (50 mg) in EtOH (10 mL) e si lascia procedere la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per 30' e sotto sonicazione per 5'. Dal momento che l'acido ialuronico è insolubile in EtOH, in soluzione passa solamente l'eventuale 7-(idrossi)-PEG-cumarina libera, che viene ritrovata e quantificata tramite analisi HPLC.



**Schema 3.23:** Procedura di lavaggio alcolico (*cumarina libera*).

#### 2) Idrolisi basica (*cumarina "covalente"*)

In un pallone ad un collo s'introduce HA-PEG-cumarina (50 mg) in NaOH<sub>(aq)</sub> 0.1 M (10 mL) e si lascia procedere la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per 1h 30'. L'idrolisi alcalina permette la liberazione della 7-(idrossi)-PEG-cumarina legata all'HA, che può pertanto essere analizzata e quantificata tramite HPLC.



**Schema 3.24:** Procedura di idrolisi basica (*cumarina "covalente"*).

<sup>II</sup> L'eventuale presenza di *linker* cumarino-PEG-ioduro non reagito viene esclusa a priori grazie all'analisi NMR.

### Cinetica dell'esterificazione

Tramite HPLC si vuole valutare la cinetica della reazione di esterificazione (con un grado di funzionalizzazione teorico pari al 40% – lotto 019), rilevando la progressiva riduzione del picco relativo al *linker* cumarino-PEG-ioduro, per avere un'indicazione precisa dello stato di avanzamento nel tempo. Inizialmente lo standard di riferimento si prepara introducendo una quantità nota di *linker* (2.2 mg) in DMSO (1 mL), portando quindi a 5 mL con *fase A* (vedi Appendice E). Come si può osservare dai cromatogrammi, si ha la concomitante comparsa dei picchi relativi alla formazione del prodotto e di un sottoprodotto a ~14' (presente all'1.4%),<sup>III</sup> la cui natura non viene identificata. Di seguito vengono riportati i cromatogrammi registrati rispettivamente a  $t_0$ , ed a 1, 2, 5, 22, 28, 48 e 72 ore. I campioni vengono preparati prelevando 1 mL della miscela di reazione (in DMSO), e portando a 5 mL con *fase A*.

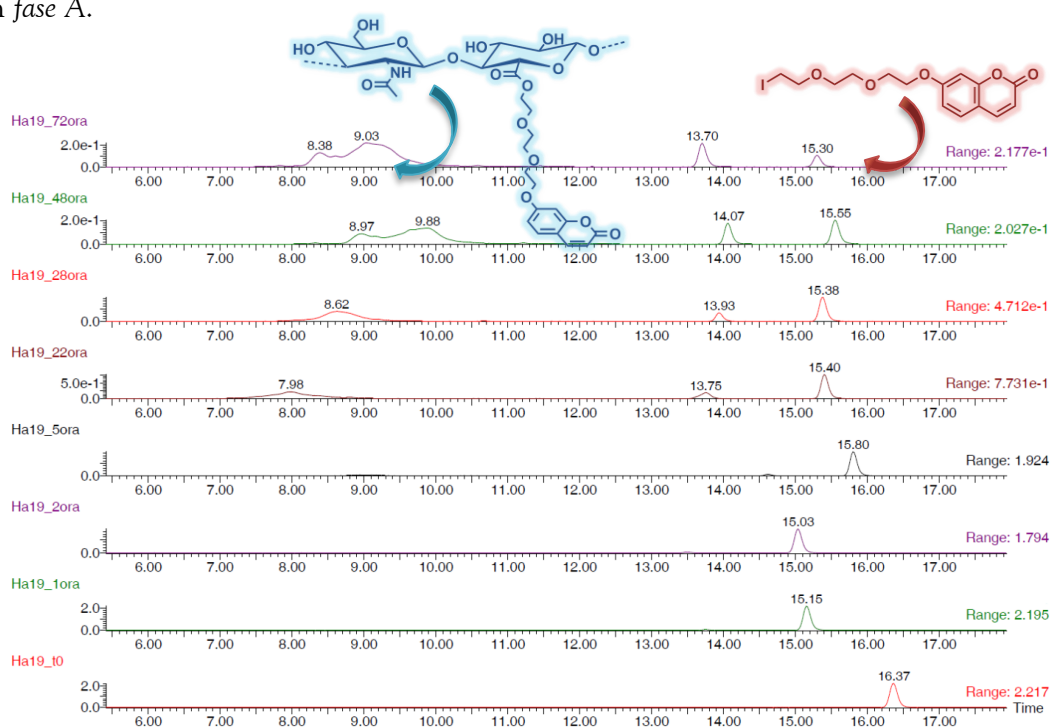


Figura 3.22: Cromatogrammi per la valutazione della cinetica dell'esterificazione.

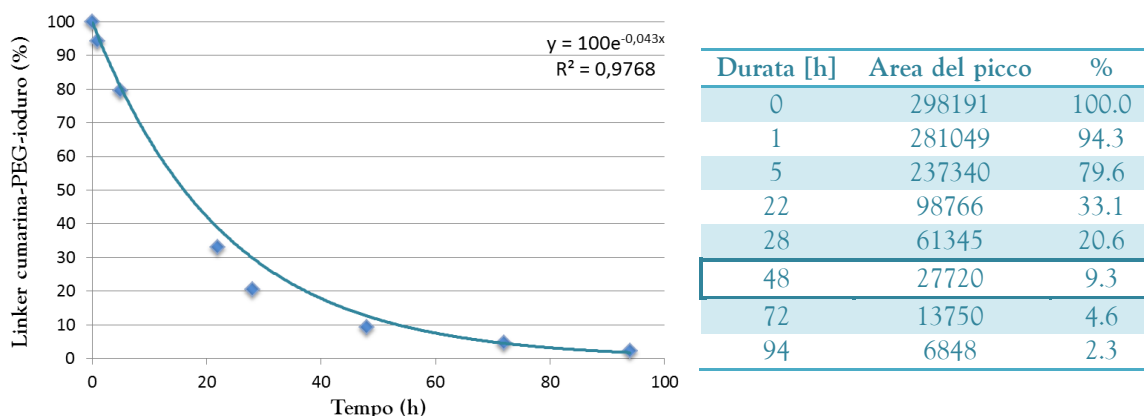


Figura 3.23: Cinetica dell'esterificazione con linker cumarina-PEG-ioduro.

<sup>III</sup> Detector UV: 210 nm.

Dal diagramma della cinetica ottenuto (fig. 3.23), così come dalle integrazioni dei picchi dei cromatogrammi, si evince che la reazione dopo 48h presenta un grado di conversione superiore al 90%. Pertanto si decide di mantenere questa durata come tempo minimo da adottare nelle reazioni di esterificazione.

### 3.6. Test di sterilizzazione

Prima di effettuare prove di gelificazione di soluzioni acquose di derivati esterei dell'HA (HA-PEG-cumarina), si vuole valutarne qualitativamente l'idrosolubilità ma soprattutto la possibilità di sterilizzazione tramite microfiltrazione, indispensabile per uno sviluppo industriale del prodotto.

La microfiltrazione è un processo di filtrazione che rimuove le particelle solide da un fluido o da un gas, facendolo passare attraverso una membrana microporosa ( $0.1 < \varnothing_{\text{pori}} < 10 \mu\text{m}$ ). Si tratta di un processo di separazione fisica che dipende dalla pressione, molto simile a quelli di osmosi inversa, ultrafiltrazione e nanofiltrazione, da cui differisce quasi esclusivamente per le dimensioni delle particelle trattenute. Sostanze più grandi dei pori delle membrane vengono completamente rimosse, mentre sostanze più piccole vengono parzialmente rimosse in funzione della costruzione di uno strato di rifiuto sulla membrana. Le membrane di microfiltrazione consentono di rimuovere tutti i batteri, così come parte di eventuali virus (anche se più piccoli dei micropori della membrana) che si fissano al bio-film batterico. La microfiltrazione viene utilizzata nei processi di potabilizzazione dell'acqua, per la sterilizzazione a freddo di bevande e prodotti farmaceutici, o ancora per il trattamento biologico dell'acqua reflua.

Si prepara dunque una soluzione a concentrazione nota (30 mg/mL) di HA-PEG-cumarina in  $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$  0.9%, che appare limpida e poco viscosa. Per valutare la possibilità di microfiltrazione su filtri sterilizzanti in cellulosa rigenerata da  $0.2 \mu\text{m}$ , si registra lo spettro di assorbimento UV della soluzione prima e dopo la filtrazione, confrontando i massimi di assorbanza. I valori registrati indicano che il prodotto può essere filtrato con un *recovery* del 97%, poiché il valore di assorbanza rimane pressoché inalterato. Per ovviare all'elevata concentrazione del campione, l'analisi spettroscopica viene effettuata utilizzando una cuvetta avente cammino ottico pari a  $0.01 \pm 0.003 \text{ mm}$  (le caratteristiche tecniche sono riportate in figura 3.24).

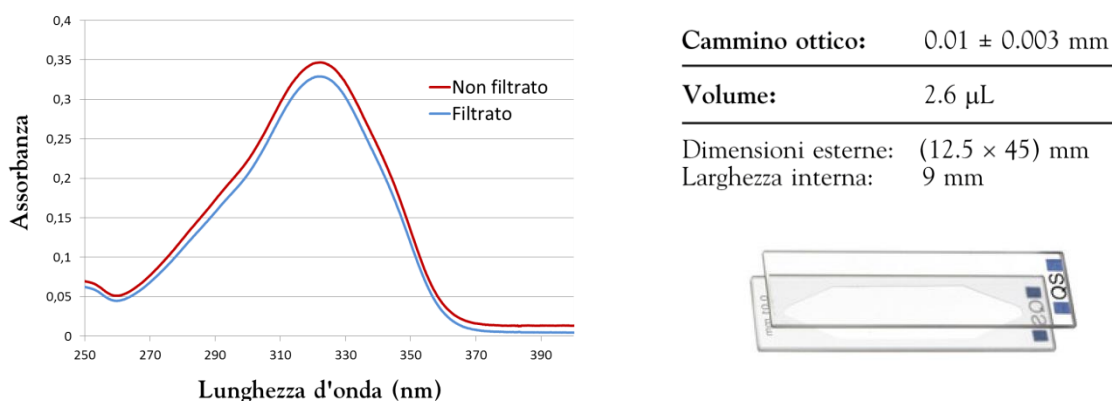


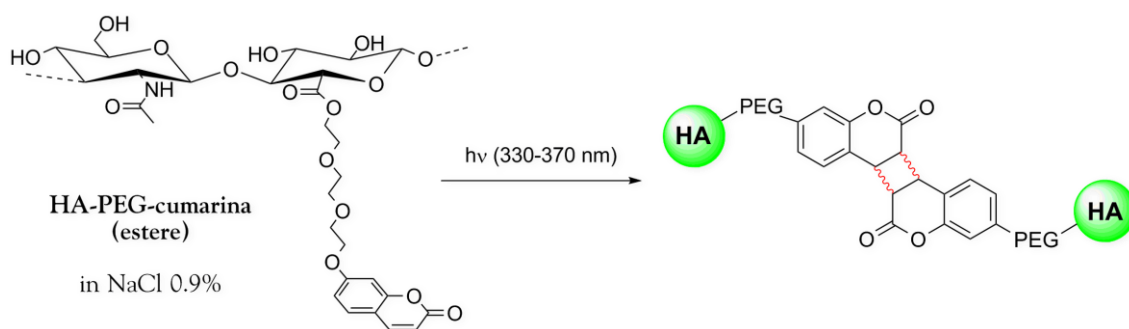
Figura 3.24: Spettri di assorbimento UV prima/dopo filtrazione e caratteristiche della cuvetta.

### 3.7. Fotopolimerizzazione e stabilità degli idrogel

#### 3.7.1. Gelificazione di HA-PEG-cumarina (estere)

Le prove di gelificazione dell'HA-PEG-cumarina (estere) si effettuano realizzando soluzioni a concentrazione variabile di derivato in NaCl<sub>(aq)</sub> 0.9% (soluzione fisiologica, per avvicinarsi quanto più possibile alla formulazione applicativa finale). All'aumentare della concentrazione cresce in modo evidente anche la viscosità della soluzione, che resta comunque filtrabile<sup>IV</sup> almeno fino a 40 mg/mL su filtri sterilizzanti in acetato di cellulosa da 0.2 μm (prerogativa essenziale per una successiva industrializzazione del processo).

Per avere un primo riscontro sulla possibilità di formazione dell'idrogel a seguito della dimerizzazione cumarinica<sup>90c,92a-d</sup> si realizzano perciò quattro soluzioni acquose isotoniche a concentrazione compresa tra 10 mg/mL e 40 mg/mL di HA-PEG-cumarina (estere) con una derivatizzazione effettiva pari al 36.8%, senza microfiltrazione. Queste vengono realizzate lasciando solubilizzare il derivato in NaCl 0.9% sotto agitazione magnetica per 1h. Il prodotto risulta perfettamente solubile nella soluzione fisiologica a tutte le concentrazioni, dando origine a soluzioni sempre omogenee e trasparenti. Queste, poste in piccoli recipienti di polietilene per facilitarne il recupero a seguito della polimerizzazione, vengono irradiate in modo unidirezionale con una radiazione UV a lunghezza d'onda compresa tra 330 e 370 nm (*lampada di Wood*), ad una temperatura di 37 °C, per un tempo compreso tra 10' e 20'. È molto importante che la sorgente UV abbia un *cut-off* per radiazioni a  $\lambda < 305$  nm, onde evitare fenomeni di foto-riassorbimento da parte dei dimeri cumarinici. Nel caso dell'HA-PEG-cumarina (estere) si ottiene la formazione di un idrogel a tutte le concentrazioni sperimentate, a compattezza crescente all'aumentare della concentrazione della soluzione di partenza o all'aumentare del tempo di irraggiamento (vedi fig. 3.25 e fig. 3.26).



Schema 3.25: Schema di crosslinking dell'HA-PEG-cumarina (estere).



Figura 3.25: Idrogel da HA-PEG-cumarina (estere) dopo 10' di irraggiamento UV.

<sup>IV</sup> E quindi sterilizzabile.



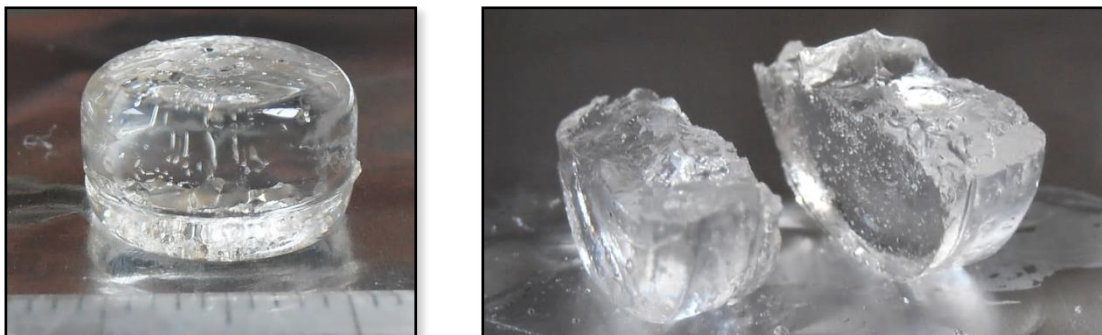
**Figura 3.26:** Idrogel da HA-PEG-cumarina (estere) dopo 20' di irraggiamento UV.

