



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE  
IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**ARCHITETTURE SUPRAMOLECOLARI A BASE PEPTIDICA  
FOTOCONTROLLABILI**

Relatore: **Dott. Alessandro Moretto**

Controrelatore: **Prof. Alberta Ferrarini**

**Laureando : Marco Maran**

**ANNO ACCADEMICO 2013/2014**



## INDICE

---

Indice	i
Riassunto	iii
Abbreviazioni	v
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 Self Assembly	3
1.2 Interazioni non covalenti	7
1.3 Microstrutture supramolecolari auto-assemblate	10
1.3.1 Amminoacidi e peptidi	11
1.3.2 Eliche peptidiche	13
1.4 Tipi di microstrutture auto-assemblate	16
1.4.1. Fibre	16
1.4.2. Vescicole	17
1.4.3. Micelle	17
1.4.4. Nanotubi	19
1.5 Azobenzene	20
1.5.1. Azobenzene come unità isomerizzabile	20
1.5.2. Proprietà fotofisiche dell'azobenzene	21
1.6. Il Poli- $\gamma$ -benzil-L-glutammato	23
1.7. Scopo della Tesi	24
<b>2. PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>25</b>
2.1. Materiali e metodi	25
2.1.1. Reagenti e solventi	25
2.1.2. Strumentazione	27
2.2. SINTESI AMMINOACIDI ED INIZIATORI	31
2.2.1. Octopus System	31
2.2.2. Azo(Ala) <sub>2</sub> : Iniziatore fotosensibile lineare a simmetria C <sub>2</sub>	36
2.2.3. Tr (NH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> : Iniziatore "planare" a simmetria C <sub>3</sub>	39
2.2.4. Tr(Azo) <sub>3</sub> : Iniziatore planare fotosensibile a simm. C <sub>3</sub>	42
2.3. SINTESI DI POLIMERI a base di $\gamma$ -Benzil-L-glutammato	45

<b>3. DISCUSSIONE delle SINTESI</b>	49
3.1. Sintesi in soluzione	49
3.2. Sintesi in fase solida	53
3.3. Metodiche di caratterizzazione	57
3.4. Tr(Azo) <sub>3</sub> : Iniziatore “planare” fotosensibile a simmetria C <sub>3</sub>	61
<b>4. DISCUSSIONE dei RISULTATI</b>	65
4.1. Octopus System	65
4.2. Polimero con iniziatore “lineare” a simmetria C <sub>2</sub>	70
4.2.1. Polimero fotosensibile [22] Azo(Ala) <sub>2</sub> -PBLG	70
4.3. Polimeri con iniziatori “planari” a simmetria C <sub>3</sub>	76
4.3.1. Polimero fotosensibile [24] Tr(Azo) <sub>3</sub> -PBLG	76
4.3.2. Polimero NON-Azo [23] Tr-PBLG a simmetria C <sub>3</sub>	83
4.3.3. Incapsulamento di un fluoroforo in [23] Tr-PBLG	84
4.3.4. Polimero [25] Tr-PBLG ad alto Peso Molecolare	87
4.3.5. Reazioni secondarie nella polimerizzazione della $\gamma$ -benzil-L-glutammato NCA	89
4.3.6. Electrospinning per la formazione di fibre	91
<b>5. CONCLUSIONI</b>	93
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	95

## RIASSUNTO

---

La chimica supramolecolare e dell'auto-assemblaggio (self-assembly) oggi rivestono un ruolo chiave nella realizzazione di materiali organici con ben definite funzioni. In questo contesto, il self-assembly implica che tramite una piccola invenzione umana, i componenti si possano programmare in anticipo per dare origine in seguito a strutture funzionali ordinate. Con questi approcci si riescono a coprire scale dimensionali che vanno dal monostrato, alle nanostrutture, ai gels, alle membrane per finire con i materiali voluminosi. Il self-assembly molecolare avviene grazie ad un delicato equilibrio tra diverse interazioni non-covalenti ed effetti di solvatazione. Questo fenomeno è ubiquitario nei sistemi biologici, come sottolineato dalla formazione di una vasta gamma di strutture biologiche complesse. Ma in realtà l'abilità di predire le caratteristiche strutturali e funzionali dei materiali assemblati, derivanti da combinazione di tali interazioni, è ancora nella sua fase iniziale. Infatti, molte delle conoscenze in questo campo derivano da analisi retrospettive dopo le scoperte di nuove strutture e relative funzionalità. Ad ogni modo, la natura della specie complessa finale, cioè del materiale, è determinata in maniera univoca dalle "istruzioni" (elettroniche, magnetiche, chirali) che ciascun componente "porta" con sé e che influirà sulle proprietà della specie risultante.

La ricerca condotta negli ultimi anni ha evidenziato come gli amminoacidi ed i peptidi siano tra i migliori candidati per la formazione di aggregati supramolecolari organizzati.

In questo elaborato di Tesi, sono stati sintetizzati una serie di composti a base amminoacidica o polipeptidica che hanno dimostrato la reale potenzialità del processo di self-assembly nella costruzione di nanostrutture organizzate. Inoltre in questo elaborato di Tesi si dimostra che l'incorporazione di sonde isomerizzabili (attraverso un irraggiamento a specifiche lunghezze d'onda) produce un riarrangiamento supramolecolare (tal volta reversibile) della forma delle microstrutture.



## ABBREVIAZIONI

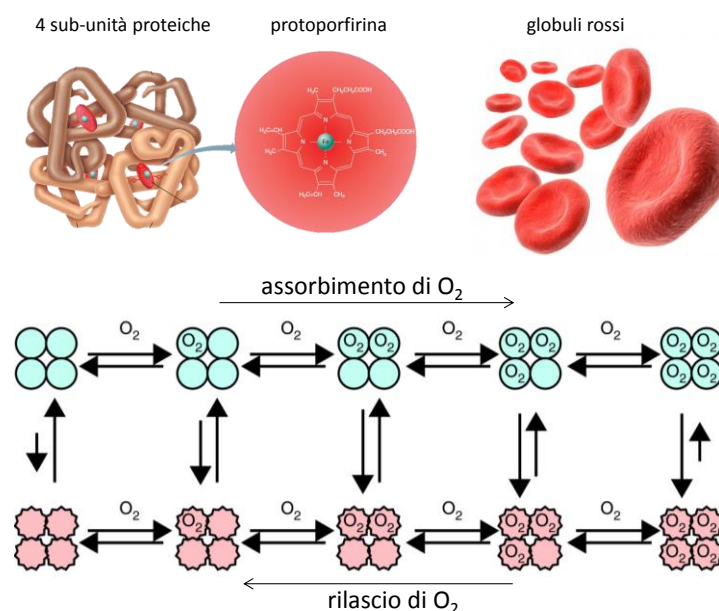
AA	= Amminoacido generico
Ac	= Acetile
AcOEt	= Acetato di etile
AcOH	= Acido acetico
Ala	= Alanina
BLG	= $\gamma$ -benzil-L-glutammato
BLG-NCA	= N-carbossianidride del $\gamma$ -benzil-L-glutammato
Boc	= <i>Tert</i> -butossicarbonile
(Boc) <sub>2</sub> O	= Di- <i>tert</i> -butil dicarbonato
CD	= Dicroismo circolare
CDCl <sub>3</sub>	= Deuterocloroformio
CF	= Carbossifluoresceina
CHCl <sub>3</sub>	= Cloroformio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	= Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	= Acetonitrile
DIC	= N,N'-diisopropilcarbodiimmide
DMPA	= 2,2-dimetossi-2-fenilacetofenone
DMAP	= Dimetilammino-piridina
DMF	= N,N-Dimetilformammide
DMSO	= Dimetilsolfossido
EDC·HCl	= N-Etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato
PE	= Etere di petrolio
ESI	= Electronspray ionization
EtOH	= Etanolo
Et <sub>2</sub> O	= Etere dietilico
FT-IR	= Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
HOAt	= 1-Idrossi-7-aza-1,2,3-benzotriazolo
HOBt	= 1-Idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HPLC	= Cromatografia liquida ad alte prestazioni
IR	= Infrarosso
MeOH	= Metanolo
MS	= Spettrometria di massa
NBS	= N-Bromosuccinimide
NMR	= Risonanza magnetica nucleare
PBLG	= poli- $\gamma$ -benzil-L-glutammato

PABA	= Acido <i>p</i> -amminobenzoico
Phe	= Fenilalanina
PM	= Peso molecolare (medio numerico nel caso dei polimeri)
Rf	= Fattore di ritenzione
TFA	= Acido trifluoroacetico
THF	= Tetraidrofurano
TLC	= Cromatografia su strato sottile
TOF	= Analizzatore a tempo di volo
$t_r$	= Tempo di ritenzione
TritonX-100	= Polietilenglicole <i>tert</i> -octilfeniletere
UV	= Ultravioletto



# 1. INTRODUZIONE

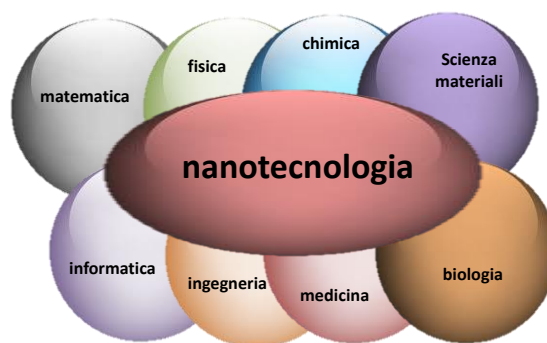
Il riconoscimento molecolare è senza dubbio tra le più eleganti e specifiche forze guida che la Natura ha selezionato per organizzare e fare funzionare la macchina della vita (life machinery). La specificità dei processi di bio-riconoscimento e di bio-organizzazione è controllata e regolata da interazioni non covalenti (di natura essenzialmente elettrostatica) e si basa su un elevato grado di complementarità tra le specie interagenti. Le interazioni non covalenti giocano un ruolo essenziale in processi biologici rilevanti quali il dogma centrale della genetica molecolare (replicazione, trascrizione, traslazione), la trasduzione dei segnali, il trasporto selettivo attraverso le membrane di ioni metallici e piccole molecole, reazioni enzimatiche o formazione di aggregati. Dall'elevata specificità dei suddetti processi, risulta evidente che la complementarità interessa non solo le dimensioni e la morfologia delle specie molecolari interagenti, ma anche le rispettive distribuzioni di carica (netta o parziale). In *Figura 1.0.1* è riportato il caso dell'emoglobina.



**Figura 1.0.1:** L'emoglobina è una proteina specializzata nel trasporto di ossigeno, si trova all'interno dei globuli rossi del sangue ai quali conferisce il caratteristico colore rosso intenso. E' una proteina globulare composta da quattro catene proteiche: due catene alfa e due catene beta. Ogni catena contiene un gruppo prostetico chiamato eme formato da un anello porfirinico che lega al centro un atomo di ferro sotto forma di ione Fe<sup>2+</sup>. E' proprio l'atomo di ferro al centro dell'anello porfirinico che lega la molecola di ossigeno in modo reversibile e la trasporta a tutte le cellule del nostro corpo attraverso il sangue. E' un esempio perfetto di un riconoscimento molecolare peculiare atto a generare aggregati molecolari con funzionalità specifiche (in questo caso i globuli rossi assorbono e rilasciano l'ossigeno).

Durante la seconda metà del ventesimo secolo la polimerizzazione rappresentava la chimica dominante nella produzione di materiali organici. Questa metodologia sintetica si è largamente diffusa soprattutto dopo l'accettazione da parte della comunità scientifica del concetto "macromolecolare" proposto dal premio Nobel Staudinger (1953).

Ora, all'inizio del ventunesimo secolo, l'enorme quantità di letteratura disponibile dimostra come le aree chiave per la realizzazione di materiali organici siano centrate nella chimica supramolecolare e nella chimica dell'auto-assemblaggio (self-assembly), che coprono scale dimensionali che vanno dal monostrato, alle nanostrutture, alle vescicole, ai gels, alle membrane per finire con i materiali voluminosi (bulk) <sup>(1)</sup>. I risultati sperimentali ottenuti nei laboratori diretti da Jean-Marie Lehn (premio Nobel, 1983) furono fondamentali per introdurre il concetto di chimica supramolecolare, ma soprattutto portarono all'idea dello sviluppo di strutture funzionali. Questo concetto fu ripreso e concretizzato dal lavoro condotto nei laboratori di Whitesides (anni 1990), dove utilizzando molecole opportunamente progettate si è potuto programmare l'auto-associazione delle stesse in materiali bulk, che possedevano le funzioni chimico-fisiche ricercate. Nell'era moderna, il self-assembly è emerso come nuova strategia nella sintesi chimica e come potenziale tecnica per la generazione di strutture non-biologiche di dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri e pesi molecolari compresi tra  $10^4$  e  $10^{10}$  Dalton. Le strutture che sono comprese nella parte "alta" di questi valori sono, attualmente, praticamente inaccessibili attraverso la pura sintesi chimica. Oggigiorno, nel campo della nanoscienza supramolecolare uno dei target più ambiti è il design e la realizzazione di monostrati autoassemblati e di nanostrutture con differenti forme e dimensioni. Pertanto la possibilità di sintetizzarle e prevederne le potenziali proprietà potrebbe aprire la strada per la formazione di strutture comparabili in dimensioni e complementari in funzione, a quelle preparate con tecniche di micro-fabbricazione, come per esempio la micro-litografia.

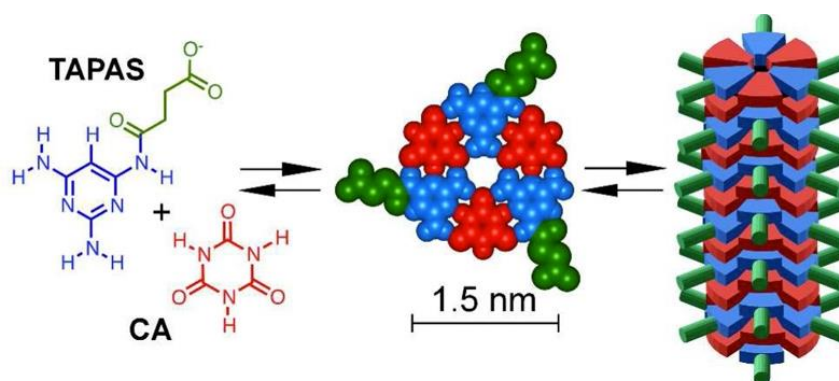


**Figura 1.0.2** Visione della nanotecnologia come scienza multidisciplinare.

E' da notare infine come, con l'emergere del prefisso "nano" nella scienza e nella tecnologia, molti dei ben definiti campi scientifici sono stati rivisti o integrati interdisciplinarmente (*Figura 1.0.2*).

## 1.1 Self Assembly

Il self-assembly molecolare è il processo dell'associazione spontanea di molecole, sotto le condizioni di equilibrio, in stabili e strutturalmente ben definiti aggregati molecolari che si compongono attraverso interazioni (legami chimici) di natura non covalente<sup>(2)</sup>. Esso avviene grazie ad un delicato equilibrio tra diverse interazioni non-covalenti ed effetti di solvatazione. Questo fenomeno è fondamentale nei sistemi biologici, data la vasta gamma di strutture complesse conosciute in natura.

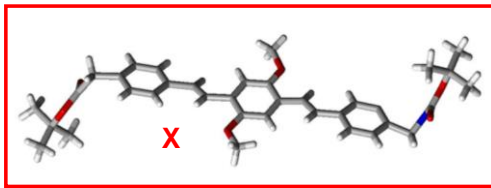
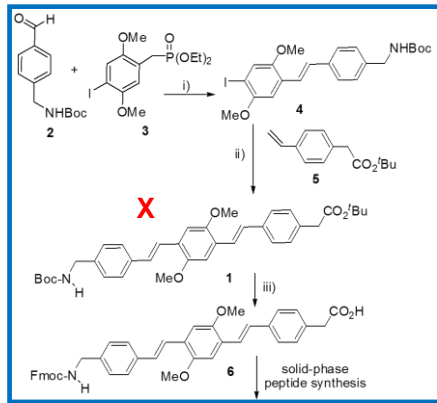


**Figura 1.1.1:** In un recente lavoro, *JACS* 2013 ([DOI: 10.1021/ja410124v](https://doi.org/10.1021/ja410124v)) è stato dimostrato come l'interazione tra due monomeri a basso peso molecolare in acqua, quali l'acido cianurico (CA) e una tri-ammino piridina modificata (TAPAS), risulti nella formazione di polimeri supramolecolari estremamente lunghi che mantengono la solubilità in acqua. Questo studio potrebbe spigare l'origine dei primi RNA-polimeri nella chimica prebiotica.

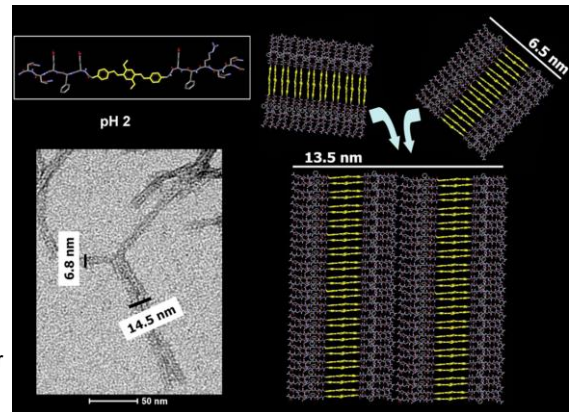
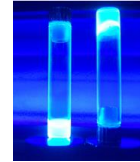
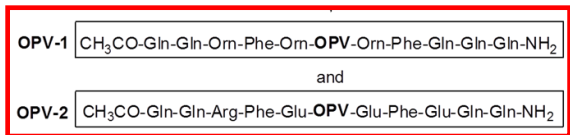
Nel contesto della chimica dei materiali, il self-assembly implica che, tramite una piccola invenzione umana, i componenti si possano programmare in anticipo per dare origine in seguito a strutture funzionali ordinate (*Figura 1.1.1*)<sup>(3)</sup>. Il processo può avvenire su ogni scala dimensionale, pertanto nelle regioni che vanno dalle scale nano-micro fino a quelle macroscopiche. Le più popolari ricerche nel campo della “soft matter” si sono rivolte al design di strutture “relativamente” semplici, utilizzando legami ad idrogeno, interazioni  $\pi-\pi$  stacking, interazioni metallo-legante, forze elettrostatiche, associazioni dipolo-dipolo, forze idrofobiche e repulsioni steriche<sup>(4)</sup>.

Ma in realtà l’abilità di predire le caratteristiche strutturali e funzionali dei materiali assemblati, derivanti da combinazione di tali interazioni, è ancora nella sua fase iniziale. Infatti, molte delle conoscenze in questo campo derivano da analisi retrospettive dopo le scoperte di nuove strutture e relative funzionalità. Ad ogni modo, la natura della specie finale è quindi determinata in maniera univoca dalle “istruzioni” (elettroniche, magnetiche, chirali) che ciascun componente “porta” con sé e che influirà sulle proprietà della specie risultante. Una reazione controllata a livello gerarchico è un processo nel quale l’auto-organizzazione dei singoli componenti molecolari dipende da una specifica sequenza di diversi singoli eventi di complessazione che porta alla formazione di specie assemblate multi-componenti. Il controllo a livello cinetico è molto importante in un processo di self-assembly che richiede diversi passaggi sintetici (cioè la formazione di specie supramolecolari multi-componenti). L’inerzia cinetica, infatti, impedisce alle singole specie supramolecolari intermedie di dissociarsi e quindi di dare vita, nei successivi processi sintetici, a specie con una sequenza molecolare non controllabile. Quindi la chimica supramolecolare si affianca, in termini di potenzialità, alla tradizionale chimica dei legami covalenti e si allea con essa per progettare la sintesi degli opportuni mattoni molecolari che individuano e determinano la specificità desiderata a livello supramolecolare (*Figura 1.1.2*).

Functionalized oligo(*p*-phenylenevinylene)s (OPV)



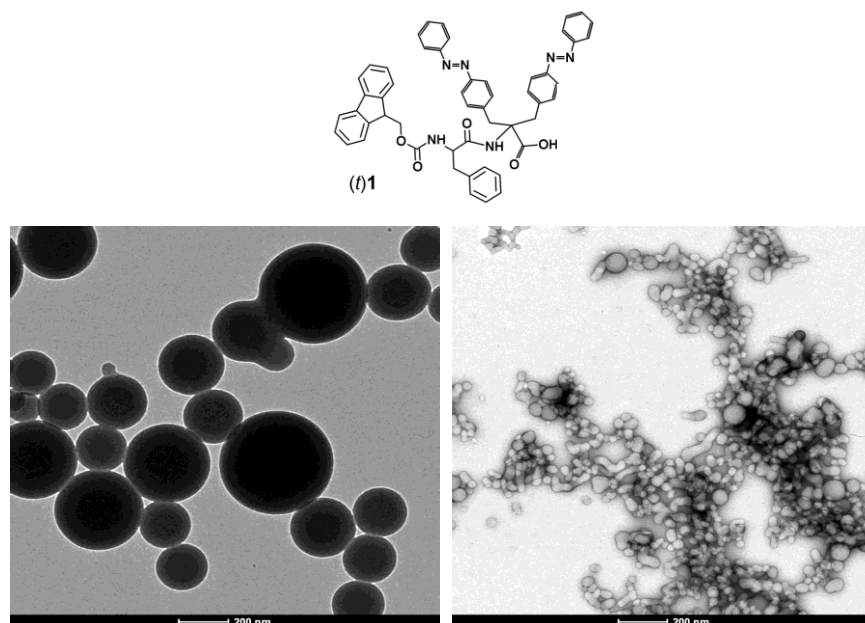
This OPV amino acid might serve as a replacement for five  $\alpha$ -amino acid units in a  $\beta$  strand.



**Figura 1.1.2:** Esempio di un processo di chimica supramolecolare recentemente sviluppato nei nostri laboratori<sup>(5)</sup>. Tramite la chimica covalente è stato dapprima sintetizzato un derivato di *p*-fenilenevinilene (OPV), composto aromatico fluorescente. Questo derivato contiene un gruppo amminico ed un gruppo carbossilico. Tale derivato è stato covalentemente introdotto in due strutture peptidiche opportunamente progettate per rispondere a stimoli di pH. Al pH desiderato l'una o l'altra struttura si auto-associano generando delle fibre. La driving force del processo è data dall'istaurarsi di un network di legami ad idrogeno intermolecolari ed interazioni  $\pi$ - $\pi$  stacking ( queste ultime dovute al composto aromatico contenuto nel mezzo della struttura peptidica). Successivamente le fibre si auto-associano tridimensionalmente l'un l'altra intrappolando il solvente acquoso e generando idrogels (nella figura si vedono le due provette, che fluorescono sotto irraggiamento di luce UV, contenenti la soluzione e il gel). Complessivamente un singolo derivato peptidico genera un materiale supramolecolare.

In questo contesto del self-assembly nei nostri laboratori è stato recentemente proposto un sistema a base aminoacidica in grado di generare, a partire da semplici derivati molecolari, sistemi assemblati di tipo vescicolare capaci di rispondere a stimoli fotonici. Il composto base per la sintesi di tali derivati è un aminoacido che reca sul carbonio in posizione  $\alpha$  due sostituenti uguali di tipo azobenzenico. Questo nuovo aminoacido è chiamato *para*-bisazo-dibenzil glicina (pazoDbg)<sup>(6)</sup>. Come è noto, se l'azobenzene assorbe energia luminosa a 350 nm riarrangia la sua conformazione trans a cis. Questo processo dunque, promuove un cambio conformazionale nella disposizione relativa dei due anelli aromatici del

cromoforo. Tale processo è reversibile tra cis a tran a seguito dell'irraggiamento con luce visibile a 450 nm. Il derivato selezionato per questi studi di autoassemblaggio molecolare è mostrato nella *Figura 1.1.3*.