Di seguito viene riportata invece la documentazione fotografica del *crosslinking* effettuato su una soluzione di HA-PEG-cumarina a concentrazione 30 mg/mL (grado effettivo di derivatizzazione: 33.5%). Anche in questo caso il prodotto viene disciolto in  $\text{NaCl}_{(aq)}$  0.9% tramite agitazione magnetica (1h): la soluzione risultante, limpida e omogenea, viene filtrata su filtri sterilizzanti in acetato di cellulosa da  $0.2 \mu\text{m}$ , e separata in quattro contenitori differenti. I campioni vengono quindi irradiati con un fascio luminoso unidirezionale a  $37^\circ\text{C}$ , in maniera continuata, per un tempo variabile da 5' a 20'. Una gelificazione ottimale si ha già dopo appena 10' d'irraggiamento, mentre per esposizioni superiori a 20' il gel diventa troppo compatto, disgregandosi in seguito a prove di taglio (fig. 3.27).



**Figura 3.27:** Idrogel da HA-PEG-cumarina (estere,  $c=30 \text{ mg/mL}$ ), a diversi tempi d'irraggiamento UV.

Le immagini sottostanti si riferiscono alla prova di taglio effettuata su un idrogel di soluzione di HA-PEG-cumarina (estere), con derivatizzazione effettiva pari al 33%. La soluzione, a concentrazione pari a  $30 \text{ mg/mL}$ , viene prima sterilizzata e poi irradiata con raggi ultravioletti per 15' a  $37^\circ\text{C}$ , seguendo la metodica descritta in precedenza. Si riesce ad osservare facilmente come il prodotto, mantenga il caratteristico aspetto di idrogel 3D “parete-parete” anche a seguito del taglio, conservando la propria forma (vedi figura 3.28).

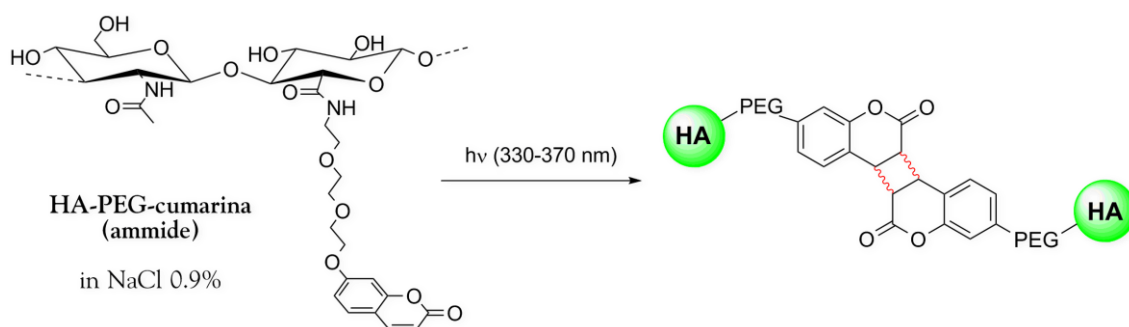


**Figura 3.28:** Prova di taglio di HA-PEG-cumarina (estere), prima e dopo.



### 3.7.2. Gelificazione di HA-PEG-cumarina (ammide)

Le prove di gelificazione dell'HA-PEG-cumarina (ammide) vengono affrontate in maniera analoga a quanto già visto per l'estere. Si realizzano tre soluzioni a concentrazione variabile di derivato in  $\text{NaCl}_{(aq)}$  0.9% (derivatizzazione teorica: 30%),<sup>v</sup> rispettivamente 10, 20 e 30 mg/mL. Il prodotto risulta meno idrosolubile dell'estere, pertanto si formano soluzioni piuttosto omogenee solamente dopo 2h 30' di agitazione magnetica, e 30 mg/mL rappresenta il limite di solubilità. I prodotti inoltre non sono sterilizzabili tramite microfiltrazione, ma questo non rappresenta un problema grave, dal momento che le ammidi vengono solitamente sterilizzate mediante trattamento termico (121 °C per 15').



Schema 3.26: Schema di crosslinking dell'HA-PEG-cumarina (ammide).

La soluzione meno concentrata (10 mg/mL) viene irradiata con un fascio UV unidirezionale per un tempo compreso tra 5' e 30'. Dall'immagine seguente (fig. 3.29) si può osservare come in ogni caso non si abbia la formazione di un idrogel "parete-parete" compatto, ma solamente un processo di debole gelificazione nel caso dell'irraggiamento più prolungato (25'-30').

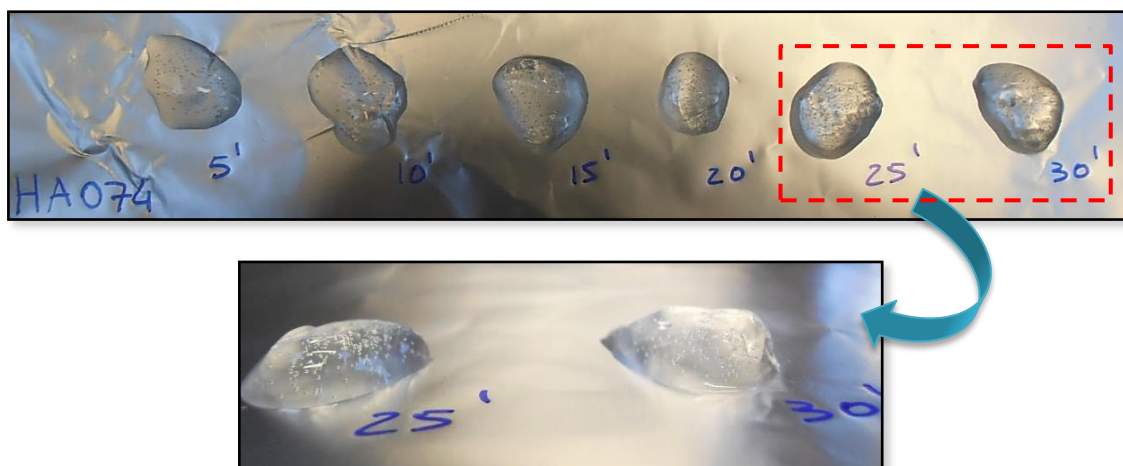
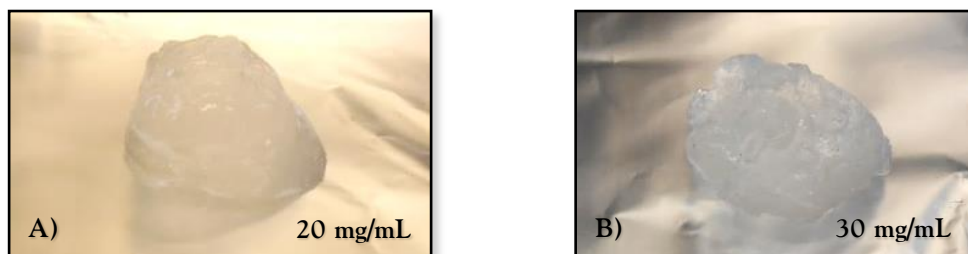


Figura 3.29: Test di gelificazione per HA-PEG-cumarina (ammide,  $c=10 \text{ mg/mL}$ ).

Tentativi di gelificazione delle soluzioni più concentrate (20 mg/mL e 30 mg/mL) hanno invece portato a risultati migliori (vedi fig. 3.30 A e fig. 3.30 B), con un tempo

<sup>v</sup> Non confermata analiticamente.

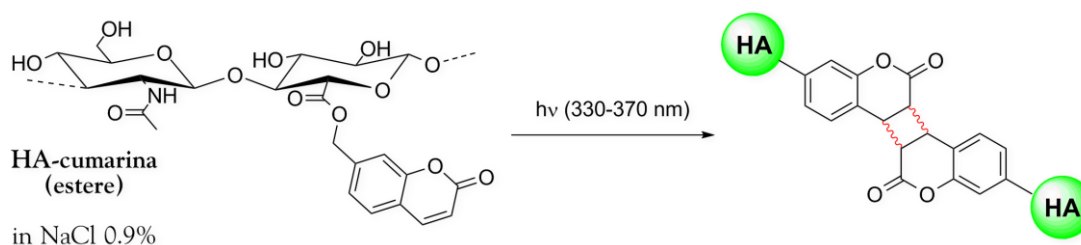
d'irraggiamento ottimale pari a 15'. Si ha la formazione di un idrogel, la cui compattezza cresce all'aumentare della concentrazione, che dimostra tuttavia una consistenza meno buona rispetto all'idrogel derivato dalla reticolazione dell'estere. Non si verifica infatti la conservazione della forma indotta dal recipiente contenitivo; per lo più, a seguito di una prova di taglio, il gel non mantiene la propria forma ma tende in parte a disgregarsi per lo stress meccanico subito.



**Figura 3.30:** Test di gelificazione per HA-PEG-cumarina (ammide,  $c=20-30$  mg/mL).

### 3.7.3. Utilità del PEG nella formazione degli idrogel

Per valutare l'utilità strutturale del *linker* PEG in fase di preparazione delle soluzioni da gelificare, ma soprattutto in fase di *crosslinking*, si effettuano delle prove di gelificazione del derivato HA-cumarina (estere) sprovvisto di spaziatore (derivatizzazione teorica: 40%).



Schema 3.27: Schema di crosslinking dell'HA-cumarina (estere).

Anche in questo caso si realizza una soluzione in NaCl 0.9% a concentrazione fissa (30 mg/mL), preventivamente microfiltrata (RC da 0.2  $\mu\text{m}$ ), che viene irradiata per un tempo variabile da 5' a 20' (fig. 3.31 A), in modo da avere dei gel confrontabili con quelli ottenuti dall'HA-PEG-cumarina esterificato (fig. 3.31 B). L'irraggiamento avviene sempre in modo unidirezionale a 37 °C.

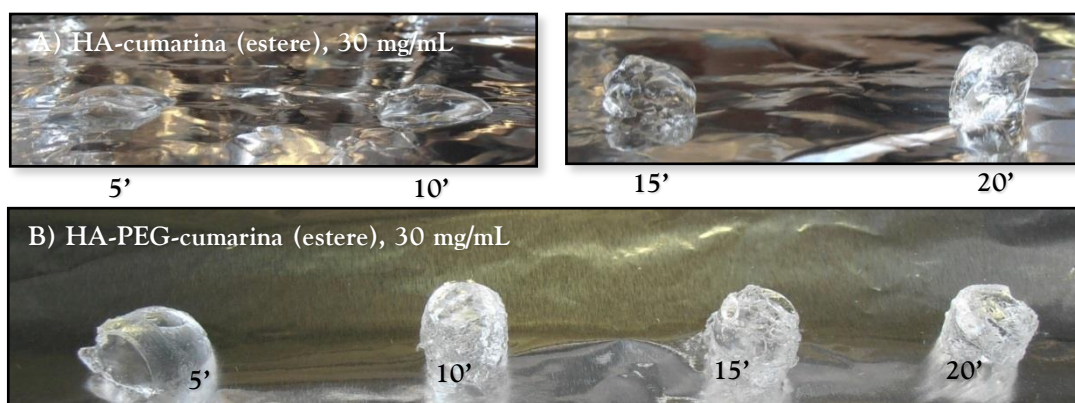


Figura 3.31: Confronto fra test di gelificazione (HA-cumarina / HA-PEG-cumarina).

L'esito della gelificazione è insoddisfacente in qualsiasi caso: l'HA-cumarina (estere) infatti, anche dopo un irraggiamento prolungato (20'-30') di soluzioni ad alta concentrazione (40 mg/mL),<sup>VI</sup> non porta all'ottenimento di un idrogel della stessa consistenza del derivato dotato di *linker*. Pertanto il *crosslinking* ad idrogel del derivato HA-cumarina (estere) necessita di tempi più lunghi d'irraggiamento, per originare un gel a proprietà fisico-meccaniche visibilmente inferiori. Prove di taglio si possono effettuare su campioni a concentrazione 30 mg/mL irradiati per almeno 30': l'esito resta tuttavia insufficiente poiché il derivato non mantiene la forma e internamente non è ben reticolato.

Tutte queste osservazioni portano a ritenere la presenza del PEG come fondamentale per una corretta solubilizzazione del derivato in acqua, ma soprattutto per garantire un

<sup>VI</sup> Limite di solubilità, oltre il quale le soluzioni diventano più opache e biancastre.

*crosslinking* efficace. L'inserimento di tale spaziatore tra il residuo cumarinico e la struttura dell'acido ialuronico aumenta la probabilità d'incontro dei residui cumarinici, che vengono disposti "esternamente" rispetto alla struttura portante dell'HA. Questi inoltre, trovandosi in un *medium* acquoso, per effetto idrofobico tenderanno ad avvicinarsi, portando ad un ulteriore aumento dell'efficienza di dimerizzazione a seguito di stimolo UV.

### 3.7.4. Swelling

Visti gli esiti delle prove di *crosslinking*, si decide di effettuare il test di rigonfiamento (*swelling*) sugli idrogel ottenuti da HA-PEG-cumarina (estere). In particolare si utilizza un derivato con un grado di derivatizzazione effettivo pari al 36.5%, e si valuta il rigonfiamento per idrogel a concentrazione 10-40 mg/mL, reticolati con tempi d'irraggiamento ( $t_{UV}$ ) pari a 10' o 20'. La prova di *swelling* prevede l'immersione degli idrogel in acqua distillata per un tempo stabilito, confrontando i pesi iniziali con l'aumento di peso nel tempo, dovuto all'assorbimento d'acqua. I valori di *swelling* sono calcolati secondo la formula sotto riportata:

$$SW = \frac{Peso_{24h} - Peso_{iniziale}}{Peso_{iniziale}}$$

Di seguito si riportano le tabelle con i valori di peso registrati (tab. 3.6 e tab. 3.7) e i relativi diagrammi che evidenziano l'andamento del peso nel tempo. I valori con asterisco si riferiscono alla concomitante disgregazione parziale degli idrogel, con conseguente assorbimento di maggiori quantitativi d'acqua.

$t_{UV}=10'$	$t_0$	1h	2h	3h	24h	48h	SW (24h)
10 mg/mL	0.440	0.587	1.010	1.908	4.348	4.388	391
20 mg/mL	0.408	0.565	1.060	1.874	4.160	4.182	188
30 mg/mL	0.419	0.679	1.445*	2.689	6.334	6.288	197
40 mg/mL	0.450	1.360*	3.490	5.120	9.179	9.529	218

Tabella 3.6: Andamento del peso per idrogel da HA-PEG-cumarina ( $t_{UV}=10'$ ) e valori di SW a 24h.

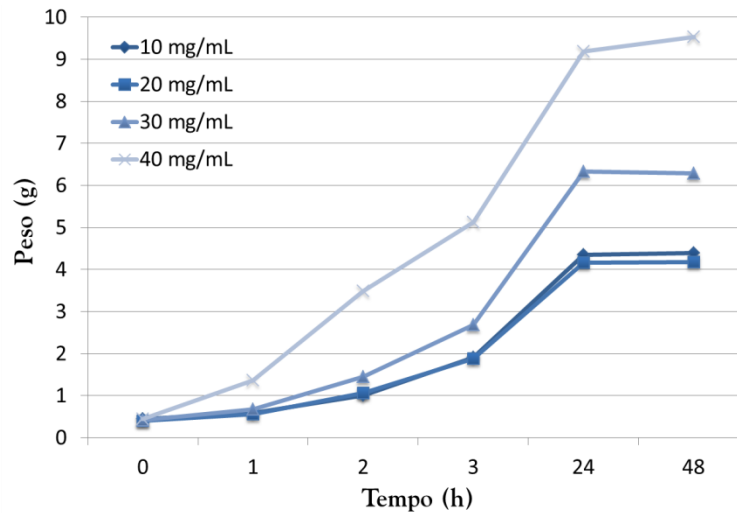


Figura 3.32: Andamento del peso per idrogel da HA-PEG-cumarina ( $t_{UV}= 10'$ ).

$t_{UV}=20'$	$t_0$	1h	2h	3h	4h	5h	24h	48h	SW (24h)
10 mg/mL	0.383	0.526	0.846	1.299	1.707	1.791	1.730	1.660	135
20 mg/mL	0.401	0.574	0.999	1.455	1.781	2.005	2.375	2.323	99
30 mg/mL	0.354	0.707	1.212	1.702	2.015	2.287	2.650	2.645	77
40 mg/mL	0.356	0.718	1.307	1.907	2.382	2.799	4.038	3.827	92

Tabella 3.7: Andamento del peso per idrogel da HA-PEG-cumarina ( $t_{UV}=20'$ ) e valori di SW a 24h.

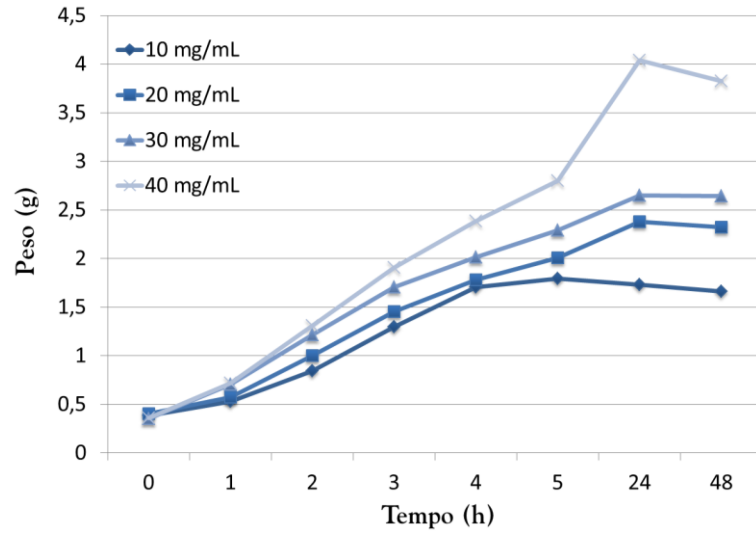
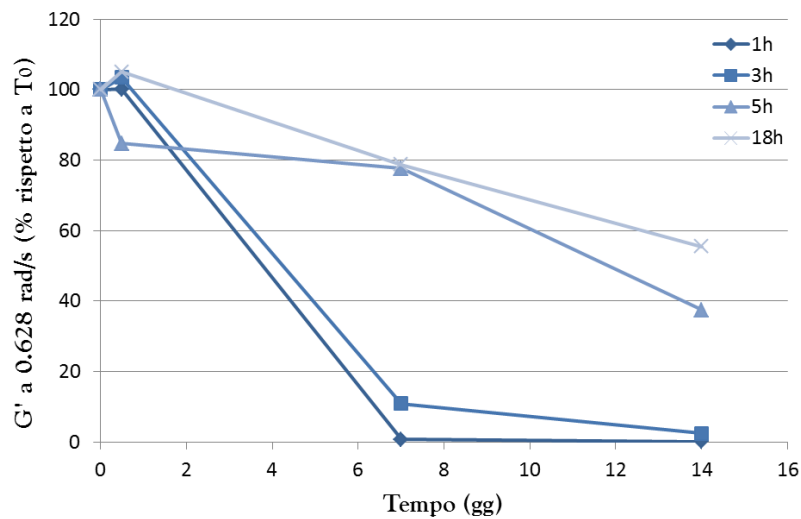


Figura 3.33: Andamento del peso per idrogel da HA-PEG-cumarina ( $t_{UV}= 20'$ ).

In accordo con quanto ipotizzabile dal punto di vista teorico, valori di *swelling* migliori si ottengono per soluzioni più concentrate o sottoposte a tempi d'irraggiamento maggiori (e quindi più reticolate).

### 3.7.5. Degradazione in plasma artificiale

Per rilevare da un punto di vista qualitativo la stabilità degli idrogel derivati da HA-PEG-cumarina (estere, derivatizzazione teorica: 40%), si realizzano quattro soluzioni isotoniche a concentrazione 20 mg/mL, irraggiate rispettivamente per 1, 2, 5 e 18 h con una sorgente luminosa UV a bassa potenza (GE ultraviolet T5 lamp, 2W,  $\lambda_{\max} = 368$  nm). Per ciascun idrogel risultante, tramite reometro si calcola il modulo elastico  $G'$  a 0.628 rad/s (riportato in percentuale normalizzata per la trattazione dei dati). Il gel viene quindi immerso in una soluzione di plasma artificiale<sup>VII</sup> ( $T = 37$  °C, pH = 7.2) per 1, 7 o 14 giorni, rilevando nuovamente il modulo elastico al termine.



**Figura 3.34:** Stabilità degli idrogel in plasma artificiale ( $G'$  in funzione del tempo).

Dal diagramma sopra riportato (fig. 3.34) si può notare come soluzioni irradiate per un tempo maggiore diano luogo a idrogel che conservano meglio le proprie caratteristiche fisico-meccaniche, caratterizzati da un modulo elastico  $G'$  che decresce molto lentamente. Considerando che si tratta di un derivato estereo dell'HA, i valori rilevati rispecchiano un prodotto sufficientemente stabile per affrontare test *in vitro* su strutture cartilaginee e ossee animali.

<sup>VII</sup> Per la composizione del plasma artificiale si rimanda alla parte sperimentale di questo capitolo.

### 3.7.6. Valutazione della bioadesione tramite gelificazione *in vitro*

Per avere un primo riscontro sulla capacità di bioadesione dell'idrogel derivato da HA-PEG-cumarina (estere) alla struttura biologica che dovrebbe contenerlo, si effettua una prova di gelificazione *in vitro* su condilo femorale bovino. La bioadesione è una proprietà molto importante, che permette alle cellule e ai tessuti di aderire agli idrogel, rendendone possibile l'utilizzo in interventi di riparazione chirurgica o come strutture di supporto induttive per la rigenerazione tissutale. La mancata adesione ai tessuti circostanti inoltre può comportare la comparsa di tessuto fibrotico tra lo *scaffold* e le pareti della lesione cartilaginea, comportando uno scorretto riempimento del tessuto.

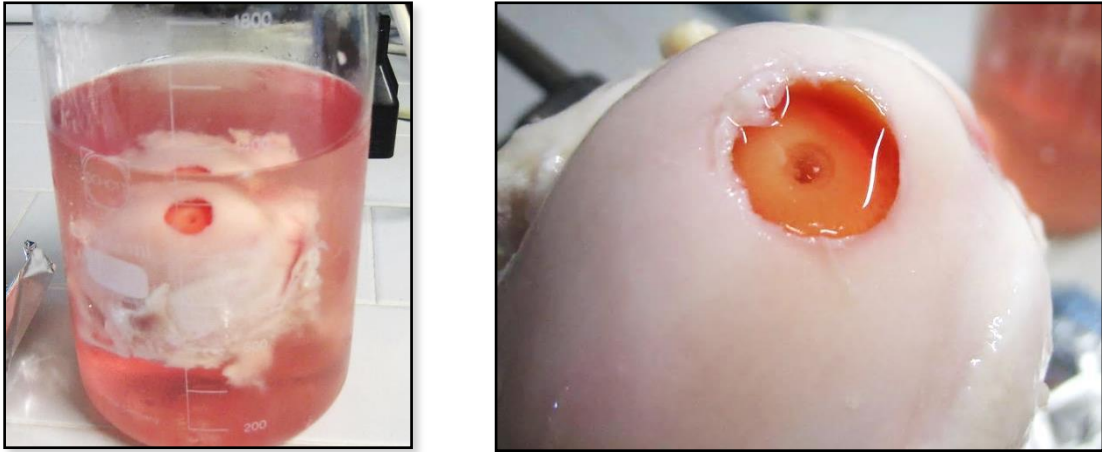
Inizialmente si realizza una lesione artificiale sul condilo, per mezzo di una fresa: una concavità avente diametro di 16 mm, profondità compresa tra 2.5 mm e 5 mm, e un'area pari a circa 2 cm<sup>2</sup>. La soluzione isotonica, preparata con un prodotto a grado di derivatizzazione effettivo pari al 30% e concentrazione 20 mg/mL, viene iniettata nella lesione, sul cui fondo è presente del sangue midollare (affiorato dall'osso subcondrale a seguito della fresatura). L'irraggiamento viene effettuato con un prototipo di fibra ottica (diametro: 4 mm), scandagliando la superficie ripetutamente ad una distanza di 5 mm, per un tempo totale pari a 3' (fig. 3.35).



**Figura 3.35:** Irraggiamento e permanenza dell'idrogel nel condilo dopo la fotopolimerizzazione.

Una prima prova di adesione del gel alla struttura biologica si effettua capovolgendo il condilo, e mantenendolo in posizione rovesciata per qualche minuto: l'idrogel resta perfettamente adeso alla superficie della lesione, rivelando delle buone proprietà adesive intrinseche. Il condilo con l'idrogel fotopolimerizzato viene quindi immerso in plasma artificiale (soluzione polisalina), per 24h e in condizioni statiche a 4 °C. Al termine il gel rimane ancora ben adeso al sito d'applicazione, anche se viene simulata una condizione di stress capovolgendolo per qualche minuto, sempre all'interno della soluzione salina. A seguito dell'estrazione dal plasma artificiale l'idrogel rimane comunque adeso perfettamente alla superficie della lesione, dimostrando un comportamento ottimale per la destinazione d'uso d'interesse (fig. 3.36).





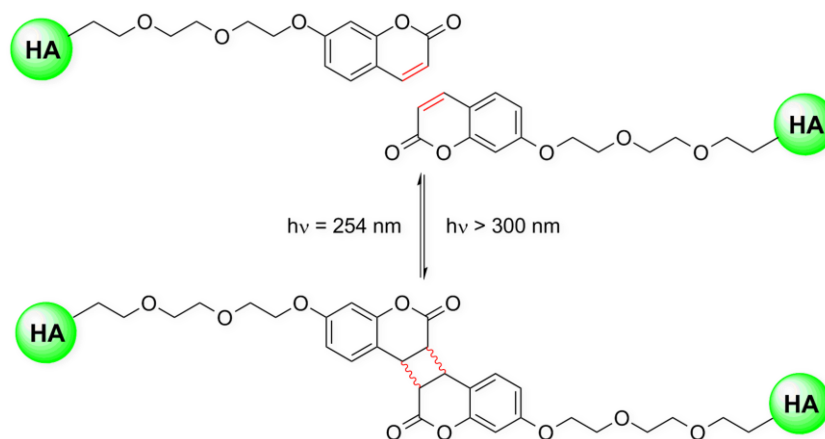
**Figura 3.36:** Immersione del condilo con idrogel nel plasma artificiale e successiva estrazione.

### 3.8. Valutazione del crosslinking e misure reologiche

In questa sezione viene descritta la messa a punto di un metodo HPLC-MS per l'analisi del grado di crosslinking effettivo per idrogel derivati da HA-PEG-cumarina (estere), nonché la determinazione del loro modulo elastico ( $G'$ ) tramite misure reologiche. Si vuole infatti un sistema in grado di definire ma soprattutto di garantire performance, riproducibilità, modulabilità, stabilità e quindi la qualità dei gel prodotti.

#### 3.8.1. Analisi del grado di crosslinking tramite HPLC-MS

Le variabili che più influenzano le caratteristiche degli idrogel sono, come già visto nel Par. 3.7: concentrazione della soluzione iniziale, grado di derivatizzazione effettivo e tipologia di irraggiamento UV (potenza della sorgente, distanza sorgente-soluzione, tempo d'illuminazione).



Schema 3.28: Schema di crosslinking dell'HA-PEG-cumarina (estere).

Si prepara dunque una soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) a concentrazione 20 mg/mL di derivato estereo HA-PEG-cumarina (lotto 034, derivatizzazione effettiva: 31%), subito filtrata su RC da 0.2  $\mu\text{m}$ . Questa viene suddivisa in quattro parti, irradiate rispettivamente per 0, 1, 2 e 3 ore con una lampada a bassa potenza (GE ultraviolet T5 lamp, 2W,  $\lambda_{\text{max}} = 368$  nm) posta ad una distanza di 6 cm. I gel ottenuti vengono in parte idrolizzati, con un sistema simile a quello descritto nel Par. 3.5, per effettuarne delle analisi HPLC-MS atte ad individuare il grado di *crosslinking*, in parte conservati per la determinazione del modulo elastico ( $G'$ ) tramite misure reologiche. L'idrolisi avviene immergendo 0.2 g di gel in NaOH 1.0 M per 40' a 40 °C, quindi si neutralizza con HCl 1.0 M, si porta a volume (5 mL) con miscela H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 8:2 (+0.1% TFA) e si filtra su filtri PTFE a 0.45  $\mu\text{m}$ . Di seguito vengono riportati gli spettri di assorbimento UV-Vis dei gel idrolizzati (ottenuti con tempi diversi d'irraggiamento), utili per capire la lunghezza d'onda da impostare nel rivelatore dell'HPLC (fig. 3.37).

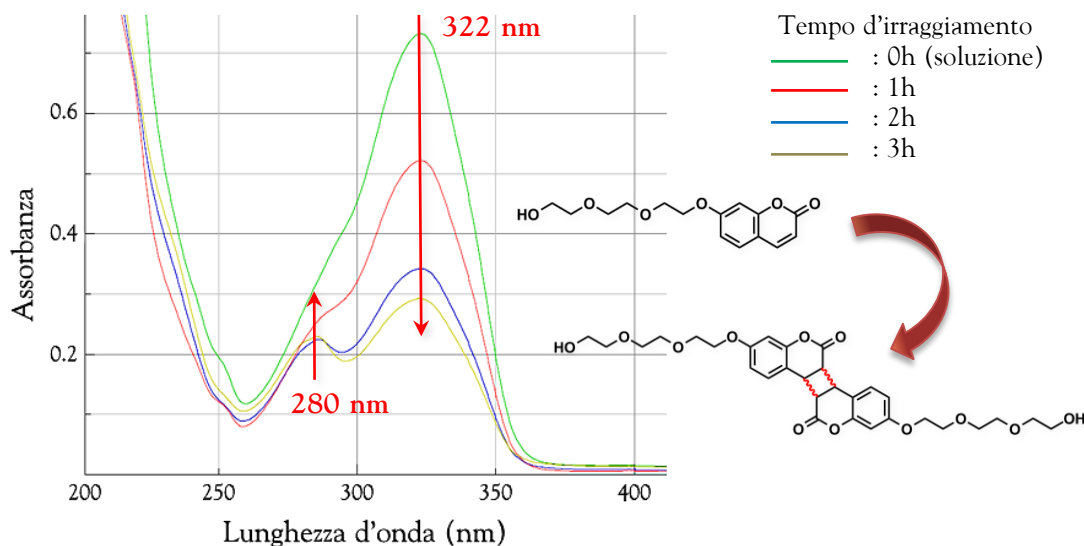


Figura 3.37: Spettri di assorbimento UV-Vis di gel idrolizzati e filtrati.