**Figura 1.1.3:** In alto: *Fmoc-Phe-pazoDbg-OH* il derivato dipeptidico sintetizzato e oggetto di studio per il self-assembly. Sotto a sinistra: Immagini TEM delle vescicole generate in soluzione acquosa a partire da *Fmoc-Phe-pazoDbg-OH* con i due gruppi azobenzenici in configurazione trans. Sotto a destra: Immagini TEM della soluzione delle vescicole precedentemente descritta dopo irraggiamento con luce visibile. Come si può vedere dal confronto delle due immagini al TEM, la riorganizzazione molecolare indotta dall'assorbimento della luce dei cromofori azobenzenici provoca un riarrangiamento strutturale delle vescicole. Esse diventano di forma allungata, piuttosto che sferica e di dimensioni ridotte. Il processo di irraggiamento a 450 nm (non mostrato) riporta le vescicole alle dimensioni di partenza.

## 1.2 Interazioni non Covalenti

---

In sistemi dove le interazioni non covalenti sono importanti è bene sapere che ne esistono di molti tipi e molto diverse tra loro. Qui di seguito ne verranno discusse le principali, descrivendone gli effetti<sup>(7)</sup>.

### ***ione-ione***

Le interazioni ione - ione (energia di legame: 100 – 350 kJ mol<sup>-1</sup>) rappresentano il più semplice esempio di organizzazione molecolare poiché portano alla costruzione di architetture anche molto complesse, per semplice organizzazione di leganti intorno ad un catione metallico. Prendendo in considerazione la struttura cristallina di NaCl, il catione metallico coordina a sé sei leganti, massimizzandone le interazioni non-covalenti.

### ***ione-dipolo***

Le interazioni ione - dipolo coinvolgono ioni e leganti polari con energia di legame dell'ordine dei 50 - 200kJ mol<sup>-1</sup>. Esempi molto semplici sono gli *es*acqua ioni dei cationi metallici, come per  $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6^+$ . Nella chimica supramolecolare troviamo subito corrispondenza negli eteri corona e criptandi che legano metalli alcalini quali  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ . In questi leganti abbiamo atomi di ossigeno o azoto che fungono da basi di Lewis (come l'ossigeno negli *es*acquaioni), seguiti da effetti chelanti e in particolare di pre-organizzazione macrociclica che insieme portano ad una forte stabilizzazione del complesso. Prendendo in considerazione metalli più pesanti, come il Rutenio nel  $[\text{Ru}(\text{by})_3]^{2+}$ , tali interazioni si estendono anche ai legami dativi.

### ***Dipolo-dipolo***

Le interazioni tra dipoli possono contribuire significativamente alla stabilizzazione di una struttura supramolecolare con energie mediamente di 5 - 50kJ mol<sup>-1</sup> per dipoli paralleli, e circa 20kJ mol<sup>-1</sup> per dipoli perpendicolari. Prendendo ad esempio semplici molecole organiche, sono note interazioni dipolo - dipolo nello stato solido. Ragionevolmente queste interazioni in soluzione sono deboli (T.*eb*.Acetone:

56 °C) ma estendendo il discorso a strutture dove numerosi dipoli interagiscono tra loro, la stabilizzazione è tangibile.

### ***Legame ad idrogeno***

Un legame idrogeno è l'interazione in cui un atomo di idrogeno legato ad un atomo elettronegativo o gruppo elettron-attrattore, è attratto da un dipolo di una molecola o gruppo funzionale vicino. Si schematizza generalmente con  $D-H\cdots A$  dove D è l'atomo donatore e A è l'atomo accettore che regge un doppietto di elettroni. Le caratteristiche di questi legami sono quindi la direzionalità e la forza: normalmente tali legami variano tra i 4 - 60 kJ mol<sup>-1</sup> e per casi particolari possono raggiungere i 120 kJ mol<sup>-1</sup> dei legami tra molecole di HF. Questi legami quindi possono ricoprire un ruolo cruciale nelle interazioni supramolecolari, come nel caso delle strutture secondarie e terziarie delle proteine. I legami ad idrogeno forti si formano tra un acido molto forte e un buon accettore di legami idrogeno, come ad esempio lo ione  $H_5O_2^+$ . I legami ad idrogeno medi si formano tra specie accettori e donatori neutri grazie ai doppietti elettronici solitari, non hanno geometria lineare ma sono in media leggermente piegati, come nei casi di auto-associazione di acidi carbossilici e interazioni ammidiche nelle proteine. I legami ad idrogeno deboli si formano tra donatori e accettori di vario tipo anche non convenzionali come gruppi C-H, sistemi  $\pi$  o metalli di transizione, e tendono ad essere considerati quando agiscono in gran numero e non direzionati per stabilizzare una particolare struttura.

### ***Catione- $\pi$***

Le interazioni tra cationi e sistemi  $\pi$  sono ben note e il ferrocene  $[Fe(C_5H_5)_2]$  ne è l'esempio più conosciuto, dove la carica degli anioni ciclopentadienuro interagisce direttamente con gli orbitali  $d$  semivuoti del ferro generando un legame covalente a tutti gli effetti. Per avere una misura della forza di queste interazioni si può prendere ad esempio le interazioni tra cationi metallici alcalini come il  $K^+$  con sistemi insaturi come il benzene in fase gassosa che vale circa 80 kJ mol<sup>-1</sup>, confrontabile con l'interazione  $K^+\cdots H_2O$  vale circa 75 kJ mol<sup>-1</sup>. Nota: le interazioni tra cationi non metallici come i sali di ammonio  $RNH_3^+$  con sistemi  $\pi$  può essere vista invece come un legame idrogeno.



### **Anione– $\pi$**

Queste interazioni, rispetto le precedenti, sembrano essere più repulsive che attrattive visto che si accostano due sistemi elettron-ricchi quali un anione e un sistema  $\pi$ . Ciononostante si ha di base una differenza di carica netta tra i due ed inibendo il carattere  $\pi$  del legante si possono ottenere interazioni attrattive a carattere elettrostatico.

### **Interazioni $\pi - \pi$**

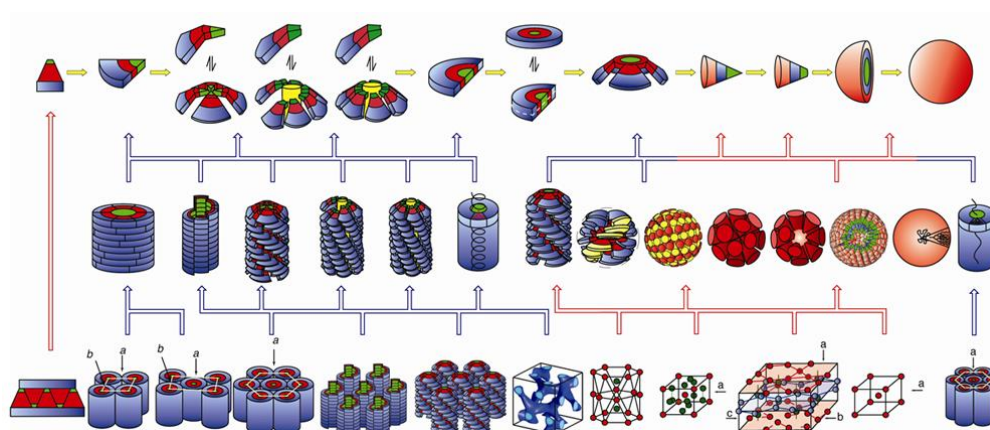
Le interazioni tra sistemi  $\pi$  sono ben note in composti come la grafite o nelle eliche del DNA. Queste interazioni sono schematizzabili come *face-to-face* ed *edge-to-face*, specialmente quando uno dei due sistemi interagenti è elettron-ricco e il secondo leggermente elettron-povero. Le proprietà lubrificanti e di sfaldamento della grafite sono dovute alle interazioni *face-to-face*, e nel DNA contribuiscono a stabilizzarne la struttura. È da notare che l'interazione *edge-to-face* non è strettamente un'interazione  $\pi$ -stacking e può essere vista come un legame idrogeno debole, come nel benzene, tra gli atomi di idrogeno elettron-poveri dell'anello aromatico e il sistema  $\pi$  elettron-ricco.

### **Van der Waals**

Queste interazioni vengono ben descritte dal potenziale di interazione Lennard-Jones composto da un termine di dispersione (di London) e uno di repulsione a corto raggio. Il primo descrive le interazioni attrattive tra i multipoli istantanei fluttuanti tra molecole vicine e decade per  $r^{-6}$ , il secondo descrive le repulsioni a corto raggio dovute alla forma intrinseca delle molecole e decade per  $r^{-12}$ . Tali interazioni nascono dalla reciproca polarizzazione della nube elettronica di molecole adiacenti che porta a deboli interazioni elettrostatiche. Sono quindi molto limitate nella progettazione di possibili *hosts* o *guests*. Inoltre, poiché non sono direzionali, diventano più interessanti in generale quando si trattano molecole o strutture facilmente polarizzabili di estensione notevole, in cui si ha un effetto collettivo tangibile.

### 1.3 Microstrutture supramolecolari auto-assemblate

La capacità delle molecole biologiche di eseguire funzioni critiche è legata alla loro abilità nel formare strutture altamente organizzate e stabili attraverso una serie di precisi riconoscimenti molecolari. In tal senso, la ricerca condotta negli ultimi anni ha scoperto e sviluppato librerie di molecole che sono in grado di formare aggregati supramolecolari organizzati, come amminoacidi, zuccheri, peptidi, sistemi a base di DNA, sistemi macrociclici, e dendritici<sup>(8)</sup>. Questi “building blocks” infatti, contengono già le informazioni necessarie per la formazione e riparazione delle loro sequenze secondarie, terziarie e quaternarie, come avviene nel caso delle molecole biologiche (Figura 1.3).



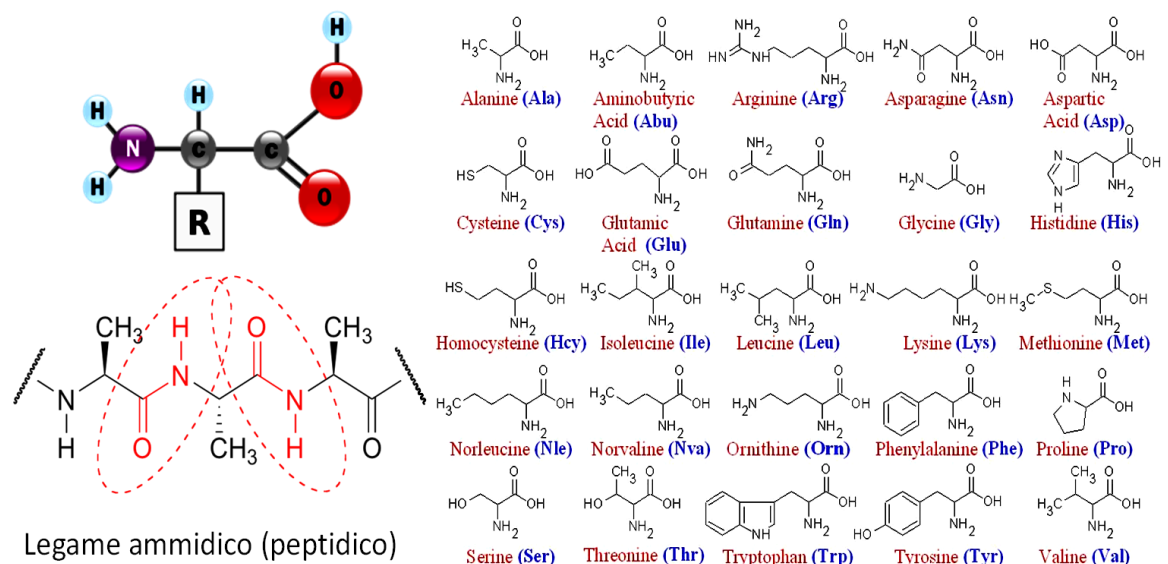
**Figura 1.3:** Rappresentazione schematica di processi di auto assemblaggio di piccole unità in grado di formare sistemi supramolecolari voluminosi organizzati di diverse forme.

Come accennato, i peptidi sono capaci di comportarsi come eccellenti “building blocks” per formare strutture supramolecolari, ed inoltre, per lo stesso scopo possono essere combinati ad altri “building blocks” come i lipidi, gli zuccheri, il DNA ecc. I peptidi inoltre esibiscono importanti proprietà come la biocompatibilità e il riconoscimento molecolare. Quest’ultimo è particolarmente utile in quanto favorisce specifiche selettività tra gruppi funzionali tanto da promuovere la costruzione di strutture ad ordine controllato. Il grande vantaggio nell’ utilizzo dei peptidi per la costruzione di nanostrutture assemblate tramite il processo del “bottom up” consiste nella possibilità di progettare l’inserimento di specifici gruppi

funzionali. Questi possono essere già presenti negli aminoacidi proteici, oppure inserirli ad hoc tramite funzionalizzazioni e modificazioni chimiche.

Come detto in precedenza, la strategia del self-assembly è emersa come un autorevole processo per la produzione a livello nanometrico di ben ordinate strutture supramolecolari. Tra queste strutture si possono trovare, fibre, sfere (micelle e vescicole) e nanotubi che potenzialmente potrebbero trovare applicazioni nel campo delle nanotecnologie. I peptidi, come “building blocks” offrono importanti vantaggi nella costruzione di tali strutture combinando la loro biocompatibilità con la loro diversità strutturale e funzionale. In letteratura ci sono molti esempi di strutture supramolecolari di vescicole, micelle, nanotubi e fibre formati da peptidi con pesi molecolari bassi o alti. Generalmente alti pesi molecolari dei “building blocks” risultano nella formazione di vescicole o micelle, mentre bassi pesi molecolari forniscono nanostrutture con forma di fibre o nanotubi. Nei prossimi paragrafi saranno discusse le microstrutture più comuni ottenibili con il processo di self-assembly.

### 1.3.1 Aminoacidi e Peptidi

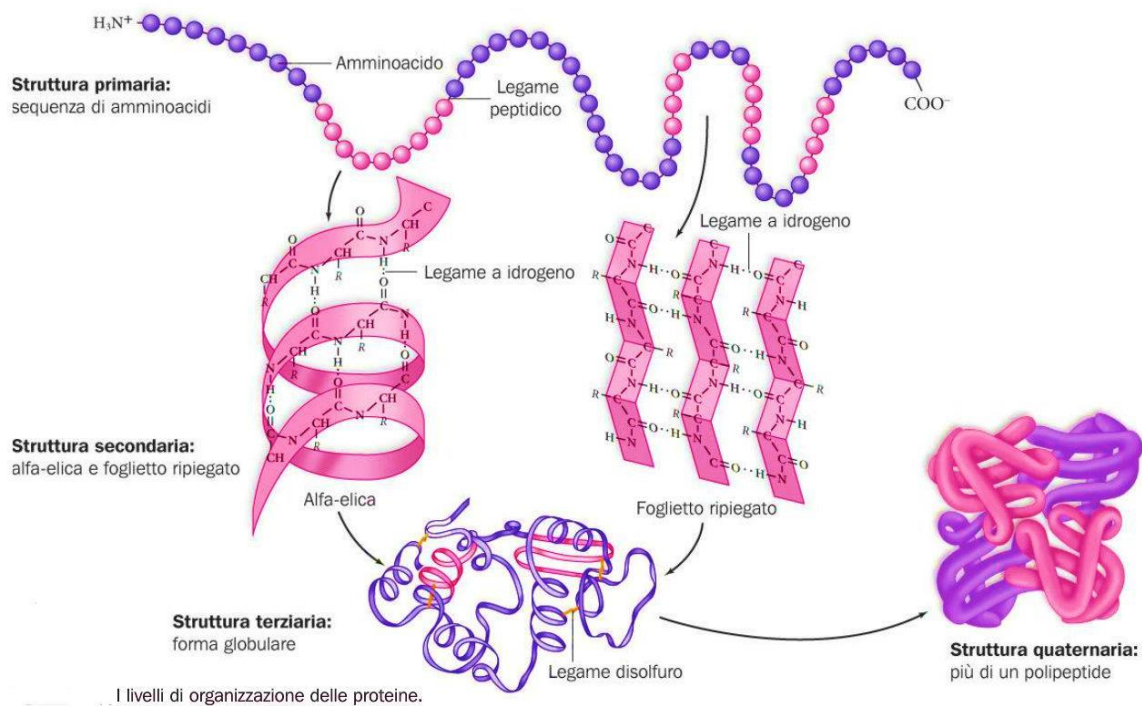


**Figura 1.3.1.1:** Rappresentazione schematica di un aminoacido e del legame peptidico. A destra gli  $\alpha$ -aminoacidi proteici.

Gli  $\alpha$ -aminoacidi sono monomeri che recano un gruppo amminico e carbossilico legati ad uno stesso atomo di carbonio. Inoltre, a seconda dell'aminoacido, lo

stesso atomo di carbonio reca altri gruppi funzionali che possono essere di differente natura (Figura 1.3.1.1). Gli  $\alpha$ -amminoacidi proteici (a parte la glicina) possiedono almeno uno stereocentro e questo spiega la proprietà di riconoscimento molecolare dei peptidi.

Per la progettazione del peptide, gli amminoacidi vengono legati l'uno all'altro in maniera controllata in modo da formare le sequenze prestabilite. Lungo le catene peptidiche si alternano i gruppi ammidici polari, rendendo disponibili unità (NH) ed unità (C=O) che prontamente si impegnano in legami ad idrogeno sia di tipo interche di tipo intra-molecolare. La struttura peptidica è generalmente organizzata in modo gerarchico su quattro livelli (Figura 1.3.1.2). La struttura primaria di un peptide è la sequenza degli amminoacidi lungo la catena poliammidica (backbone). Nel caso dei legami intra-molecolari, il peptide si ripiega precisamente su se stesso originando la struttura secondaria.



**Figura 1.3.1.2:** Rappresentazione schematica delle strutture gerarchiche dei peptidi.

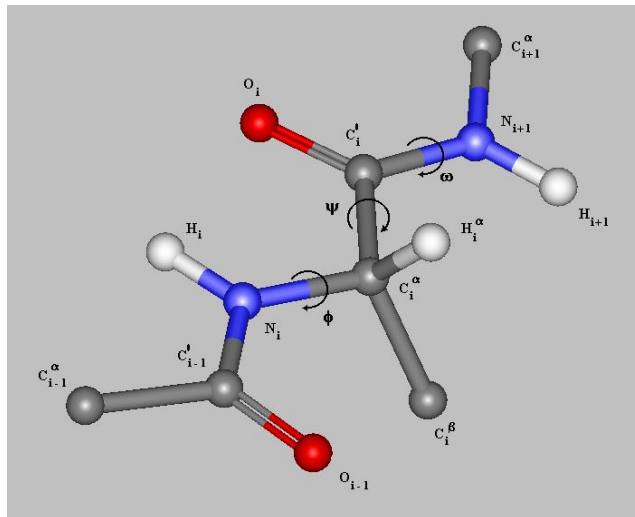
Tra le più comuni strutture secondarie stabili si citano le  $\alpha$ -eliche e le strutture  $\beta$  mentre tra quelle più labili i vari ripiegamenti random-coil. La preferenza per una o l'altra tipologia di struttura secondaria dipende dalla struttura primaria. Pertanto

differenti sequenze peptidiche mostreranno differenti strutture secondarie. Le strutture secondarie successivamente possono ulteriormente modificarsi grazie alla successiva formazione di piccoli domini ripiegati all'interno della stessa struttura secondaria, in una struttura terziaria. Quello che fondamentale distingue la struttura secondaria dalla terziaria, è che nella terziaria sono presenti interazioni non covalenti diverse dai soli legami ad idrogeno, promosse soprattutto dalle catene laterali degli amminoacidi. Infine la struttura quaternaria deriva dalla combinazione di due o più catene peptidiche, attraverso ulteriori interazioni non covalenti, per originare sub-unità.

### **1.3.2 Eliche peptidiche**

---

Capire come una catena peptidica si disponga nello spazio (struttura secondaria) è la base per ottenere dettagliate informazioni sui meccanismi coinvolti nel riconoscimento molecolare e, in generale, nelle funzioni biologiche svolte da peptidi e proteine. La struttura secondaria di una catena peptidica è molto influenzata dalla natura degli  $\alpha$ -amminoacidi presenti e dai legami a idrogeno che si instaurano fra i gruppi carbonilici e i protoni ammidici dello scheletro peptidico. Per indicare gli angoli torsionali che definiscono la conformazione di una catena polipeptidica (*Figura 1.3.2.1*) viene utilizzata la convenzione raccomandata dalla Commissione IUPAC-IUB per la Nomenclatura Biochimica<sup>(9)</sup>.

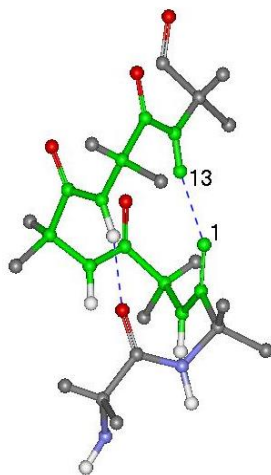


**Figura 1.3.2.1:** Rappresentazione di una catena polipeptidica (due unità peptidiche). Sono indicate le notazioni raccomandate per gli atomi e per gli angoli torsionali. La catena è rappresentata nella conformazione completamente estesa ( $\Phi_i = \Psi_i = \omega_i = 180^\circ$ ) e il residuo centrale è in configurazione L.

Le strutture secondarie peptidiche più note sono l'elica- $\alpha$ , le strutture- $\beta$ , i ripiegamenti- $\beta$  e l'elica- $3_{10}$ <sup>(10)</sup>. Fra le strutture secondarie organizzate le strutture elicoidali sono le più comuni.

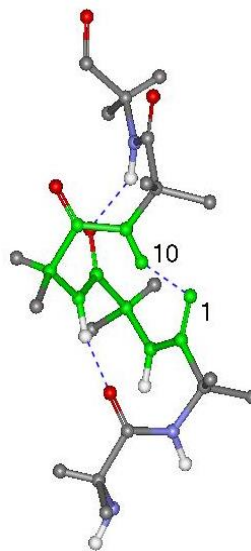
**Figura 9A**

Elica- $\alpha$  destrorsa.

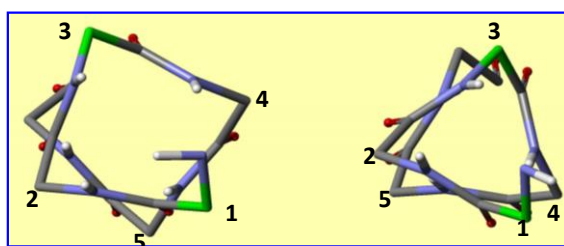


**Figura 9B**

Elica- $3_{10}$  destrorsa.



$\alpha$ -ELICA



ELICA  $3_{10}$

**Figure 1.3.2.2:** Proiezioni lungo l'asse dell' $\alpha$ -elica e dell'elica- $3_{10}$ .

Esse differiscono per il numero di residui di  $\alpha$ -amminoacido per giro d'elica, per il passo dell'elica, per il numero di atomi coinvolti nei cicli formati dai legami a idrogeno intramolecolari  $C=O \cdots H-N$  e per gli angoli torsionali ( $\phi$  e  $\psi$ ). Le eliche piú note sono l'elica- $\alpha$  e l'elica  $3_{10}$ . L' $\alpha$ -elica (Figura 1.3.2.2 A) è caratterizzata da 3.63 residui per giro ed è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo  $C=O$  di un residuo in posizione  $i$  e il gruppo  $N-H$  in posizione  $i+4$  ( $i \leftarrow i+4$ ) (Fig. 10), che formano così cicli di 13 atomi (ripiegamenti- $\alpha$  o strutture  $C_{13}$ ). L' elica- $3_{10}$  (Figura 1.3.2.2 B) ha 3.24 residui amminoacidici per giro. È stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari tra il gruppo  $C=O$  in posizione  $i$  e il gruppo  $N-H$  in posizione  $i+3$  ( $i \leftarrow i+3$ ) (Figura 1.3.2.3), che formano così cicli di 10 atomi (ripiegamenti  $\beta$  o strutture  $C_{10}$ ). L'elica- $3_{10}$  risulta piú stretta (Figura 1.3.2.2) e allungata rispetto all' $\alpha$ -elica. I parametri che caratterizzano le due strutture sono riportati in Tabella 1.3.2<sup>(10)</sup>.