Aumentando il tempo di irraggiamento (grado di *crosslinking* maggiore) il picco a 322 nm diminuisce notevolmente, con un concomitante aumento del rapporto tra i picchi a 280 / 322 nm. Si può quindi dedurre che il picco a 322 nm sia indicativo del residuo cumarinico in forma monomerica (monocumarina), e la sua scomparsa si può correlare ad un grado di *crosslinking* crescente (biscumarina, forma dimerica).

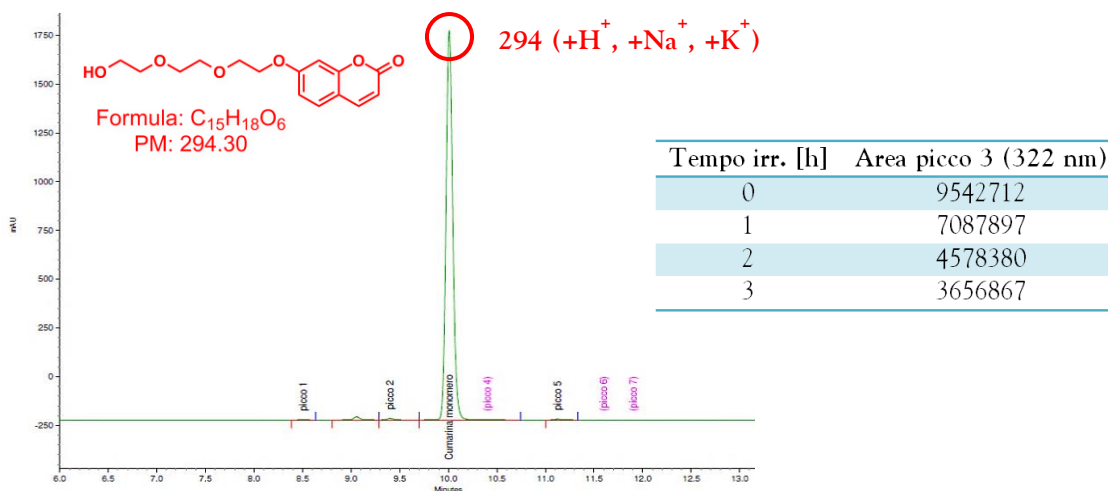


Figura 3.38: Cromatogramma HPLC da idrolisi dell'idrogel (soluzione) – t: 0h (a 322 nm).

L'analisi HPLC, con rivelatore a 322 nm, per tempi d'irraggiamento maggiori dimostra una diminuzione del picco relativo alla monocumarina (attribuito mediante confronto con lo standard sintetizzato in precedenza, e confermato via MS), il cui valore integrale diminuisce di due terzi circa (fig. 3.38). Il metodo HPLC utilizzato prevede un gradiente da H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 15:85 a H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 60:40 in 15', con un flusso pari a 1 mL/min su colonna analitica achirale Agilent C<sub>18</sub>.

Si ha dunque conferma della diminuzione di monocumarina, ma non si riesce a monitorare il concomitante aumento degli altri segnali, identificati come picchi 1, 2, 4-7, corrispondenti alla formazione della biscumarina. Si ripete perciò l'analisi impostando il

rivelatore a 280 nm, che negli spettri di assorbimento UV corrispondeva ad un valore di  $\lambda$  indicatore per idrogel a grado di *crosslinking* maggiore (fig. 3.39).

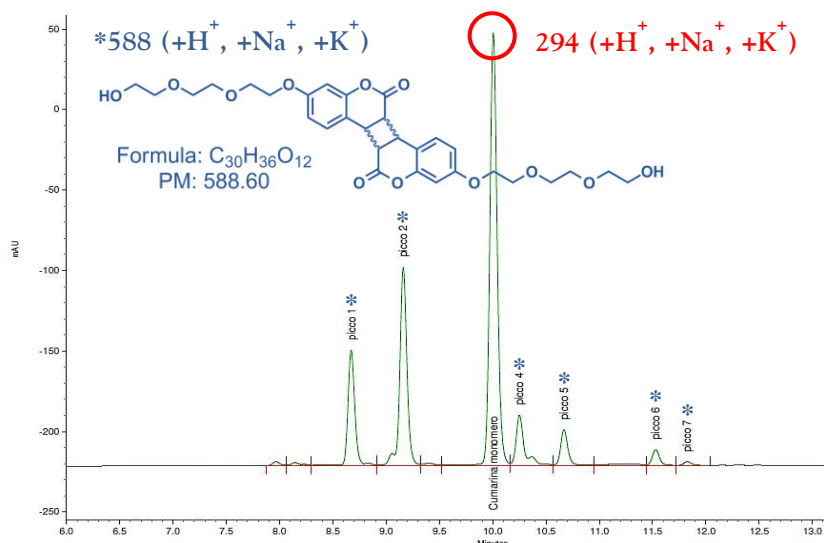


Figura 3.39: Cromatogramma HPLC da idrolisi dell'idrogel –  $t$ : 3h (a 280 nm).

Tempo irr. [h]	$A_{\text{picco1}}$	$A_{\text{picco2}}$	$A_{\text{picco3}}$	$A_{\text{picco4}}$	$A_{\text{picco5}}$	$A_{\text{picco6}}$	$A_{\text{picco7}}$
0	31959	72846	3176008	0	16709	8982	0
1	123284	287125	2406320	74867	41827	15160	3236
2	295584	508360	1567300	159338	106014	46560	11547
3	323811	576587	1279047	173102	106326	46951	12225

Tabella 3.8: Integrali dei picchi corrispondenti a mono- e bis- cumarina (a 280 nm).

In questo caso dal cromatogramma si riesce a rilevare, oltre alla diminuzione del picco 3 corrispondente alla monocumarina, l'incremento degli altri sei picchi, confermati come biscumarina (588.60 u) a seguito di analisi di massa.

La biscumarina possiede quattro stereocentri, pertanto il numero teorico di possibili isomeri è 16, che attraverso opportune operazioni di simmetria e considerando che la reazione di cicloadizione è concertata, si riduce a 4 (vedi anche Par. 3.1.5 b). La possibile apertura del lattone cumarinico in ambiente basico viene esclusa, dal momento che lo *step* finale della preparazione dei campioni prevede la neutralizzazione della soda con HCl 1.0 M e l'analisi HPLC viene effettuata con TFA (0.1%). Si ammette dunque che il trattamento basico di idrolisi possa indurre una parziale racemizzazione di due delle quattro strutture, portando a sei i prodotti di cicloadizione.

Gli andamenti delle aree dei picchi relativi a mono- e bis- cumarina vengono rappresentati in funzione del tempo nel grafico sottostante (fig. 3.40). Appare evidente come i due gruppi di dati siano perfettamente complementari tra loro: al diminuire del derivato monomero aumenta proporzionalmente la forma dimerica, supportando quanto ipotizzato finora.

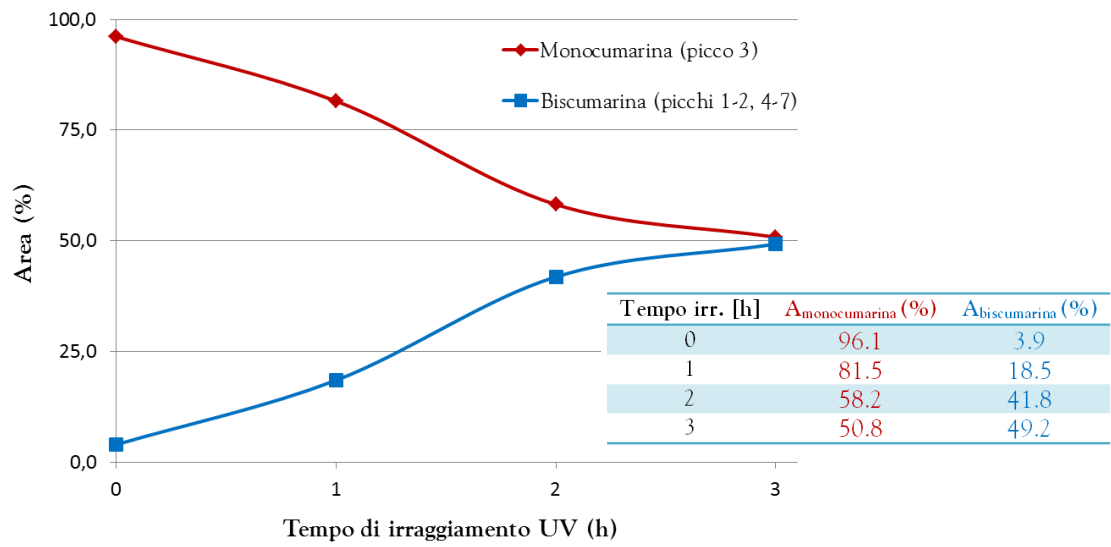


Figura 3.40: Cinetica di formazione del crosslinking.

### 3.8.2. Misure reologiche sugli idrogel

Le misure reologiche vengono effettuate a 25 °C, in regime oscillatorio:  $G'$  (modulo elastico) e  $G''$  (modulo viscoso) vengono rilevati in Pa da 0.07 a 90.0 rad/s, a un valore di sforzo del 10%. I valori, ottenuti da campioni gelificati tal quali (1.5 g) dopo irraggiamento, vengono correlati direttamente alla percentuale di *crosslinking*. Questa viene calcolata direttamente dalla variazione percentuale dell'area del picco 3 nei cromatogrammi (Par. 3.8.1), tenendo conto che la stechiometria della reazione è 2:1 (per ogni biscumarina fotopolimerizzata occorrono due monocumarine disponibili), e assumendo che a  $t_0$  la percentuale di fotopolimerizzazione sia nulla.

Come si può notare dal diagramma sotto riportato (fig. 3.41), l'andamento del modulo elastico  $G'$  (espresso in Pa a 0.628 rad/s) è proporzionale a quello del grado di *crosslinking*: soluzioni irradiate per un tempo maggiore sono quindi più reticolate e manifestano di conseguenza proprietà visco-elastiche migliori.

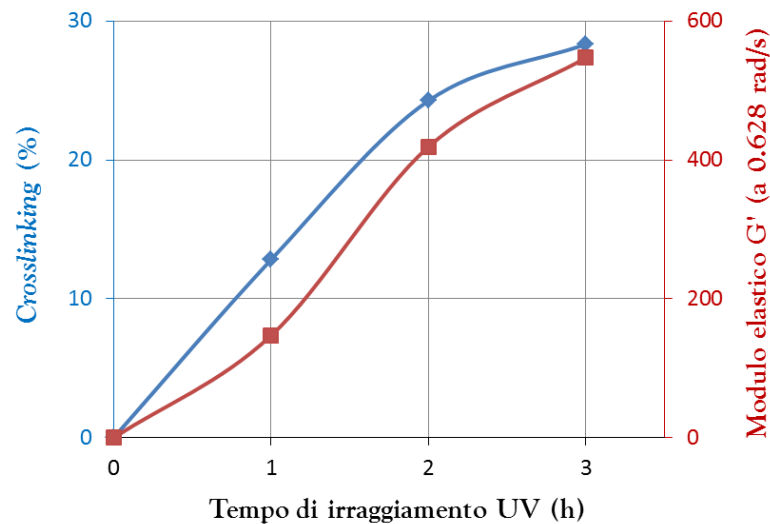


Figura 3.41: Crosslinking (%) e  $G'$  in funzione del tempo d'irraggiamento.

### 3.9. Conclusioni

Nell'ambito del progetto di collaborazione tra l'Università Ca' Foscari di Venezia e l'azienda Fidia Farmaceutici S.p.A. di Abano Terme è stata messa a punto la sintesi di derivati cumarinici dell'acido ialuronico (PM: 200 kDa) capaci di fotopolimerizzare tramite cicloaddizione fotochimica a seguito di irraggiamento ultravioletto ( $330 < \lambda < 370$  nm), sia in forma di esteri che in forma di ammidi. Test di gelificazione hanno fatto propendere per uno studio teorico e applicativo approfondito sui derivati esterei, dotati di caratteristiche fisico-meccaniche più promettenti. Esperimenti di spettroscopia NMR hanno permesso di dimostrare la formazione del legame estereo covalente tra il gruppo acido dell'HA e il residuo cumarinico provvisto di PEG (trietilenglicole), fondamentale per migliorare l'idrosolubilità dei derivati e generare veri e propri idrogel "parete-parete". Tramite HPLC invece è stato possibile ottimizzare due metodi per la determinazione del grado di derivatizzazione effettivo dell'HA e per seguire la cinetica di reazione. Da questi si è compreso che la derivatizzazione effettiva raggiunge in media l'80% di quella teorica calcolata, e che 48h rappresenta una giusta durata di reazione, poiché corrisponde ad un grado di conversione superiore al 90%. Lo studio della polimerizzazione fotochimica, effettuato avvicinandosi quanto più possibile alle condizioni finali d'uso del prodotto, ha portato all'ottenimento di idrogel "parete-parete" in tempi molto contenuti (3-5' con fibra ottica, 10-20' con una normale lampada di Wood). Questi hanno dimostrato un ottimo comportamento se tagliati, con il mantenimento della propria forma, e le loro proprietà di rigonfiamento si sono rivelate inversamente proporzionali al tempo d'irraggiamento. Misure reologiche hanno permesso di valutare una più che buona resistenza degli idrogel, stabili almeno fino a 14 giorni in plasma artificiale, mentre test di gelificazione *in vitro* su condilo femorale bovino hanno dato esito positivo per quanto riguarda l'adesività dell'idrogel alla struttura biologica di contenimento e la resistenza dello stesso in plasma artificiale per qualche giorno. È stato infine messo a punto un metodo HPLC-MS per determinare il grado di *crosslinking* effettivo, valutato direttamente proporzionale al tempo di irraggiamento ed alla viscoelasticità del polimero.

Tutto il lavoro contenuto in questo terzo capitolo di tesi è stato depositato come Brevetto per Invenzione Industriale ad opera di Fidia Farmaceutici S.p.A. ("Derivati fotoreticolati di acido ialuronico, loro processo di preparazione ed impiego").<sup>118</sup>

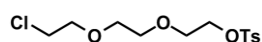
### 3.10. Parte sperimentale

#### 3.10.1. Strumentazione, reagenti e solventi

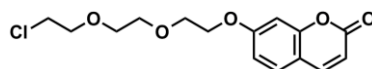
Le reazioni vengono seguite attraverso TLC POLYGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub> di 0.25 mm di spessore. Le cromatografie flash sono effettuate utilizzando gel di silice MERK 60, 0.04-0.063 mm/230-400 mesh, secondo le metodologie e le strumentazioni descritte da Still.<sup>119</sup> Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR vengono registrati con uno spettrometro VARIAN UNITY 400 MHz, utilizzando tetrametilsilano come riferimento interno. Gli spettri NMR COSY sono ottenuti con la usuale sequenza di impulsi. Le trasformazioni lungo t1 e t2 sono pesate con le opportune *non-shifted sine functions* e fasate con la tecnica *absolute value*. Gli spettri NMR NOESY vengono ottenuti con la normale sequenza di impulsi e con un *mixing time* di 1.8 secondi. La massima sensibilità si ottiene non applicando alcuna funzione lungo t2 e con una *non shifted gaussian function* lungo t1. Gli spettri eterocorrelati sono ottenuti con la tecnica *reverse detection*. Gli spettri UV sono registrati con un PERKIN ELMER LAMBDA 40 UV/VIS SPECTROMETER con un PERKIN ELMER PTP 6 PELTIER *temperature programmer* impostato a 25 °C. Gli spettri IR sono acquisiti con un PERKIN ELMER SPECTRUM ONE FT-IR SPECTROMETER. Le analisi HPLC vengono effettuate utilizzando un AGILENT 1200 SERIES, con una colonna analitica C<sub>18</sub>, utilizzando il metodo di volta in volta specificato. I dati reologici vengono rilevati con un THERMO HAAKE MARS II a 25 °C, equipaggiato con un cono avente diametro 6 cm e angolo pari a 1°. La reologia è una misura fisica che permette di misurare la risposta visco-elastica ad una deformazione o flusso a cui viene sottoposto il materiale. Generalmente un polimero pseudo-plastico in soluzione ad una determinata concentrazione costituisce un gel se il modulo elastico G' è maggiore del modulo viscoso G'', e viceversa una soluzione viscosa. Tutte le misure sono effettuate in regime oscillatorio. I valori di G' e di G'' sono rilevati in Pa da 0.07 a 90.0 rad/s, impostando il valore di sforzo al 10% (inizialmente si è verificato che nell'intervallo di misura ci sia una risposta lineare tra moduli visco-elastici (G' e G'') e forza applicata ( $\gamma$ ) alla frequenza di lavoro di 6.28 rad/s, e tale risposta è valida per un valore di sforzo del 10%). Tutti i reagenti e i solventi commerciali vengono impiegati senza ulteriori purificazioni, salvo diversamente specificato. I solventi definiti "anidri" vengono purificati secondo procedure riportate in letteratura<sup>120</sup> (eventualmente conservati qualche giorno su setacci molecolari); in particolare THF viene anidrificato per distillazione da sodio e benzofenone, mentre DMF e NMP da calcio idruro.