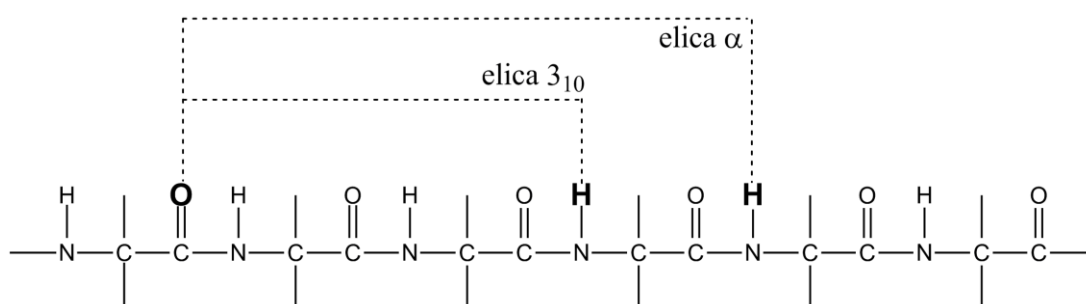


Figura 1.3.2.3: Legami a idrogeno intramolecolari nei due tipi di eliche ( $\alpha$  e  $3_{10}$ ).

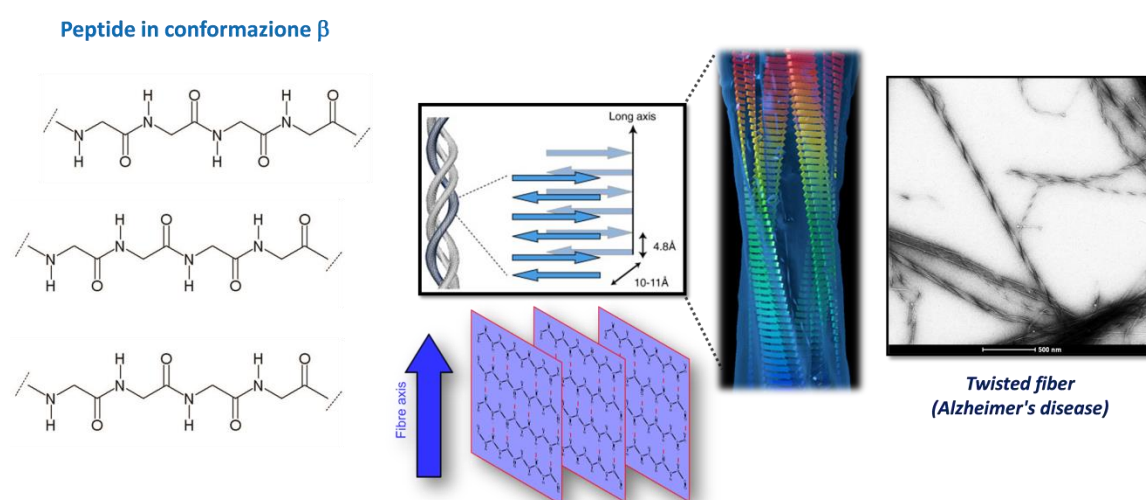
Tabella 1.3.2: Parametri delle eliche destrogire di tipo  $3_{10}$  e  $\alpha$ .

Parametro	Elica- $3_{10}$	Elica- $\alpha$
$\Phi$	$-57^\circ$	$-63^\circ$
$\Psi$	$-30^\circ$	$-42^\circ$
Angolo del legame idrogeno $N \cdots O=C$	$128^\circ$	$156^\circ$
Rotazione per residuo	$111^\circ$	$99^\circ$
Traslazione assiale per residuo	$1.94 \text{ \AA}$	$1.56 \text{ \AA}$
Numero di residui per giro	3.24	3.63
Passo dell'elica	$6.29 \text{ \AA}$	$5.67 \text{ \AA}$

## 1.4 Tipi di microstrutture auto-assemblate

### 1.4.1 Fibre

L'utilizzo del processo di self-assembly per generare nanofibre ha ricevuto molto interesse nella comunità scientifica. Infatti queste strutture sono potenziali "mattoni" per la costruzione di bio-sensori di prossima generazione. Molte differenti strutture peptidiche hanno mostrato l'abilità di auto-associazione in strutture nano-fibrillari. La struttura fibrosa a base peptidica più conosciuta è senza dubbio quella di tipo amiloide. Questa si origina da strutture peptidiche che possiedono una conformazione di tipo beta sheets, dove le singole catene tendono ad associarsi (i) lungo un asse, tramite legami ad idrogeno, (ii) lungo un altro asse, tramite le interazioni non covalenti (di ogni natura possibile) fra le catene laterali degli amminoacidi, (iii) ed infine ad arrotolarsi lungo un piano per generare lunghe fibre insolubili (Figura 1.4.1). Dal punto di vista biologico, l'insolubilità delle fibre è un processo che crea delle patologie importanti, tra le quali la malattia di Alzheimer. Tuttavia, dal punto di vista dell'applicazione come per esempio i bio-sensori, l'insolubilità è una proprietà desiderabile dato che assicura una lunga stabilità termica al sensore.

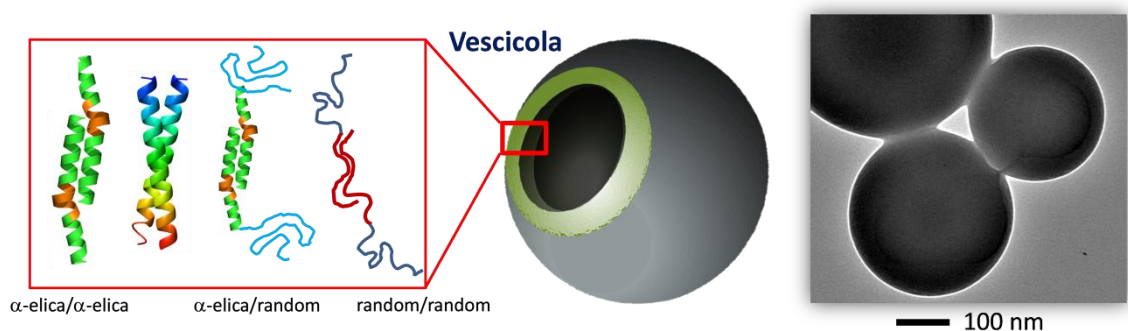


**Figura 1.4.1:** Rappresentazione schematica della formazione di fibre a base peptidica tramite auto-associazione. A destra nella figura, una immagine TEM (microscopia a trasmissione elettronica) di una fibra ottenuta nei nostri laboratori.



## 1.4.2 Vescicole

L'aspetto interessante delle vescicole è che esse contengono uno spazio vuoto all'interno che può essere riempito con altre molecole o materiali. In natura un esempio è rappresentato dai liposomi. In particolare lo sviluppo di nano-vescicole per il rilascio di farmaci continua a dare un input nella ricerca di nuove molecole che si auto-associno in questa tipologia di nano-strutture, per migliorare, ad esempio, le proprietà farmaco-cinetiche e farmaco-dinamiche dei sistemi già esistenti. Per quanto riguarda i "building block", peptidi anfifilici (molecole che contengono sia parti idrofiliche che idrofobiche) e polipeptidi-ibridi (una parte polipeptidica ed una polimerica di altra natura) si sono dimostrati ottimi candidati per generare strutture vescicolari. Nella *figura 1.4.2* sono riportati alcuni modelli di strutture polipeptidiche in conformazione  $\alpha$ -elicoidale o random coil, che grazie alla loro natura anfifilica sono in grado di auto-associarsi, con meccanismi diversi a seconda della tipologia del "building block", in strati che poi si richiudono assumendo una forma sferica, che può raggiungere dimensioni anche dell'ordine dei micrometri. Anche in questo caso le interazioni non covalenti sono la chiave per la formazione della nano-struttura.

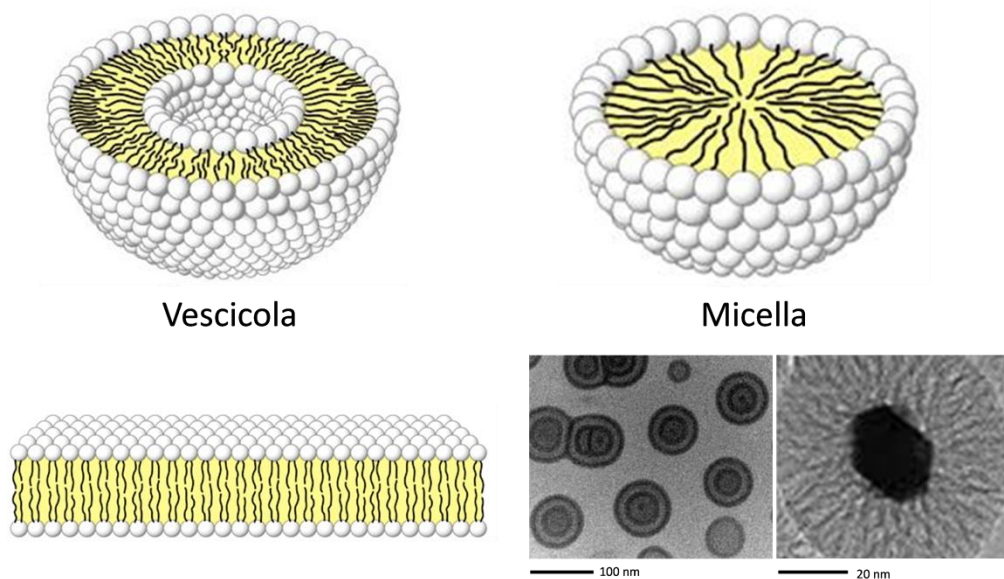


**Figura 1.4.2:** Rappresentazione schematica della formazione di strutture vescicolari a partire da peptidi. A destra nella figura, una immagine TEM di vescicole ottenuti nei nostri laboratori.

## 1.4.3 Micelle

Alcune molecole, per esempio i tensioattivi, sono definite come specie anfifiliche, cioè molecole che recano una parte polare e una apolare. La parte apolare è costituita in genere da una lunga catena idrocarburica (idrofoba) e quella polare

reca una porzione ionica (idrofila). Quando si pone un tensioattivo in acqua, esso tende a stare in superficie, con la testa polare immersa (solvatata) in acqua e la coda apolare adagiata nell'interfaccia atmosfera/acqua (le sostanze polari e apolari non si respingono se messe a contatto, è la formazione di una soluzione che non è energeticamente favorita). Aumentando la concentrazione di tensioattivo, ad un certo punto la superficie si satura, raggiungendo quella che viene chiamata concentrazione critica micellare (CMC). Se aggiungiamo ancora molecole di tensioattivo, queste saranno costrette ad andare in soluzione, e dato che ogni sistema evolve per minimizzare l'energia, si formano così le micelle. Queste hanno una struttura sferica formata da molecole di tensioattivi disposti a raggiera, come una ruota di bicicletta, ma in 3 dimensioni. La testa è a contatto con l'acqua, le code sono rivolte all'interno della sfera proprio perché idrofobe (*Figura 1.4.3*).

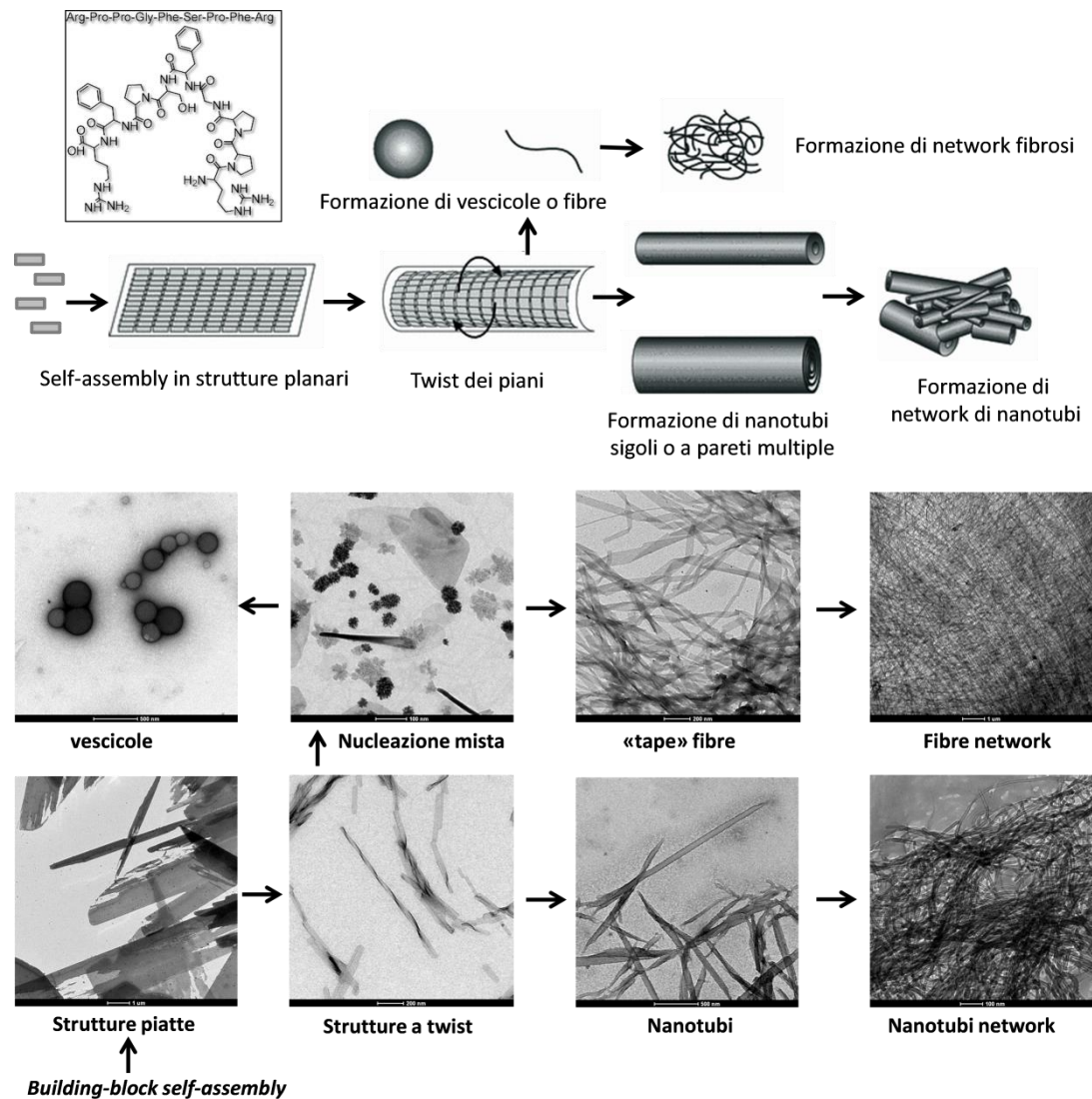


**Figura 1.4.3:** Rappresentazione schematica della formazione di strutture vescicolari a partire da peptidi. A destra, in basso nella figura, una immagine TEM di micelle.

Anche in questo caso, utilizzando polipeptidi anfifilici è possibile sfruttare il processo di auto-assemblaggio per formare strutture micellari che recano le funzionalità multivalenti dei peptidi e possono essere utilizzate in una vasta gamma di applicazioni, come per esempio quelle diagnostiche o terapeutiche. La relazione tra la progettazione del "building-block", la sua struttura secondaria e la forma e dimensione della struttura secondaria evidenzia come il bilancio tra le interazioni idrofiliche e quelle idrofobiche sia un equilibrio complesso tutt'ora in fase di studio.

### 1.4.4 Nanotubi

Un'altra tipologia di microstruttura interessante che deriva dal self-assembly di strutture peptidiche è quella dei nanotubi. I nanotubi sono definiti come nano-oggetti elongati con un vuoto interno ben definito. Contrariamente alle strutture fibrose i nanotubi sono poco frequenti e difficili da ottenere. Tuttavia, ricevono molto interesse nel campo del self-assembly in quanto componenti supposti "chiave" per la nanotecnologia. La chiave della loro formazione è un forte compromesso di interazioni dinamiche che coinvolgono formazione e dissociazione delle specie monomeriche e prevedono la formazione di microstrutture intermedie della tipologia discussa precedentemente (*Figura 1.4.4*).



**Figura 1.4.4:** Rappresentazione schematica della formazione di nanotubi a partire da peptidi. In basso nella figura, immagini TEM di nanotubi ottenuti nei nostri laboratori.

### 1.5.1 Azobenzene come unità isomerizzabile

---

Gli azo-composti sono formati da due atomi di azoto legati da un doppio legame, e possono essere sostituiti in modo simmetrico o asimmetrico. La sintesi della più semplice molecola azo-aromatica, l'azobenzene, fu per la prima volta descritta da Mitscherlich nel 1834, quando mescolò il nitrobenzene in una soluzione alcolica di idrossido di potassio ottenendo dei cristalli rossi<sup>(11)</sup>. Negli anni seguenti furono subito intuite le potenzialità di questa molecola nel campo dei coloranti per tessuti.

Attualmente gli azo-composti sono utilizzati come coloranti per stampe, tessuti e come indicatori in chimica analitica. La ricerca sta però esplorando nuovi campi di applicazione per questa classe di molecole, come le potenzialità nella chimica della catalisi<sup>(12)</sup>, in chimica supramolecolare<sup>(13)</sup> e dei polimeri<sup>(14)</sup>.

Il nome "azo" non è quello ufficiale IUPAC per questi composti, anche se per motivi storici viene ampiamente utilizzato e compreso dai più. Il nome sistematico del gruppo N=N è infatti "diazene", e di conseguenza l'azobenzene diviene il difenildiazene, come i relativi isomeri "cis" e "trans" diventano "Z" ed "E". Comunque in questo lavoro di tesi si utilizzeranno i nomi storici "azo", "cis" e "trans".

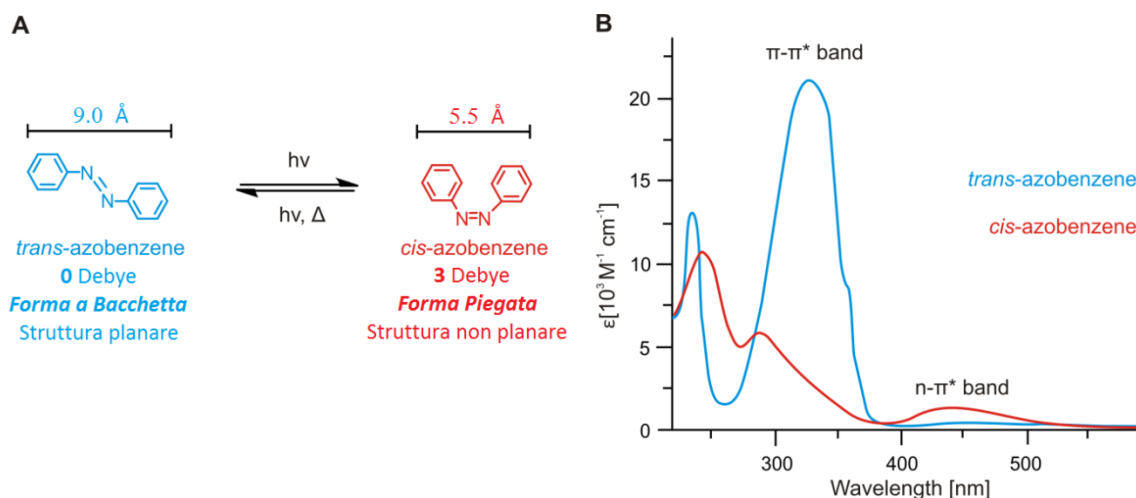
La sintesi dell'azobenzene e di molti suoi derivati, può seguire diverse metodiche tra cui citiamo:

1. Azo coupling: è il metodo più usato ad oggi per costruire azo-composti. Si tratta di una sostituzione elettrofila all'anello aromatico ad opera di un sale di diazonio<sup>(15)</sup>;
2. Coupling ossidativi e riduttivi: sono reazioni di dimerizzazione, utilizzate nella sintesi di azo-composti simmetrici e si compongono rispettivamente da reazioni di ossidazione di un'anilina derivato (con ad es. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o di riduzione di un nitrobenzene derivato (con ad es. Zn/NaOH). In entrambi i casi si mira a produrre una miscela di arilammina e arilnitroso composti che reagiscono rapidamente in situ per formare l'azo prodotto<sup>(16)</sup>;

3. Reazioni catalizzate: si sfrutta soprattutto per la sintesi di azo-composti asimmetrici. Sfrutta le proprietà catalitiche del Pd in una serie di reazioni prima tra un alogenuro arilico e un'idrazina-Boc protetta, per formare una N-Boc-aril idrazina, poi fatta a sua volta reagire (sempre con l'ausilio di Pd come catalizzatore) con un secondo alogenuro arilico che dà una N-Boc-diaril idrazina, poi deprotetta e ossidata per dare l'azo-prodotto<sup>(17)</sup>;
4. Infine la condensazione di Mills: particolarmente adatta ai nostri scopi, si compone di una reazione one-step in acido acetico glaciale tra un anilinderivato e un nitrosobenzen-derivato per formare l'azo-prodotto. È la medesima reazione che caratterizza le dimerizzazioni redox viste prima, dove però i due partner del coupling sono disponibili separatamente. Per questo motivo il prodotto può essere sia simmetrico che asimmetrico a seconda delle molecole di partenza, il che rende questa reazione molto versatile in questo ambito (vedi figura 3.1.2)<sup>(27)</sup>.

## 1.5.2 Proprietà fotofisiche dell'azobenzene

La caratteristica peculiare di questo composto, oltre al suo colore arancio intenso, è la sua capacità di foto-isomerizzazione reversibilmente tra i due isomeri, cis e trans (Figura 1.5.2).



**Figura 1.5.2:** A) Rappresentazione del processo di foto-isomerizzazione della molecola di azobenzene<sup>(14)</sup>; B) Spettro di assorbimento in etanolo per i due isomeri cis e trans dell'azobenzene<sup>(18)</sup>.

Come abbiamo già accennato, l'azobenzene può essere presente in due distinte configurazioni: *trans* e *cis*. Queste possono essere inter-convertite mediante irraggiamento del campione con luce UV-Vis. La forma *cis* risulta stabile allo stato solido, mentre isomerizza spontaneamente a temperatura ambiente alla forma *trans* se in soluzione. Questo perché l'isomero *trans* è termodinamicamente più stabile ( $50 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) del *cis*, con una barriera energetica per il processo di fotoisomerizzazione di  $200 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Nello spettro di assorbimento del *trans* azobenzene (curva blu di *figura 1.5.2 B*) è presente un'intensa banda di transizione  $\pi-\pi^*$  a circa 330nm e una molto più debole intorno a 440nm data dalla transizione (simmetricamente vietata)  $n-\pi$ . Per contro nel caso del *cis* azobenzene la transizione  $n-\pi$  è permessa e di conseguenza aumenta l'intensità della banda di assorbimento a 440nm (curva rossa di *figura 1.5.2 B*)<sup>(18)</sup>. Di conseguenza data la separazione tra i picchi di assorbimento, gli azo composti possono essere isomerizzati da *trans*  $\rightarrow$  *cis* tramite irraggiamento in corrispondenza della banda  $\pi-\pi^*$  (330nm) e da *cis*  $\rightarrow$  *trans* termicamente o irraggiando in corrispondenza della banda  $n-\pi$  (440nm)<sup>(14)</sup>. In particolare il processo termico da *cis* a *trans* per la molecola in questione dura alcune ore a temperature ambiente, mentre l'isomerizzazione foto-indotta è nel complesso un processo estremamente rapido che avviene nella scala dei picosecondi (quando sciolto in soluzioni diluite) ed inoltre molto efficiente data la mancanza di evidenti fenomeni di emissione sia per la forma *trans* che *cis*.