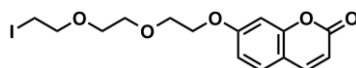
## 3.10.2. Prodotti e caratterizzazione

2-(2-(2-(2-cloroetossi)etossi)etil 4-metilbenzenesolfonato<sup>105</sup>

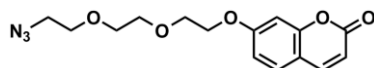
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, flusso d'argon e bagno a ghiaccio s'introduce  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro (180.0 mL), (2-(2-(2-cloroetossi)etossi)etanololo (10.0 mL, 68.79 mmol), trietilammina (10.55 mL, 75.67 mmol) e DMAP (16.8 g, 137.59 mmol). Si aggiunge quindi, mantenendo la T a 0 °C e sotto flusso d'argon, tosilcloruro (14.43 g, 75.67 mmol) disciolto in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro (60.0 mL). Si lascia procedere la reazione a 0 °C per 1h 30', quindi a temperatura ambiente per 3h 30'. Dopo aver lavato la fase organica con acqua, HCl 1N,  $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$  saturo e  $\text{NaCl}(\text{aq})$  saturo, questa viene seccata su  $\text{MgSO}_4$ , quindi si rimuove il solvente a bassa pressione. Il prodotto, che non necessita di ulteriore purificazione, si presenta sotto forma di olio giallino trasparente (20.8 g, resa: 94%). Lotti realizzati su quantitativi minori di substrato iniziale prevedono invece la purificazione mediante FC (miscela eluente Cy-Hex/ $\text{Et}_2\text{O}$  4:1).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.79 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.34 (2H, d,  $J=8.5$  Hz), 4.16 (2H, t,  $J = 4.8$  Hz), 3.70 (4H, m), 3.60 (6H, m), 2.44 (3H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 144.9, 133.0, 129.9, 128.0, 71.4, 70.7, 70.6, 69.3, 68.8, 42.8, 21.7. PM ( $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{ClO}_5\text{S}$ ): 322.80 u.

7-(2-(2-(2-(2-cloroetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one<sup>90c</sup>

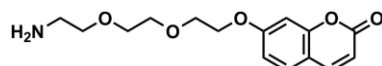
In un pallone a due colli dotato di agitazione meccanica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon s'introduce umbelliferone (18.3 g, 112.87 mmol), acetone (200.0 mL), 2-(2-(2-cloroetossi)etossi)etil 4-metilbenzenesolfonato (39.0 g, 120.82 mmol) ripreso con acetone (600 mL),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (93.6 g, 677.2 mmol) e 18-crown-6 in quantità catalitica (~300 mg). Si lascia procedere la reazione a riflusso sotto agitazione complessivamente per 48h, monitorandola di frequente mediante spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR e aggiungendo in totale ulteriori 1.65 g di umbelliferone. Si raffredda la miscela di reazione a temperatura ambiente, quindi si filtra su imbuto Gooch con celite e si rimuove il solvente a bassa pressione. Il prodotto si presenta sotto forma di solido cristallino bianco, e non necessita di ulteriore purificazione (35.9 g, resa: 95%). Lotti realizzati su quantitativi minori di substrato iniziale prevedono invece la purificazione mediante FC (miscela eluente Cy-Hex/ $\text{AcOEt}$  9:1).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 7.63 (1H, d,  $J = 9.4$  Hz), 7.37 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 6.90-6.80 (2H, m), 6.26 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz), 4.22-4.15 (2H, m), 3.94-3.87 (2H, m), 3.79-3.60 (8H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm): 162.1, 161.3, 155.9, 143.5, 128.9, 113.3, 113.1, 112.8, 101.7, 71.5, 70.8, 69.6, 68.1, 56.4, 42.9. PM ( $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClO}_5$ ): 312.75 u.


**7-(2-(2-(2-iodoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one<sup>90c,106</sup>**

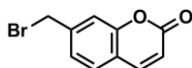
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio e refrigerante s'introduce 7-(2-(2-(2-cloroetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one (2.5 g, 7.96 mmol) e acetone (50 mL). Si aggiunge quindi NaI (8.35 g, 55.73 mmol) e si lascia procedere la miscela a riflusso sotto agitazione per 48h. Si effettua il work-up lasciando raffreddare, filtrando su imbuto Gooch e celite, quindi rimuovendo il solvente a bassa pressione. Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di solido bianco cristallino (3.18 g, resa: 99%). *Reazione su scala maggiore:* In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio e refrigerante s'introduce 7-(2-(2-(2-cloroetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one (37.8 g, 120.8 mmol) e acetone (800 mL). Si aggiunge quindi NaI (126.7 g, 845.6 mmol) e si lascia procedere la miscela a riflusso sotto agitazione per 5 giorni. Si effettua il work-up lasciando raffreddare, filtrando su imbuto Gooch e celite, quindi rimuovendo il solvente a bassa pressione. Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di solido bianco cristallino a seguito di FC (miscela eluente Cy-Hex/AcOEt 9:1) (34.83 g, resa: 71%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.63 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.37 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.89-6.84 (2H, m), 6.26 (1H, d, J = 9.5 Hz), 4.24-4.15 (2H, m), 3.95-3.88 (2H, m), 3.80-3.66 (6H, m), 3.26 (2H, t, J = 6.9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 175.2, 162.1, 161.3, 155.9, 143.5, 128.9, 113.3, 113.1, 112.8, 101.7, 72.1, 71.0, 70.4, 69.6, 68.1. <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 161.6, 160.2, 155.3, 144.2, 129.4, 112.7, 112.5, 112.4, 101.2, 71.0, 69.9, 69.3, 68.7, 67.9, 5.4. PM (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>IO<sub>5</sub>): 404.20 u.


**7-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one<sup>109</sup>**

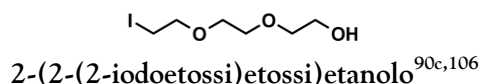
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio e refrigerante, s'introduce 7-(2-(2-(2-iodoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one (5.0 g, 12.37 mmol), NaN<sub>3</sub> (2.41 g, 37.11 mmol) e acqua distillata (35 mL). Si lascia procedere la reazione a riflusso sotto agitazione per 4h, quindi si estrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, si secca su MgSO<sub>4</sub> e si filtra su imbuto Gooch. Il solvente viene rimosso a bassa pressione. Il prodotto viene purificato mediante FC (eluente: Cy-Hex/AcOEt 2:1). Il prodotto purificato si presenta sotto forma di olio trasparente giallino (3.39 g, resa: 86%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.63 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.36 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.88-6.82 (2H, m), 6.24 (1H, d, J = 9.5 Hz), 4.20-4.17 (2H, m), 3.91-3.88 (2H, m), 3.75-3.67 (6H, m), 3.37 (2H, m). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 162.1, 161.3, 155.9, 143.5, 128.8, 113.3, 113.1, 112.8, 101.7, 71.0, 70.8, 70.2, 69.6, 68.1, 50.8. IR (liq., NaCl), cm<sup>-1</sup>: 2924 (m), 2871 (m), 2101 (s), 1730 (vs), 1613 (vs), 1554 (m), 1506 (m), 1453 (w), 1429 (w), 1402 (m), 1349 (w), 1293 (s), 1279 (s), 1231 (s), 1202 (m), 1122 (vs), 1053 (m), 994 (m), 914 (w), 893 (w), 836 (vs), 751 (w), 732 (w). PM (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>): 319.31 u.

7-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one<sup>114</sup>

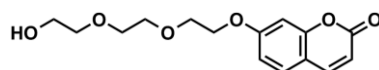
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e refrigerante si discioglie 7-(2-(2-(2-azidoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one (2.0 g, 6.26 mmol) in EtOH assoluto (80 mL), quindi si aggiunge Pd/C 5% in quantità catalitica (0.1 eq.) e si crea nell'ambiente di reazione un'atmosfera idrogenata. Si lascia procedere la reazione sotto agitazione per 1h 30', quindi si effettua il work-up filtrando la miscela su imbuto Gooch e celite. Il solvente viene rimosso a bassa pressione. Si ha la formazione esclusiva del prodotto desiderato, che si presenta sotto forma di olio trasparente giallino (1.815 g, resa: 99%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.63 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.36 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.88-6.83 (2H, m), 6.25 (1H, d, J = 8.0 Hz), 4.19 (2H, t, J = 4.0 Hz), 3.89 (2H, t, J = 4.0 Hz), 3.74-3.72 (2H, m), 3.67-3.64 (2H, m), 3.52 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.87 (2H, t, J = 8.0 Hz), 1.65 (2H, s, broad). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 170.4, 162.1, 161.3, 155.8, 143.5, 128.9, 113.1, 112.8, 101.6, 73.1, 70.9, 70.3, 69.5, 68.1, 41.7. PM (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>): 293.32 u.

7-(bromometil)-2H-cromen-2-one<sup>115a</sup>

In un pallone a due colli dotato di bagno ad olio, agitazione magnetica e refrigerante s'introduce 7-(metil)-cumarina (3.0 g, 18.73 mmol), N-bromosuccinimide (3.34 g, 18.73 mmol) e CCl<sub>4</sub> (80 mL). Sotto agitazione s'introduce AIBN (31 mg, 0.18 mmol) e si lascia procedere a refluxo (110 °C) sotto agitazione per 1h 30'. Si porta la temperatura a 25 °C, si aggiungono 0.1 eq di NBS seguiti da 0.001 eq di AIBN e lascia procedere la reazione a refluxo per un'altra ora. Si lascia raffreddare e si rimuove il solvente a rotavapor (50 °C) e pompa meccanica, quindi si riprende con acqua e si lascia procedere per 1h sotto agitazione. Si filtra su imbuto Gooch, si riprende il precipitato con acqua e si lascia procedere sotto agitazione per altri 30'. Si filtra su imbuto Gooch, quindi si rimuove il solvente mediante pompa meccanica. Il prodotto desiderato, che si presenta sotto forma di solido polverulento giallino, non necessita di ulteriore purificazione (4.26 g, resa: 95%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.69 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.47 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.37-7.34 (1H, m), 7.34-7.29 (1H, m), 6.44 (1H, d, J = 9.5 Hz), 4.52 (2H, s). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), δ (ppm): 160.5, 154.1, 142.9, 142.1, 128.4, 125.3, 118.8, 117.4, 117.2, 32.0. IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 1171 (w, broad), 1724 (vs), 1714 (vs), 1700 (vs), 1695 (vs), 1653 (m), 1621 (vs), 1555 (s), 1500 (m), 1442 (m), 1417 (s), 1397 (s), 1275 (m), 1219 (s), 1194 (s), 1148 (w), 1133 (s), 1118 (m), 1101 (s), 985 (m), 904 (m), 894 (m), 874 (m), 845 (s), 820 (m), 757 (s), 705 (m), 686 (m), 654 (s), 618 (m), 552 (m). PM (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub>): 239.32 u.

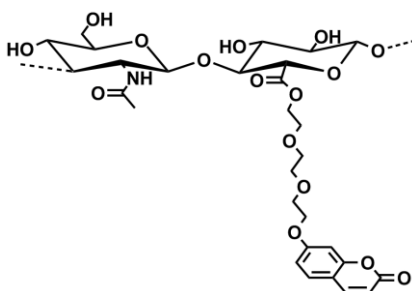


In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio e refrigerante s'introduce 2-[2-(2-cloroetossi)etossi]etanolo (1.0 g, 6.88 mmol) e acetone (50 mL). Si aggiunge quindi NaI (7.22 g, 48.16 mmol) e si lascia procedere la miscela a riflusso sotto agitazione per 24h. Si effettua il work-up lasciando raffreddare, filtrando su imbuto Gooch e celite, quindi rimuovendo il solvente a bassa pressione. La fase organica viene ripresa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavata per tre volte con H<sub>2</sub>O, e seccata su MgSO<sub>4</sub>. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta, fornendo il prodotto desiderato sotto forma di liquido giallino, che non necessita di ulteriore purificazione (0.98 g, resa: 55%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 3.80-3.73 (4H, m), 3.71-3.66 (4H, m), 3.66-3.61 (2H, m), 3.28 (2H, t, J = 6.8 Hz). PM (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>IO<sub>3</sub>): 260.07 u.



7-(2-(2-(2-idrossietossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one

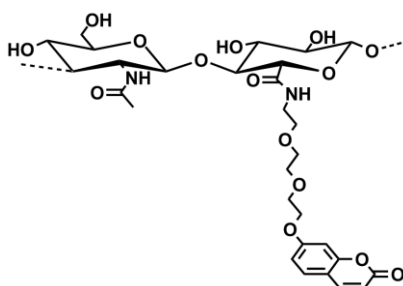
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, bagno ad olio, refrigerante e flusso d'argon s'introduce umbelliferone (0.5 g, 3.08 mmol), acetone (60 mL), 2-(2-(2-iodoetossi)etossi)etanolo (0.85 g, 3.29 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.55 g, 18.50 mmol). Si lascia procedere la reazione sotto agitazione a riflusso per 24h. Si effettua il work-up raffreddando, filtrando su imbuto Gooch e celite, quindi rimuovendo il solvente a bassa pressione. Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di solido viscoso giallo (resa: 96%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ (ppm): 7.98 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.62 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.03-6.92 (2H, m), 6.28 (1H, d, J = 9.5 Hz), 4.61 (1H, s, *broad*), 4.24-4.15 (2H, m), 3.81-3.72 (2H, m), 3.61-3.56 (2H, m), 3.56-3.51 (2H, m), 3.51-3.45 (2H, m), 3.45-3.40 (2H, m). PM (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>): 294.30 u.