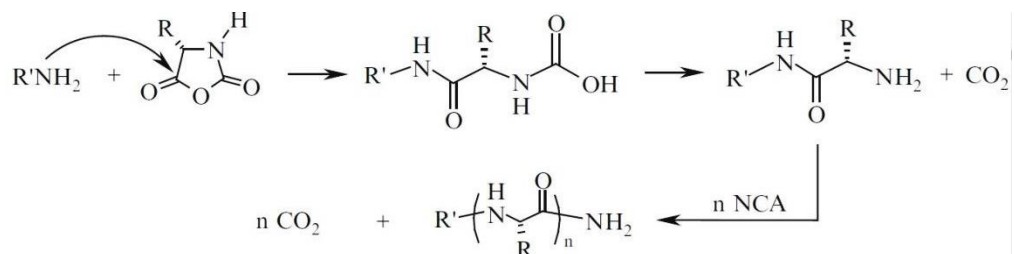
L'isomerizzazione porta con sé un serio cambiamento strutturale dato sia dalla variazione della distanza tra i due atomi di carbonio in para ( $9 \text{ \AA}$  *trans*  $\rightarrow$   $5.5 \text{ \AA}$  *cis*)<sup>(14)</sup>, sia dalla ri-orientazione reciproca degli anelli aromatici che nella forma *cis* formano  $56^\circ$ . Questi cambiamenti geometrici portano ad una variazione del momento di dipolo, quantificato da 0 Debye per la forma *trans* a 3 Debye per la *cis* (*figura 1.5.2 A*)<sup>(14)</sup>. Pertanto, opportunamente funzionalizzato, l'azobenzene può orientare eventuali molecole ad esso coniugate in posizioni differenti, generando ad esempio, variazioni di forma o dimensione nei materiali o nelle microstrutture in cui viene inserito.

## 1.6 Il Poli $\gamma$ -Benzil-L-Glutammato

I poli aminoacidi sintetici sono polimeri comuni composti da  $\alpha$ -aminoacidi attraverso la connessione di legami peptidici (-CO-NH-), caratterizzati da eccellente biocompatibilità e da buona biodegradabilità in vivo<sup>(20)</sup>. Ciò li rende ideali per l'implementazione in ambito medico-farmaceutico. Nella ricerca presente infatti, i poli aminoacidi sintetici sono studiati per un utilizzo in campi come la veicolazione di farmaci<sup>(21)</sup>, come materiali per la ricostruzione di tessuti<sup>(22)</sup> e vettori per il trasporto di geni<sup>(23)</sup>.

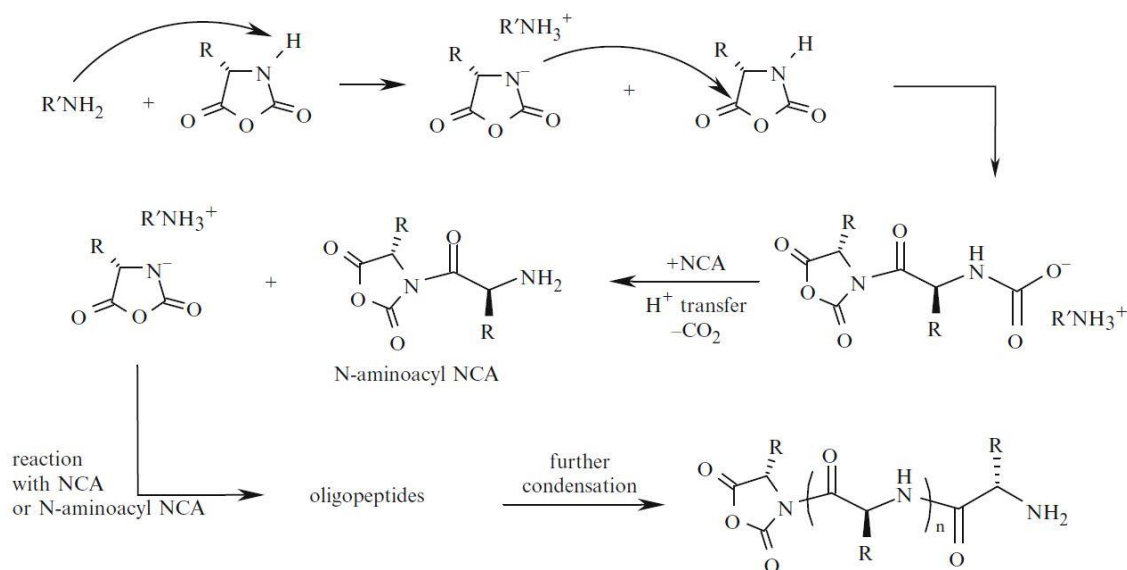
Tra i poli aminoacidi, il più largamente studiato è il poli( $\gamma$ -benzil-L-glutammato) o PBLG che viene facilmente degradato in vivo ad acido-L-glutammico che è un'amminoacido essenziale<sup>(19)</sup>. Questo polimero viene sintetizzato attraverso un processo chiamato polimerizzazione ad apertura di anello (ring-opening polymerization, ROP), che prevede l'attacco di una specie nucleofila al monomero  $\gamma$ -benzil-L-glutammato *N*-carbossi-anidride (BLG-NCA). Il meccanismo di tale polimerizzazione è stato studiato per più di 40 anni e migliorato in modo da poter realizzare il perfetto controllo nella crescita della catena polimerica. La metodologia tradizionale di polimerizzazione ROP utilizzando monomeri di tipo NCA, presenta due meccanismi di polimerizzazione:

1. un meccanismo chiamato "normal amine mechanism" (NAM) (Figura 1.6.1), in cui l'attacco nucleofilo è portato da una ammina primaria o comunque da un reagente nucleofilo forte. Questo meccanismo presenta in generale una fase iniziale di polimerizzazione lenta<sup>(24)</sup>;



**Figura 1.6.1:** Polimerizzazione di una generica NCA mediante "normal amine mechanism" NAM.

2. un meccanismo chiamato “activated monomer mechanism” (AMM) (Figura 1.6.2). E' promosso da basi forti, come alcune ammine secondarie o terziarie, e solitamente porta alla formazione di poli aminoacidi con peso molecolare maggiore rispetto al meccanismo NAM, ma con distribuzioni di pesi molecolari più ampie<sup>(24)</sup>.



**Figura 1.6.2:** Polimerizzazione di una generica NCA mediante “activated monomer mechanism”  
AMM.

## 1.7 Scopo della Tesi

Lo scopo della Tesi è la realizzazione di molecole e macromolecole in grado di auto assemblarsi in strutture supramolecolari, e di rispondere a stimoli esterni. Lo studio prevede la realizzazione dei seguenti punti:

- 1) Sintesi di nuovi aminoacidi contenenti unità di azobenzene in catena laterale.
- 2) Sintesi di piattaforme di simmetrie  $C_2$  e  $C_3$  recanti l'unità azobenzenica da utilizzare come iniziatori di polimerizzazione.
- 3) Sintesi di polimeri basati sull' $\alpha$ -amminoacido  $\gamma$ -benzil-L-glutammato.
- 4) Auto-assemblaggio supramolecolare dei sistemi sintetizzati e relativo studio.



## 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1 MATERIALI E METODI

#### 2.1.1 Reagenti e solventi

---

<i>Acros-Janssen</i> (Geel, Belgio):	catalizzatore 10% Pd/C, ninidrina.
<i>Carlo Erba</i> (Milano):	acido solforico 98%, bicarbonato di sodio, toluene, trietilammina.
<i>Euriso-Top</i> (St. Aubin, Francia):	cloroformio deuterato, dimetilsolfossido deuterato.
<i>Fluka</i> (Buchs, Svizzera):	4-dimetilamminopiridina, di- <i>tert</i> -butil dicarbonato.
<i>Iris Biotech</i> (Marktredwitz, Germania):	<i>Di-tert-butildicarbonato</i> <i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimmide, <i>N-etil-N'</i> -(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato.
<i>J. T. Baker</i> (Deventer, Olanda):	ammonio carbonato, sodio carbonato.
<i>Macherey-Nagel</i> (Düren, Germania):	gel di silice per flash cromatografia.
<i>Merck</i> (Darmstadt, Germania):	sodio solfato.
<i>Sigma-Aldrich Co.</i> (St. Louis, USA):	acetato di etile, acido cloridrico, acido <i>p</i> -amminobenzoico acido trifluoroacetico, 5(6)-carbossifluoresceina, cloroformio, diclorometano, 2,2'-dimetossi-2-

fenilacetofenone, 1,4-diossano,  
isocianoacetato di etile, 2-mercaptoetanolo,  
N-Bromosuccinimide, metil-L-4-  
nitrofenilalanina, N,N-dimetilformammide,  
1,4-diossano, etanolo, etere etilico, etere di  
petrolio, metanolo, , pentaeritriolo, sodio  
idrossido, trifenilfosfina, tetrabuttilammonio  
bisolfatotetraidrofurano.

*VWR International* (Leuven, Belgio): acetonitrile, acido acetico, sodio cloruro.

## 2.1.2 Strumentazione

---

### *Cromatografia su strato sottile*

Le reazioni sono state seguite tramite cromatografia su strato sottile utilizzando lastre di gel di silice 60 F<sub>254</sub> (Merck). I fattori di ritenzione sono stati determinati utilizzando diverse miscele di eluenti. I composti contenenti parti aromatiche sono stati evidenziati alla lampada UV (254 nm). Si è utilizzata anche l'ossidazione con permanganato e se i composti contenevano gruppi amminici non protetti sono stati rivelati tramite una soluzione di ninidrina in etanolo.

### *Flash cromatografia*

La flash cromatografia è stata utilizzata nelle fasi di purificazione di vari prodotti di reazione. Si è utilizzata come fase stazionaria il gel di silice 60 Macherey-Nagel (granulometria 40-63 µm). Il caricamento del campione è stato effettuato con uno dei seguenti metodi:

1. caricamento diretto del prodotto, disciolto nell'eluente prescelto per la separazione, in testa alla colonna;
2. caricamento diretto del prodotto disciolto in una piccola quantità di un solvente diverso dalla miscela di eluizione;
3. caricamento dopo aver adsorbito il prodotto da purificare su gel di silice;

### *HPLC*

Per le analisi HPLC si è impiegato il cromatografo Agilent Technologies 1200 Series, con rivelazione UV a 226 nm. Sono state utilizzate le colonne analitiche a fase inversa C<sub>18</sub> Jupiter 300A (*Phenomenex*) e Zorbax 300A (250 × 4,6 mm; 5 micron).

Come eluente si è fatto uso di una miscela dei seguenti solventi:

A: H<sub>2</sub>O 90% - CH<sub>3</sub>CN 10% - TFA 0,05% v/v;

B: H<sub>2</sub>O 10% - CH<sub>3</sub>CN 90% - TFA 0,05% v/v.

### SEC

Le misure di SEC (size exclusion chromatography) sono state effettuate mediante Agilent 1260 Infinity system equipaggiata con 1260 isopump, 1260 TCC, 1260 VWD VL, 1260 RID, Phenogel 5u linear/mixed guard column (30 x 4.6 mm), seguite da colonna Phenomenex Phenogel 5u  $10^4$  Å (300 x 4.6 mm) che lavora a 60 °C. Solitamente si usa DMF come eluente con flusso di 1 ml/min. I pesi molecolari si calcolano effettuando una retta di taratura con degli standard di polistirene.