HA-PEG-cumarina (estere)

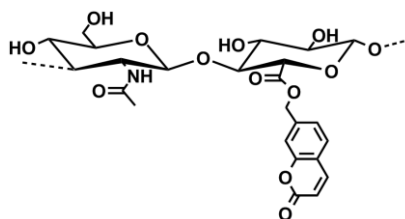
*Procedura generica per l'ottenimento di un derivato estereo dell'HA (agente di esterificazione: 7-(2-(2-(2-iodoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one).* In un reattore in vetro dotato di camicia termostatabile a glicole ed agitazione magnetica, si discioglie HATBA (2.0 g, 3.22 mmol) in DMSO anidro (240 mL), quindi si aggiunge 7-(2-(2-(2-iodoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one nella quantità stechiometrica desiderata (*i.e.* 0.4 eq: 0.52 g, 1.29 mmol, per una derivatizzazione teorica pari al 40%). Si lascia procedere la reazione per 96h a 40 °C, quindi

si effettua il work-up aggiungendo lentamente sotto agitazione  $\text{NaBr}_{(\text{aq})}$  saturo (40 mL) e precipitando il prodotto da EtOH freddo (280 mL), introdotto goccia a goccia. Il prodotto viene purificato mediante lavaggi con miscela EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  95:5 (aliquote da 200 mL) ed EtOH assoluto, quindi filtrato su imbuto Gooch e seccato in alto vuoto. Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di solido polverulento bianco (i derivati esterei vengono ottenuti con una resa media dell'82%, e rivelano una derivatizzazione media effettiva pari al 79% di quella teorica). IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434 (vs, broad), 2918 (w), 1737 (m), 1706 (m), 1613 (s), 1558 (m), 1507 (vw), 1406 (m), 1381 (m), 1351 (w), 1295 (w), 1233 (w), 1205 (w), 1079 (s), 1046 (s), 942 (vw), 897 (vw), 841 (vw). UV-Vis ( $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$  0.9%),  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 320. PM ( $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_{16}$ ): 685.67 u.



HA-PEG-cumarina (ammide)<sup>28</sup>

Procedura generica per l'ottenimento di un derivato ammidico dell'HA (agente di ammidazione: 7-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one). In un reattore in vetro dotato di camicia termostabile a glicole ed agitazione magnetica, si discioglie HATBA (1.0 g, 1.61 mmol) in DMSO anidro (200 mL). Si aggiunge  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  (16  $\mu\text{L}$ , 0.24 mmol: 15% mol/mol) e CDI (78 mg, 0.48 mmol), quindi si lascia procedere la reazione sotto agitazione a 25 °C per 1h. S'introduce 7-(2-(2-(2-amminoetossi)etossi)etossi)-2H-cromen-2-one in eccesso (almeno 6 eq) e si lascia procedere la reazione sotto agitazione a 42 °C per 20h. Si effettua il work-up aggiungendo lentamente sotto agitazione  $\text{NaBr}_{(\text{aq})}$  saturo (20 mL) e precipitando il prodotto da EtOH freddo (180 mL), introdotto goccia a goccia. Il prodotto viene purificato mediante lavaggi con miscela EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1 (aliquote da 200 mL) ed EtOH assoluto, quindi filtrato su imbuto Gooch e seccato in alto vuoto. Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di solido polverulento bianco (i derivati ammidici vengono ottenuti con una resa media dell'80%, senza stimare il grado di derivatizzazione effettivo). IR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3451 (vs, broad), 2920 (m), 1700 (vs), 1617 (vs), 1559 (s), 1411 (s), 1377 (s), 1323 (m), 1297 (m), 1236 (m), 1207 (m), 1154 (s), 1079 (vs), 1033 (vs), 947 (m), 893 (w). UV-Vis ( $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$  0.9%),  $\lambda_{\text{max}}$  (nm): 324. PM ( $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{15}$ ): 684.69 u.



HA-cumarina (estere)

*Procedura generica per l'ottenimento di un derivato cumarinico dell'HA (estere) senza PEG.*  
 In un reattore in vetro dotato di camicia termostatabile a glicole ed agitazione magnetica si discioglie HATBA (2.0 g, 3.22 mmol) in DMSO anidro (240 mL). S'introduce 7-bromometil-2H-cromen-2-one nella quantità stechiometrica desiderata (*i.e.* 0.4 eq: 0.31 g, 1.29 mmol, per una derivatizzazione teorica pari al 40%) e si lascia procedere la reazione a 40 °C per un tempo variabile da 24 a 72h. Si porta la miscela a temperatura ambiente, quindi si effettua il work-up aggiungendo lentamente sotto agitazione NaBr<sub>(aq)</sub> saturo (40 mL) e precipitando il prodotto da EtOH freddo (280 mL), introdotto goccia a goccia. Il prodotto viene purificato mediante lavaggi con miscela EtOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (aliquote da 100 mL) ed EtOH assoluto, quindi filtrato su imbuto Gooch e seccato in alto vuoto. Si ottiene un composto polverulento bianco, che viene lasciato a seccare in pompa meccanica una notte (1.320 g, resa: 90%). IR (KBr), cm<sup>-1</sup>: 3417 (vs, *broad*), 2890 (w), 1731 (m), 1703 (m), 1622 (vs), 1558 (m), 1404 (m), 1381 (m), 1311 (w), 1202 (w), 1146 (m), 1076 (vs), 1043 (vs), 945 (vw), 895 (vw), 844 (vw). UV-Vis (NaCl<sub>(aq)</sub> 0.9%),  $\lambda_{\max}$  (nm): 279, 312. PM (C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>13</sub>): 567.54 u.

**Plasma artificiale:** 700 mL di acqua vengono posti in blanda agitazione a 37 °C. Nell'ordine riportato vengono aggiunti i seguenti reagenti, attendendo la completa solubilizzazione prima di aggiungere il reagente che segue. NaCl (7.996 g), NaHCO<sub>3</sub> (0.350 g), KCl (0.224 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (0.228 g), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.305 g), HCl 1.0 M (40 mL – aggiungerne 36 mL e usare i successivi per portare a pH), CaCl<sub>2</sub> (0.278 g), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.071 g), (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> (6.057 g). Portare il pH a 7.4 (sempre a 37 °C, con il restante HCl, e portare ad un volume pari a 1L).

## Appendice E – Metodo HPLC per la stima del grado di derivatizzazione (esteri)

Come standard per realizzare la retta di taratura all'HPLC si utilizza la 7-(idrossi)-PEG-cumarina (vedi Par. 3.3.3), valutandone la presenza percentuale a seguito delle prove di lavaggio e idrolisi.<sup>90c,106</sup> Di seguito si riportano i cromatogrammi relativi ai due standard (HA-PEG-cumarina e 7-(idrossi)-PEG-cumarina, con il gradiente utilizzato per tutte le analisi HPLC effettuate. Si parte dal 100% di fase A per arrivare al 100% di fase B nell'arco di 20'.

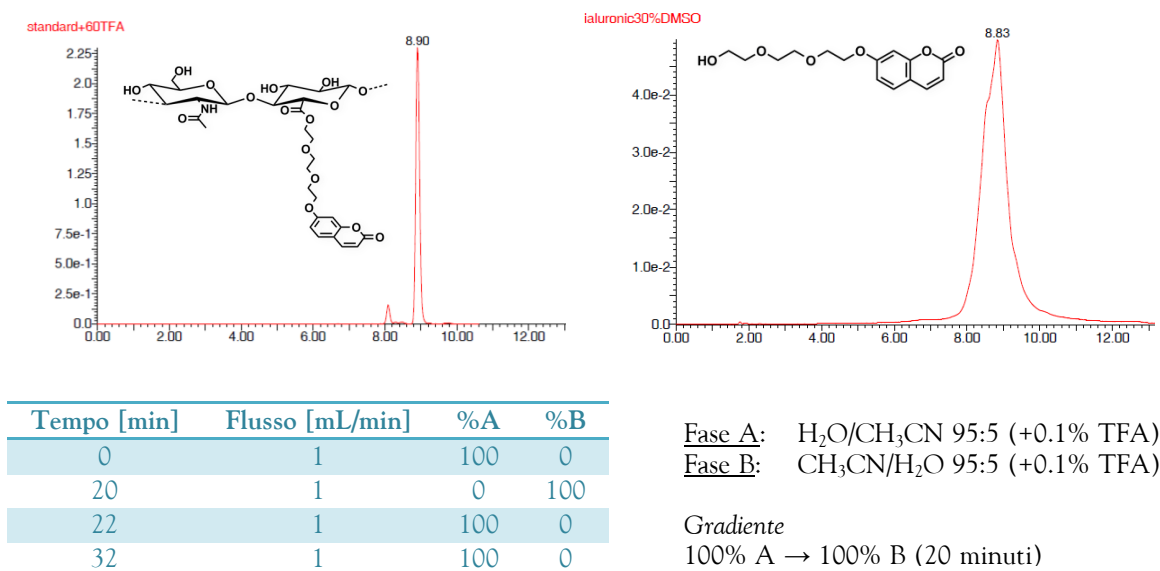
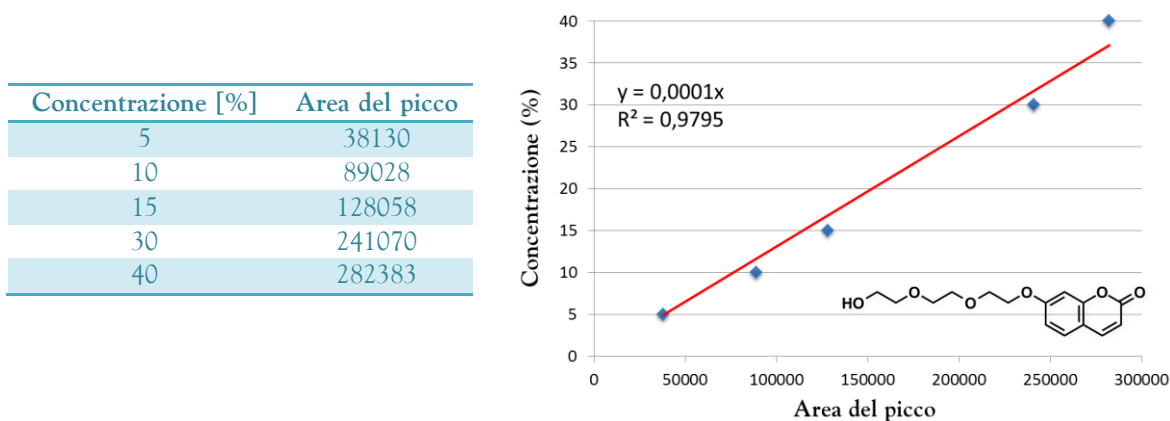


Figura E1: Cromatogrammi degli standard e metodo HPLC utilizzato.

Per realizzare una retta di taratura valida si parte dal considerare una funzionalizzazione teorica dell'acido ialuronico pari al 100%. Poiché da 50 mg di prodotto si potrebbero produrre al massimo 22.5 mg di 7-(idrossi)-PEG-cumarina, si realizza una soluzione madre di 7-(idrossi)-PEG-cumarina in EtOH (22.5 mg in 10 mL), e da opportune diluizioni si ricavano le soluzioni a concentrazione rispettivamente 5, 10, 15, 30 e 40%. I campioni per l'iniezione in HPLC vengono preparati prelevando 2.5 mL di soluzione alcolica e portandola a volume (5 mL) con fase A. Di seguito si riporta la retta di taratura ottenuta, seguita dai rispettivi cromatogrammi di origine (fig. E2).



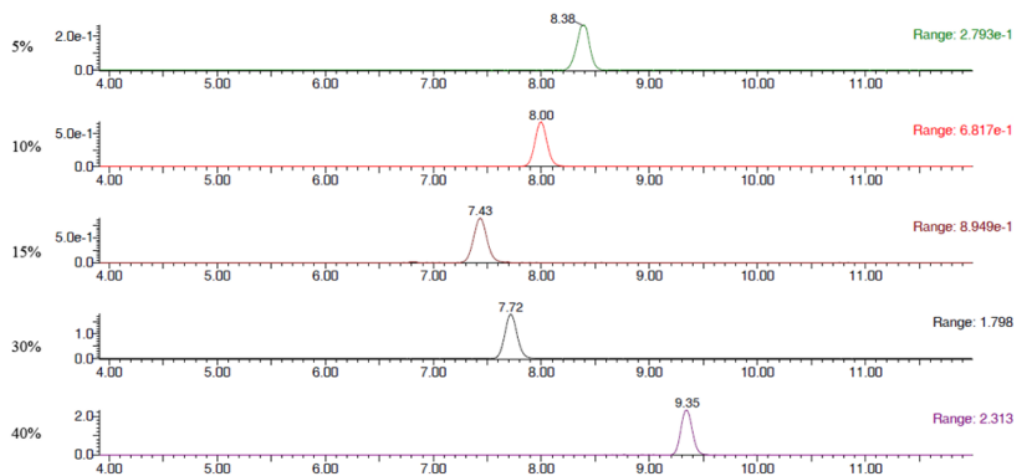


Figura E2: Retta di taratura e cromatogrammi per lo standard 7-(idrossi)-PEG-cumarina.

Di seguito si riportano i cromatogrammi relativi alla stima della cumarina libera e “covalente” per il lotto 010 (HA-PEG-cumarina con una derivatizzazione teorica pari al 40%) e quello relativo allo standard 7-(idrossi)-PEG-cumarina. Per la valutazione della cumarina libera i campioni vengono preparati prelevando 2.5 mL di soluzione alcolica e portandola a 5 mL con fase A. Per la valutazione della cumarina “covalente” invece, dopo aver prelevato 2.5 mL di soluzione basica ed averla portata a 5 mL con fase A, si aggiunge TFA (60  $\mu$ L) per portare il pH a neutralità. Come si può osservare dalla tabella 3.6, reazioni condotte pressoché nelle medesime condizioni portano ad un grado di derivatizzazione effettivo medio del 33.2% (durata reazione: 24h), o del 31.6% (durata reazione: 96h).

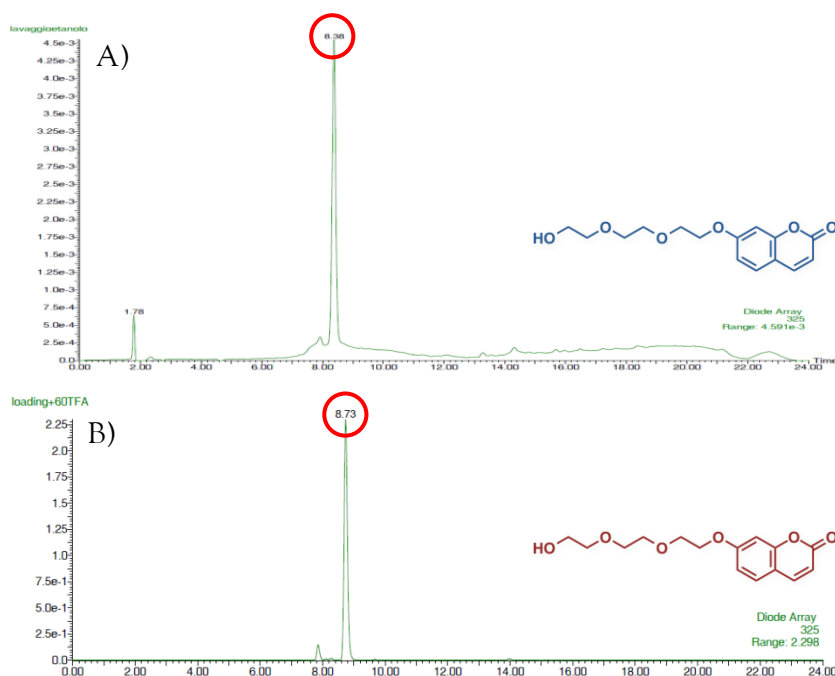


Figura E3: Cromatogrammi per 7-(idrossi)-PEG-cumarina da lavaggio alcolico (A) e idrolisi (B).



Lotto #	010	016	022	023	027	033	034	036	037
Derivatizzazione % (teorica)	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Durata [h]	48	48	48	48	96	96	96	96	96
Resa [%]	81	80	77	71	92	92	95	95	93
Cumarina libera [%]	0.06	0.15	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Derivatizzazione % (effettiva)	29.9	36.8	33.5	32.5	32.0	33.0	31.0	30.0	32.0

**Tabella E1:** *Derivatizzazione percentuale effettiva dei lotti HA-PEG-cumarina (estere).*

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Burdik, J. A.; Prestwich, G. D. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H41-H56.
- 2 Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B. *J. Intern. Med.* **1997**, *242*, 27.
- 3 Kogan, G.; Soltés, L.; Stern, R.; Gemeiner, P. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*(1), 17-25.
- 4 Campoccia, D.; Doherty, P.; Radice, M.; Brun, P.; Abatangelo, G.; Williams, D. F. *Biomaterials* **1998**, *19*, 2101-2127.
- 5 (a) Toole, B. P. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2001**, *12*, 79. (b) Toole, B. P. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 528.
- 6 Laurent, T. C.; Fraser, J. R. *Faseb J.* **1992**, *6*(7), 2397-2404.
- 7 (a) Presti, D.; Scott, J. *Cell Biochem. Function* **1994**, *12*, 281-288. (b) Abatangelo, G.; O'Regan, M. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* **1995**, *15*(1), 9-16.
- 8 Laurent, T. C.; Fraser, J. R. *Ciba Found. Symp.* **1986**, *124*, 9.
- 9 (a) Kuo, J. W. "Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products", CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, **2006**. (b) Gerecht, S.; Burdick, J. A.; Ferreira, L. S.; Townsend, S. A.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*(27), 11298-11303.
- 10 (a) Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2131. (b) Prestwich, G. D. *Organogenesis* **2008**, *4*, 42. (c) Condie, R. C.; Prestwich, G. D. in "Injectable Biomaterials: Science and Application", B. Vernon ed., Woodhead Publishing, London, **2010**. (d) Prestwich, G. D.; Ghaly, T.; Brudnicki, P.; Ratliff, B.; Goligorsky, M. S. in "Regenerative Nephrology", M. S. Goligorsky ed., Elsevier, **2010**.
- 11 (a) Vercruyse, K. P.; Prestwich, G. D. *Crit. Rev. Therapeut. Carrier Syst.* **1998**, *15*, 513-555. (b) Prestwich, G. D.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Vercruyse, K. P.; Ziebell, M. R. *J. Controlled Release* **1997**, *53*, 99. (c) Abatangelo, G.; Weigel, P. "New Frontiers in Medical Sciences: Redefining Hyaluronan", Elsevier, Amsterdam, **2000**. (d) Ossipov, D.A.; Piskounova, S.; Varghese, O. P.; Hilborn, J. *Biomacromolecules* **2010**, *11*(9), 2247-2254. (e) Yeom, J.; Bhang, S. H.; Kim, B. S.; Seo, M. S.; Hwang, E. J.; Cho, I. H. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*(2), 240-247.
- 12 Kuo, J. W.; Prestwich, G. D. in "Materials of Biological Origin – Materials Analysis and Implant Uses, Comprehensive Biomaterials", P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, J. Kirkpatrick ed., Elsevier, **2010**.
- 13 Sliktar, D. *Science* **2012**, *336*, 1124-1128.
- 14 Nicolson, P. C.; Vogt, J. *Biomaterials* **2001**, *22*, 3273.
- 15 Reece, T. B.; Maxey, T. S.; Kron, I. L. *Am. J. Surg.* **2001**, *182*, 40S.
- 16 (a) Winer, I.; Wang, S.; Lee, Y. E.; Fan, W.; Gong, Y.; Burgos-Ojeda, D. *Cancer Res.* **2010**, *70*(21), 8674-8683. (b) Garbern, J. C.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Biomacromolecules* **2010**, *11*(7), 1833-1839. (c) Lee, S. J.; Broda, C.; Atala, A.; Yoo, J. J. *Biomacromolecules* **2011**, *12*(2), 306-313. (d) Kang, S. W.; Kim, J. S.; Park, K. S.; Cha, B. H.; Shim, J. H.; Kim, J. Y. *Bone* **2011**, *48*(2), 298-306. (e) Kyle, S.; Aggeli, A.; Ingham, E.; McPherson, M. J. *Biomaterials* **2010**, *31*(36), 9395-9405. (f) Hiemstra, C.; Zhou, W.; Zhong, Z.; Wouters, M.; Feijen, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(32), 9918-9926.
- 17 (a) Lutolf, M. P.; Gilbert, P. M.; Blau, H. M. *Nature* **2009**, *462*, 433. (b) Hoare, T. R.; Kohane, D. S. *Polymer* **2008**, *49*, 1993. (c) Krishna, O. D.; Kiick, K. L. *Biopolymers* **2010**, *94*, 32. (d) Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345.
- 18 Tibbitt, M. W.; Anseth, K. S. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 655.
- 19 Patterson, J.; Siew, R.; Herring, S. W.; Lin, A. S.; Guldberg, R.; Stayton, P. S. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6772-6781.
- 20 Martino, M. M.; Abreu, A. C.; Barbosa, M. F.; Teixeira, J. E. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1089-1097.
- 21 Pangarkar, N.; Pharoah, M.; Nigam, A.; Hutmacher, D.; Champ, S. *Regen. Med.* **2010**, *5*, 823-835.
- 22 Prestwich, G. D. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101*, 1370.
- 23 Zhou, Y.; Ni, Y.; Liu, Y.; Zeng, B.; Xu, Y.; Ge, W. *Biomaterials* **2010**, *31*(20), 5325-5335.
- 24 Benedetti, L.; Cortivo, R.; Berti, T.; Berti, A.; Pea, F.; Mazzo, M.; Moras, M.; Abatangelo, G. *Biomaterials* **1993**, *14*, 1154-1160.
- 25 Barbucci, R.; Magnani, A.; Baszkin, A.; Da Costa, M. L.; Bauser, H.; Hellwig, G.; Martuscelli, E.; Cimmino, S. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1993**, *4*(3), 245-273.
- 26 (a) Cortivo, E.; Brun, P.; Rastrelli, A.; Abatangelo, G. *Biomaterials* **1991**, *12*, 727-730. (b) Campoccia, D.; Hunt, J. A.; Doherty, P. J.; Zhong, S. P.; Callegaro, L.; Benedetti, L.; Williams, F. *Biomaterials* **1993**, *14*(15), 1135-1139. (c) Campoccia, D.; Hunt, J. A.; Doherty, P. J.; Zhong, S. P.; O'Regan, M.; Benedetti, L.; Williams, F. *Biomaterials* **1996**, *17*(10), 963-965. (d) Zhong, S. P.; Campoccia, D.; Doherty, P. J.; Williams, R. L.; Benedetti, L.; Williams, F. *Biomaterials* **1994**, *15*(5), 359-365.

- 27 Sittinger, M.; Reitzel, D.; Dauner, M.; Hierlemann, H.; Hammer C.; Kastebauer, E.; Plank, H.; Burmester, G. R.; Bujia J. J. *Biomed. Mater. Res.* **1996**, *33*, 57-63.
- 28 (a) Righetto, Z.; Bellini, D. *European Patent* **1996**, EP0749446. (b) Bellini, D.; Topai, A. *European Patent* **2001**, EP1095064. (c) Bellini, D.; Schiavinato, A. *European Patent* **2007**, EP1853279 A1.
- 29 (a) Prestwich, G. D. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 139. (b) Serban, M. A.; Prestwich, G. D. *Methods* **2008**, *45*, 93.
- 30 (a) Shu, X. Z.; Liu, Y.; Luo, Y.; Roberts, M. C.; Prestwich, G. D. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1304-1311. (b) Shu, X. Z.; Ahmad, S.; Liu, Y.; Prestwich, G. D.; *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, *79A*, 902.
- 31 Shu, X. Z.; Liu, Y.; Palumbo, F.; Prestwich, G. D. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3825.
- 32 Vanderhooft, J. L.; Mann, B. K.; Prestwich, G. D. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2883.
- 33 Vanderhooft, J. L.; Alcoutlabi, M.; Magda, J. J.; Prestwich, G. D. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 20.
- 34 Nimmo, M. C.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 824-830.
- 35 (a) Mundy, G.; Garrett, R.; Harris, S.; Chan, J.; Chen, D.; Rossini, G. *Science* **1999**, *286*, 1946-1949. (b) Montagnani, A.; Gonnelli, S.; Cepollaro, C.; Pacini, S.; Campagna, M. S.; Franci, M. B. *Bone* **2003**, *32*(4), 427-433. (c) Hirakura, T.; Yasugi, K.; Nemoto, T.; Sato, M.; Shimoboji, T.; Aso, Y. *J. Control. Release* **2010**, *142*(3), 483-489. (d) Bryant, S. J.; Nuttelman, C. R.; Anseth, K. S. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, *11*(5), 439-457.
- 36 (a) Huisgen, R. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613. (b) Rostovtsev, V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596. (c) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- 37 Kolb, H.C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- 38 Crescenzi, V.; Cornelio, L.; Di Meo, C.; Nardecchia, S.; Lamanna, R. *Biomacromolecules* **2007**, *8*(6), 1844-1850.
- 39 Di Meo, C.; Panza, L.; Campo, F.; Capitani, D.; Mannina, L.; Banzato, A.; Rondina, M.; Rosato, A.; Crescenzi, V. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*,
- 40 DeForest, C.; Polizzotti, B.; Anseth, K. *Nat. Materials* **2009**, *8*, 659.
- 41 Testa, G.; Di Meo, C.; Nardecchia, S.; Capitani, D.; Mannina, L.; Lamanna, R.; Barbetta, A.; Dentini, M. *Int. J. Pharm.* **2009**, *378*, 86-92.
- 42 Pouyani, T.; Harbison, G. S.; Prestwich, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7515-7522.
- 43 Pouyani, T.; Prestwich, G. D. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 339.
- 44 Vercruyse, K. P.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Prestwich, G. D. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 686.
- 45 Darr, A.; Calabro, A. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20*, 33.
- 46 Chen, G. P.; Ito, Y.; Imanishi, Y.; Magnani, A.; Lamponi, S.; Barbucci, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 730-734.
- 47 Serban, M. A.; Prestwich, G. D. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2821.
- 48 (a) Jia, X. Q.; Burdick, J. A.; Kobler, J.; Clifton, R. J.; Rosowski, J. J.; Zeitels, S. M.; Langer, R. *Macromolecules* **2004**, *37*, 3239. (b) Jha, A. K.; Hule, R. A.; Jiao, T.; Teller, S. S.; Clifton, R. J.; Duncan, R. L.; Pochan, D. J.; Jia, X. *Macromolecules* **2009**, *42*, 537.
- 49 (a) Clapper, J. D.; Sievens-Figueroa, L.; Guymon, C. A. *Chem. Mater.* **2008**, *20*(3), 768-781. (b) Hutchison, J. B.; Stark, P. F.; Hawker, C. J.; Anseth, K. S. *Chem. Mater.* **2005**, *17*(19), 4789-4797. (c) Missirlis, D.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A. *Langmuir* **2005**, *21*(6), 2605-2613. (d) Nguyen, K. T.; West, J. L. *Biomaterials* **2002**, *23*(22), 4307-4314. (e) Bryant, S. J.; Anseth, K. S. *Biomaterials* **2001**, *22*(6), 619-626.
- 50 Jeon, O.; Bouhadir, K. H.; Mansour, J. M.; Alsberg, E. *Biomaterials* **2009**, *30*(14), 2724-2734.
- 51 Laurent, T. C.; Hellsing, K.; Gelotte, B. *Acta Chem. Scand.* **1964**, *18*, 274-275.
- 52 Guarise, C.; Pavan, M.; Pirrone, L.; Renier, D. *Carbohydrate Polym.* **2012**, *88*, 428-434.
- 53 (a) Mensitieri, M.; Ambrosio, L.; Nicolais, L.; Bellini, D.; O'Regan, M. J. *Mater. Sci.: Mater. Med.* **1996**, *7*, 695-698. (b) Caplan, A. I. *Tissue Engineering* **2000**, *6*(1), 1-7.
- 54 Kuo, J.-W.; Swann, D. A.; Prestwich, G. D. *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 232-241.
- 55 Luo, Y.; Kirker, K.; Prestwich, G. D. *J. Controlled Release* **2000**, *69*, 169-184.
- 56 (a) Otto, S.; Engberts, J. B. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2809-2820. (b) Rideout, D. C.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7816-7817.
- 57 Anseth, K. S.; Burdick, J. A. *MRS Bulletin* **2002**, *27*, 130.
- 58 Ifkovits, J. L.; Burdick, J. A. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2369.
- 59 Burdick, J. A.; Anseth, K. S. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4315.
- 60 (a) Baier Leach, J.; Bivens, K. A.; Patrick, C. W. Jr.; Schmidt, C. E. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 578-589. (b) Park, Y. D.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A. *Biomaterials* **2003**, *24*, 893-900.

- 61 (a) Smeds, K. A.; Grinstaff, M. W. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54*, 115. (b) Smeds, K. A.; Pfister-Serres, A.; Hatchell, D. L.; Grinstaff, M. W. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **1999**, *A36*, 981.
- 62 Miki, D.; Dastgheib, K.; Kim, T.; Pfister-Serres, A.; Smeds, K. A.; Inoue, M.; Hatchell, D. L.; Grinstaff, M. W. *Cornea* **2002**, *21*, 393.
- 63 Burdick, J. A.; Chung, C.; Jia, X.; Randolph, M. A.; Langer, R. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 386-391.
- 64 Leach, J. B.; Bivens, K. A.; Patrick, C. W.; Schmidt, C. E. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 578.
- 65 Prata, J.; Barth, T.; Bencherif, S.; Washburn, N. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 769.
- 66 Trudel, J.; Massia, S. P. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3299.
- 67 Leach, J. B.; Bivens, K. A.; Collins, C. N.; Schmidt, C. E. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2004**, *70A*, 74.
- 68 Jin, Y.; Yamanaka, J.; Sato, S.; Miyata, I.; Yomota, C.; Yonese, M. *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 173.
- 69 Sahoo, S.; Chung, C.; Khetan, S.; Burdick, J. A. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1088.
- 70 Klein, J. *Science* **2009**, *323*, 47-48.
- 71 (a) Briscoe, W. H.; Titmuss, S.; Tiberg, F.; Thomas, R. K.; McGillivray, D. J.; Klein, J. *Nature* **2006**, *444*, 191. (b) Gourdon, D.; Lin, Q.; Oroudjev, E.; Hansma, H.; Golan, Y.; Arad, S.; Israelachvili, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 1534. (c) Lee, S.; Spencer, N. D. *Science* **2008**, *319*, 575. (d) Klein, J. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part I* **2006**, *220*, 691.
- 72 Hunziker, E. B. *Osteoarthr. Cartil.* **2001**, *10*, 432.
- 73 Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A. *Nat. Mater.* **2007**, *23*, 47.
- 74 (a) Chen, F. H.; Tuan, R. S. *Curr. Rheumatol. Rev.* **2008**, *4*, 161. (b) Anderson, D. G.; Burdick, J. A.; Langer, R. *Science* **2004**, *305*, 1923.
- 75 Moutos, F. T.; Freed, L. E.; Guilak, F. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 162.
- 76 Gonen-Wadmany, M.; Oss-Ronen, L.; Seliktar, D. *Biomaterials* **2007**, *28*, 3876.
- 77 (a) Yannas, I. V. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 188-191. (b) Srivastava, S.; Gorham, S. D.; French, D. A.; Shivas, A. A.; Courtney, J. M. *Biomaterials* **1990**, *11*, 155-161. (c) Cooper, M. L.; Hansbrough, J. F.; Spielvogel, R. L.; Cohen, R.; Bartel, R. L.; Naughton, G. *Biomaterials* **1991**, *12*, 243-248. (d) Blayney, A. W.; Williams, K. R.; Erre, J. P.; Lesser, T. H.; Portmann, M. *Acta Otolaryngol. Stock.* **1992**, *112*, 322-327. (e) Beumer, G. J.; van Blitterswijk, C. A.; Bakker, D.; Ponc, M. *Biomaterials* **1993**, *14*, 598-604. (f) Bush, R. B. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *33*, 107-113. (g) Matouskova, E.; Vogtova, D.; Konigova, R. *Burns* **1993**, *19*, 118-123. (h) Rennekampff, H. O.; Kiessig, V.; Hansbrough, J. F. *J. Surg. Res.* **1996**, *62*, 288-295.
- 78 Ricciuti, S.; Cardini, C. *Il Policlinico Sez. Prat.* **2004**, *111*, 181-194.
- 79 (a) Yu, D.; Suzuki, M.; Xie, L.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*(3), 322-345. (b) Uchiumi, F.; Hatano, T.; Ito, H.; Yoshida, T.; Tanuma, S. *Antiviral Res.* **2003**, *58*(1), 89-98. (c) Chen, H. C.; Chou, C. K.; Kuo, Y. H.; Yeh, S. F. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*(7), 1025-1032.
- 80 (a) Shaw, C. Y.; Chen, C. H.; Hsu, C. C.; Chen, C. C.; Tsai, Y. C. *Phytother Res.* **2003**, *17*(7), 823-825. (b) Kaneko, T.; Baba, N.; Matsuo, M. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *142*(3), 239-254. (c) Paya, M.; Goodwin, P. A.; De Las Heras, B.; Hoult, J. R. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*(3), 445-451.
- 81 (a) Yang, L. L.; Wang, M. C.; Chen, L. G.; Wang, C. C. *Planta Med.* **2003**, *69*(12), 1091-1095. (b) Reutrakul, V.; Leewanich, P.; Tuchinda, P.; Pohmakotr, M.; Jaipetch, T.; Sophasan, S.; Santisuk, T. *Planta Med.* **2003**, *69*(11), 1048-1051. (c) Lee, K. H.; Chai, H. B.; Tamez, P. A.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A.; Win, K. K.; Tin-Wa, M. *Phytochemistry* **2003**, *64*(2), 535-541. (d) Zhang, J. X.; Fong, W. F.; Wu, J. Y.; Yang, M.; Cheung, H. Y. *Planta Med.* **2003**, *69*(3), 223-229. (e) Lo, W. L.; Chang, F. R.; Liaw, C. C.; Wu, Y. C. *Planta Med.* **2002**, *68*(2), 146-151. (f) Ju, Y.; Still, C. C.; Sacalis, J. N.; Li, J.; Ho, C. T. *Phytother Res.* **2001**, *15*(5), 441-443. (g) Fujioka, T.; Furumi, K.; Fujii, H.; Okabe, H.; Mihashi, K.; Nakano, Y.; Matsunaga, H.; Katano, M.; Mori, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*(1), 96-100. (h) Weber, U. S.; Steffen, B.; Siegers, C. P. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1998**, *99*(2), 193-206. (i) Bocca, C.; Gabriel, L.; Bozzo, F.; Miglietta, A. *Planta Med.* **2002**, *68*(12), 1135-1137.
- 82 (a) Theilheimer, W. *Synth. Met. Org. Chem.* **1962**, *16*, 369. (b) Bye, A.; King, H. K. *Biochem. J.* **1970**, *117*(2), 237-245.
- 83 Rombi, M. "100 piante medicinali. Composizione, meccanismo d'azione ed interesse terapeutico", ed. Romart, **1993**.
- 84 Spignoli, G.; Mercati, V.; Boncompagni, E. "Guida bibliografica ai più noti fitoterapici", Aboca, **1999**.
- 85 Raquet, N.; Schrenk, D. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*(9), 1639-1647.
- 86 (a) Scheel, L. D.; Perone, V. B.; Larkin, R. L.; Kupel, R. E. *Biochemistry* **1963**, *2*(5), 1127-1131. (b) Wu, C. M.; Koehler, P. E.; Ayres, J. C. *Appl. Microbiol.* **1972**, *23*(5), 852-856.
- 87 Ciamician, G.; Silber, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 4128.

- 88 (a) Kiefer, J. "Ultraviolette Strahlen, de Gruyter", Berlin, **1977**, 403. (b) Kopecky, J. "Organic photochemistry: a visual approach", VCH: Weinheim, New York, **1992**, 143. (c) Kuznetsova, N. A.; Kaliya, O. L. *Russ. Chem. Rev.* **1992**, *61*, 683. (d) Hammond, G. S.; Stout, C. A.; Lamola, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3103-3106. (e) Schenck, G. O.; von Wilucki, I.; Krauch, C. H. *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 1409. (f) Krauch, C. H.; Farid, S.; Schenck, G. O. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 625. (g) Morrison, H.; Curtis, H.; McDowell, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5415. (h) Hoffman, R.; Wells, P.; Morrison, H. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 102. (i) Leenders, L. H.; Schouteden, E.; De Schryver, F. C. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 957. (l) Muthuramu, K.; Ramnath, N.; Ramamurthy, V. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1872. (m) Moorthy, J. N.; Venkatesan, K.; Weiss, R. G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3292-3297. (n) Lewis, F. D.; Howard, D. K.; Oxman, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3344. (o) Lewis, F. D.; Barancyk, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8653.
- 89 (a) Wolf, T.; Görner, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 368-376. (b) D'Auria, M.; Racioppi, R. *J. Photochem. Photobiol. A* **2004**, *163*, 557-559.
- 90 (a) Bhadbhade, M. M.; Murthy, G. S.; Venkatesan, K.; Ramamurthy, V. *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *109*, 259-263. (b) Stitchell, S. G.; Harris, K. D. M.; Aliev, A. E. *Struct. Chem.* **1994**, *5*, 327-333. (c) Motoyanagi, J.; Fukushima, T.; Ishii, N.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4220-4221.
- 91 (a) Chen, Y.; Chou, C. F. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1995**, *33*, 2705-2714. (b) Chen, Y.; Hong, R.-T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1997**, *35*, 2999-3008.
- 92 (a) Kehrlösser, D.; Trager, J.; Hee-Cheol, K.; Hampp, N. *Langmuir* **2010**, *26*(6), 3878-3882. (b) Iliopoulos, K.; Krupka, O.; Gindre, D.; Sallé, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14343-14345. (c) Wolff, T.; Görner, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 368-376. (d) Kehrlösser, D.; Baumann, R.-P.; Kim, H.-C.; Hampp, N. *Langmuir* **2011**, *27*, 4149-4155.
- 93 (a) Lee, M. S.; Kim, J.-C. *J. Appl. Polym. Science* **2012**, *124*(5), 4339-4345. (b) Sinkel, C.; Greiner, A.; Agarwal, S. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3460-3467.
- 94 (a) Obi, M.; Morino, S.; Ichimura, K. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 656-664. (b) Traeger, J.; Heinzer, J.; Kim, H.-C.; Hampp, N. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 177-183. (c) Trenor, S. R.; Shultz, A. R.; Love, B. J.; Long, T. E. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3059. (d) Li, W.; Lynch, V.; Thompson, H.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7211. (e) Nagata, M.; Yamamoto, Y. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 915. (f) He, J.; Zhao, Y.; Zhao, Y. *Soft Matter* **2009**, *5*, 308.
- 95 Li, W.; Lynch, V.; Thompson, H.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7211-7217.
- 96 Schreiber, F. *Prog. Surf. Sci.* **2000**, *65*, 151-257.
- 97 Fang, J.; Whitaker, C.; Weslowski, B.; Chen, M.-S.; Naciri, J.; Shashidhar, R. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 2992-2995.
- 98 Nasu, S.; Tsuchiya, A.; Kuroda, K. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6688-6695.
- 99 Gnanaguru, K.; Ramasubbu, N.; Venkatesan K.; Ramamurthy, V. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2337.
- 100 (a) Seixas de Melo, J. S.; Becker, R. S.; Macanita, A. L. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6054-6058. (b) Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Barone, V.; Improta, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 607-619.
- 101 (a) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature* **2003**, *421*, 350. (b) Zhao, L.; Vaupel, M.; Loy, D. A.; Shea, K. J. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1870.
- 102 Ghugare, S. V.; Mozetic, P.; Paradossi, G. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1589-1596.
- 103 (a) Burdick, J. A.; Khetan, S. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8228. (b) Bae, M.S.; Yang, D. H.; Lee, J. B.; Heo, D. N.; Kwon, Y. D.; Youn, I. C.; Choi, K.; Hong, J. H.; Kim, G.T.; Choi, Y. S.; Hwang, E. H.; Kwon, I. K. *Biomaterials* **2011**, *32*(32), 8161-8171.
- 104 Shu, X. Z.; Ghosh, K.; Liu, Y. C.; Palumbo, F. S.; Luo, Y.; Clark, R. A.; Prestwich, G. D. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2004**, *68A*, 365-375.
- 105 (a) Tomohiro, T.; Avval, P. A.; Okuno, H. *Synthesis* **1992**, *7*, 639-640. (b) Christensen, C. A.; Bryce, M. R.; Becher, J. *Synthesis* **2000**, *12*, 1695-1704. (c) Holmes, B. T.; Snow, A. W. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*(28), 4813-4815.
- 106 (a) Ishow, E.; Credi, A.; Balzani, V.; Spadola, F.; Mandolini, L. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*(3), 984-989. (b) Koizumi, M.; Dietrich-Buchecker, C.; Sauvage, J.-P. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 770-775.
- 107 (a) *US Patent*, P.N. US2709178, **1951**. (b) Heimann, U.; Herzhoff, M.; Vögtle, F. *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 1392. (c) Ciuffarin, E.; Isola, M.; Leoni, P. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3064. (d) Gartiser, T.; Selve, C.; Mansuy, L.; Robert, A.; Delpuech, J.-J. *Journal Chem. Res. Miniprint* **1984**, 2672. (e) Yinglin, H.; Tianbao, L.; Hongwen, H.; Xiao, L. *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 79. (f) Boden, N.; Bushby, R. J.; Clarkson, S.; Evans, S. D.; Knowles, P. F.; Marsh, A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10939. (g) Wang, J.; Zhang, B.; Fang, J.; Sujino, K.;

- Li, H.; Otter, A.; Hindsgaul, O.; Palcic, M. M.; Wang, P. G. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 347. (h)
- Boumrah, D.; Campbell, M. M.; Fenner, S.; Kinsman, R. G. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 7735. (i)
- Boumrah, D.; Campbell, M. M.; Fenner, S.; Kinsman, R. G. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977. (l) Loubinoux, B.; Colin, J. L.; Thomas, V. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 461. (m) Luening, U.; Baumstark, R.; Peters, K.; Schnering, H. G. V. *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 129.
- 108 (a) Ritschel, J.; Sasse, F.; Maier, M. E. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 78. (b) Brotherton, W. S.; Michael, H. A.; Simmons, J. T.; Clark, R. J.; Dalal, N. S.; Zhu, L. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4954. (c) Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. *Macromol. Rapid Comm.* **2008**, *29*, 1167. (d) Pardin, C.; Keillor, J. W.; Lubell, W. D. *US Patent*, P.N. US20100204280, **2010**.
- 109 (a) Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3663-3678. (b) Varma, R. S.; Naicker, K. P. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 2915-2918.
- 110 Rao, C. N. R.; Chao, T. S.; Hoffman, C. W. W. *Analytical Chemistry* **1957**, *29*(6), 916-918.
- 111 (a) Maiti, N.; Singh, M. P.; Micetich, R. G. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*(13), 1423-1424. (b) Vaultier, M.; Knouzi, N.; Carrie, R. *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 763. (c) Adachi, T.; Yamada, Y.; Inoue, I.; Saneyoshi, M. *Synthesis* **1977**, 45. (d) Belinka, B. A.; Hassner, A. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4712.
- 112 (a) Murelli, R. P.; Zhang, A. X.; Michel, J.; Jorgensen, W. L.; Spiegel, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17090-17092. (b) Bhosale, S.; Bhosale, S.; Wang, T.; Kopaczynska, M.; Fuhrhop, J.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2156-2157. (c) Fridman, M.; Belakhov, V.; Lee, V. L.; Liang, F.-S.; Wong, C.-H.; Baasov, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*(3), 447-452.
- 113 Anilkumar, G.; Nambu, H.; Kita, Y. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*(2), 190-191.
- 114 Balbi, A.; Sottofattori, E.; Grandi, T.; Mazzei, M.; Pyshnyi, D. S.; Lokhov, S. G. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*(10), 1903-1910.
- 115 (a) Asada, M.; Iwahashi, M.; Obitsu, T.; Kinoshita, A.; Nakai, Y.; Onoda, T.; Nagase, T.; Tanaka, M.; Yamaura, Y.; Takizawa, H.; Yoshikawa, K.; Sato, K.; Narita, M.; Ohuchida, S.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*(4), 1641-1653. (b) *US Patent*, P.N. US2005209274, **2005**. (c) *European Patent*, P. N. EP1591441, **2005**. (d) *European Patent*, P.N. EP1431267, **2004**. (e) *US Patent*, P. N. US5082934, **1992**. (f) Leonetti, F.; Favia, A.; Rao, A.; Aliano, R.; Paluszczak, A.; Hartmann, R. W.; Carotti, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*(27), 6792-6803. (g) Asada, M.; Obitsu, T.; Kinoshita, A.; Nakai, Y.; Nagase, T.; Sugimoto, I.; Tanaka, M.; Takizawa, H.; Yoshikawa, K.; Sato, K.; Narita, M.; Ohuchida, S.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*(8), 2639-2643. (h) Gnerre, C.; Catto, M.; Leonetti, F.; Weber, P.; Carrupt, P.-A.; Altomare, C.; Carotti, A.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*(25), 4747-4758. (i) *US Patent*, P. N. US6005093, **1999**. (l) *US Patent*, P. N. US6800768, **2004**. (m) Ivanova, D.; Kolev, V.; Lazarova, T.; Padros, E. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*(13), 2645-2648. (n) *European Patent*, P. N. EP1787657, **2007**. (o) Yu, L.; Gao, J.-F.; Cao, L.-H. *J. Chin. Chem. Soc.* **2009**, *56*(6), 1175-1179.
- 116 Kobayashi, S.; Morii, H.; Itoh, R.; Kimura, S.; Ohmae, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11825-11826.
- 117 Neuhaus, D.; Williamson, M. "The Nuclear Overhauser Effect In Structural And Conformational Analysis", VCH Publishers, New York, **1989**, p. 37.
- 118 Beninatto, R.; Borsato, G.; Campisi, M.; De Lucchi, O. *Italian Patent*, P. N. MI2013A000162.
- 119 Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
- 120 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.