### *Spettrometria di massa*

Gli spettri di massa sono stati registrati con lo spettrometro di massa Mariner modello ESI-TOF, Perseptive Biosystems. Come da sigla, è uno spettrometro a tempo di volo che utilizzando come tecnica di ionizzazione l'electrospray ionization. Gli ioni positivi o negativi formati sono stati accelerati a 10, 15, 20 o 30 keV e analizzati in modo lineare.

### *Spettroscopia di assorbimento IR*

Gli spettri di assorbimento FT-IR allo stato solido, in pastiglia di KBr e film su KBr, sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR modello 1720X. Gli spettri di assorbimento FT-IR in soluzione di deuterocloroformio (99,80%  $d_2$ ; Euriso-Top) sono stati rilevati utilizzando celle (Perkin-Elmer) con cammino ottico 0.1 e 1 cm e finestre di KBr.

### *Spettroscopia di assorbimento UV-Vis*

Gli spettri di assorbimento nel campo dell'UV-Vis sono stati registrati mediante spettrofotometro Shimadzu UV-2501PC, sciogliendo il composto in esame in opportuna concentrazione. Può indagare un campo che va dai 190 ai 900nm, grazie a un doppio monocromatore a reticolo (uno per basse lunghezze d'onda e un secondo per le alte). Il detector è un fotomoltiplicatore R-928.

### *Spettrometria di luminescenza*

Gli spettri di fluorescenza sono acquisiti mediante spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS50B che copre in eccitazione dai 200 agli 800nm e in emissione dai 200 ai 900nm. Possono essere regolate le fenditure in eccitazione (2.5-15nm) e in emissione (2.5-20nm), oltre alla possibilità di attenuare all'1% l'emissione tramite un filtro.

### *Spettroscopia NMR*

Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono stati registrati con lo spettrometro BRUKER modello AC 200. I campioni sono stati disciolti in diclorometano deuterato (99,80%  $\text{d}_2$ ; *Euriso-Top*) o in dimetilsolfossido deuterato (99,80%  $\text{d}_6$ ; *Euriso-Top*). Gli spostamenti chimici ( $\delta$ ) sono espressi in parti per milione rispetto ai segnali della frazione non deuterata dei solventi. Le molteplicità dei picchi sono espresse come: s – singoletto, d – doppietto, t – tripletto, q – quartetto, dd – doppietto di doppietti, dt – doppietto di tripletti, td – tripletto di doppietti e m – multipletto. La sigla br ("*broad*") indica un segnale allargato.

### *TEM*

Le immagini al TEM (Transmission Electron Microscopy) sono state acquisite mediante strumento FEI TECAI G12, con sorgente al filamento di tungsteno che emette elettroni per effetto termoionico. La preparazione dei campioni è stata effettuata per deposizione di una goccia di campione su lettino in rame da 400 mesh, ricoperto da un film di carbone che funge da supporto.

### *SEM*

Le immagini al SEM (Scanning Electron Microscopy) sono state acquisite mediante strumento Carl Zeiss Merlin che opera a un voltaggio di 5kV. Il campione viene preparato mediante deposizione di una goccia di campione (sospensione colloidale) su di un vetrino da microscopio e lasciata asciugare la notte. Il materiale secco è stato rivestito con platino.

### *AFM*

Le analisi AFM (Atomic Force Microscopy) sono state acquisite mediante strumento Agilent Technologies 5500 operante in modalità acoustic AC AFM. Il campione è stato preparato depositando una goccia su una superficie di silicio e lasciata asciugare per almeno 1h prima della misurazione.

### *Dicroismo circolare*

Le misure di dicroismo circolare sono state effettuate con il dicrografo Jasco modello J-715, utilizzando celle di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 0.02 cm.

## 2.2 SINTESI AMMINOACIDI ED INIZIATORI

### 2.2.1 Octopus System

---

#### Sintesi di Acido-4-(fenilazo)benzoico [1] :

A una sospensione di PABA (4.52g ; 32.94mmol) in AcOH glaciale (22ml), si è aggiunta una seconda soluzione di nitrosobenzene (3.0g ; 28.45mmol) sempre in AcOH glaciale (33ml). Si è monitorata la reazione mediante TLC , lasciando il pallone di reazione sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per tutta la notte. Il prodotto è stato purificato mediante flash cromatografia con eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20:1), seguita da rimozione del solvente dalle frazioni di interesse e ulteriore purificazione mediante precipitazione da AcOEt con PE, ottenendo 4.94g di prodotto solido arancione acceso.

**RESA** : 78%.

**IR** :  $\nu$  3200-2300, 1678, 1429 cm<sup>-1</sup>.

**MS (ESI-TOF)** : [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 226.0742 m/z ; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 227.0845 m/z .

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  7.61-7.65 [m, 3H, CH Ar];  $\delta$  7.92-7.98 [m, 4H, CH Ar];  $\delta$  8.13-8.17 [m, 2H, CH Ar];  $\delta$  13.21 [s, 1H, COOH] .

#### Sintesi di 4-(metilol)azobenzene [2] :

In un pallone a 3 colli posto in bagno a ghiaccio e sotto flusso di N<sub>2</sub> si prepara una sospensione di LiAlH<sub>4</sub> (1.50g ; 39.52mmol) in THF anidro (100ml). Mediante un imbuto gocciolatore si inserisce lentamente (40min) una soluzione concentrata di Acido-4-(fenilazo)benzoico (4.90g ; 21.65mmol) sempre in THF anidro (110ml), osservando la formazione di bolle di H<sub>2</sub>. Dopo 24h aggiunto altro LiAlH<sub>4</sub> (1.10g ; 28.98mmol), e dopo altre 24h si è stata interrotta la reazione addizionando 35ml di una soluzione di NaOH al 30% (m/m). Il tutto è stato filtrato su celite per eliminare i sali, anidrificato con abbondante Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, portato a secco e purificato mediante

flash cromatografia (eluente Et<sub>2</sub>O/AcOEt 4:1) ottenendo 1.42g di prodotto solido arancione.

**RESA** : 31%.

**IR** :  $\nu$  3290, 1441, 1023 cm<sup>-1</sup>.

**MS (ESI-TOF)** : [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 213.1028 m/z ; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 213.1017 m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  1.85 [s br, 1H, OH];  $\delta$  4.78 [s, 2H, CH<sub>2</sub>];  $\delta$  7.49-7.53 [m, 5H, CH Ar];  $\delta$  7.90-7.94 [m, 4H, CH Ar];

### **Sintesi di 4-(bromometil)azobenzene [3] :**

In un pallone posto sotto flusso di azoto e all'interno di un bagno di acqua/ghiaccio, è stato versato il 4-(metilol)azobenzene (1.34g; 6.31mmol) sciolto in THF (30ml). A questa soluzione si sono aggiunti in successione trifenilfosfina (2.41g ; 9.20mmol) e NBS (1.64g; 9.22mmol) , lasciando reagire a temperatura ambiente il tutto per una notte sotto agitazione magnetica. La soluzione color mattone è stata quindi filtrata su gooch con della silice, e lavata abbondantemente con THF. Dopo aver portato a secco si è purificato il prodotto mediante flash cromatografia utilizzando come miscela eluente PE/AcOEt aumentando gradualmente la polarità (miscela iniziale 10:1 ; finale 2:1), ottenendo 1.12g di prodotto solido arancione.

**RESA** : 64 %.

**IR** :  $\nu$  1438 cm<sup>-1</sup>.

**MS (ESI-TOF)** : [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 275.0178 m/z ; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 275.0168m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  4.56 [s, 2H, CH<sub>2</sub>];  $\delta$  7.50-7.57 [m, 5H, CH Ar];  $\delta$  7.90-7.95 [m, 4H, CH Ar];



**Sintesi di Etil-2,2- bis[p-(fenilazo)benzil]-2-isocianoacetato [4] :**

In un pallone sono stati inseriti  $K_2CO_3$  (1.40g; 10.13mmol), tetrabuttilammonio bisolfato (0.18g; 0.52mmol) ed il 4-(bromometil)azobenzene (1.02g; 3.71mmol) e disciolti in  $CH_3CN$  anidro (18ml). Alla sospensione di bromuro si è aggiunta una soluzione di isocianoacetato di etile (0.18g; 1.63mmol) in 2ml di  $CH_3CN$  anidro e si è lasciato il tutto a reagire sotto agitazione magnetica a 50°C per 48h. Dopo aver eliminato il solvente si è purificato il prodotto di reazione mediante flash cromatografia a gradiente con eluente ES/AcOEt (miscela iniziale 10:1; finale 2:1), ottenendo 0.72g di un solido color rosso.

**RESA** : 82 %.

**IR** :  $\nu$  2133, 1728, 1439, 1238  $cm^{-1}$ .

**MS (ESI-TOF)** :  $[M+H]^+_{calc.} = 502.2165$  m/z ;  $[M+H]^+_{sper.} = 502.2237$  m/z .

**$^1H$  NMR** (200MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  1.08 [t, 3H,  $J=7.1Hz$ ,  $CH_2CH_3$ ];  $\delta$  3.18 [d, 2H,  $CH_2$  Benzilici];  $\delta$  3.48 [d, 2H,  $CH_2$  Benzilici];  $\delta$  4.09 [q, 2H,  $J=7.1Hz$ ,  $CH_2CH_3$ ];  $\delta$  7.43-7.53 [m, 10H,  $CH$  Ar];  $\delta$  7.88-7.94 [m, 8H,  $CH$  Ar].

**Sintesi di bis[p-(fenilazo)benzil]glicinato di etile · HCl (H-pazoDbg-OEt · HCl) [5]:**

In un pallone si è sospeso l'isocianoacetato (0.64g ; 1.28mmol) in EtOH (22ml) e dopo aver posto all'interno di un bagno acqua/ghiaccio è stato aggiunto goccia a goccia HCl 37% (2.1ml) . Dopo 2h si è aggiunto dell'altro HCl (1ml) e dopo 4h si è evaporato il solvente, sospeso in  $H_2O$  e liofilizzato ottenendo 0.67g di pazoDbg cloridrato.

**RESA** : 99 %.

**IR** :  $\nu$  3434,1740, 1444, 1220,1108  $cm^{-1}$ .

**MS (ESI-TOF)** :  $[M+H]^+_{calc.} = 491,2321$  m/z ;  $[M+H]^+_{sper.} = 492.2266$  m/z;  $[2M+H]^+_{sper.} = 983.4949$  m/z.

$^1\text{H NMR}$  (200MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.28 [t, 3H,  $J=7.1\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ];  $\delta$  3.40 [d, 2H,  $\text{PhCH}_2$ ];  $\delta$  3.48 [d, 2H,  $\text{PhCH}_2$ ];  $\delta$  4.26 [q, 2H,  $J=7.1\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ];  $\delta$  7.52-7.63 [m, 10H,  $\text{CH Ar}$ ];  $\delta$  7.85-7.92 [m, 8H,  $\text{CH Ar}$ ];  $\delta$  8.69 [s br, 3H,  $\text{NH}_3^+$ ].

#### Sintesi di N-trifluoroacetil-bis[p-(fenilazo)benzil]glicina (TFac-pazoDbg-OH) [6] :

A una sospensione di H-pazoDbg-OEt · HCl (0.55g ; 1.10mmol) in etanolo (25ml) è stata aggiunta una soluzione 2M di KOH in EtOH/H<sub>2</sub>O 2:1 (3 ml). La miscela di reazione è stata quindi mantenuta sotto agitazione magnetica per 48h a 40°C. Il solvente è stato quindi allontanato al rotavapor, e il residuo risospeso in H<sub>2</sub>O (25,0ml), neutralizzato con HCl 2M, ed estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20ml). La fase organica è stata anidrificata con MgSO<sub>4</sub>, filtrata e portata a secco, ottenendo 0.46g di bis[p-(fenilazo)benzil]glicina (H-pazoDbg-OH) che si presenta come un solido giallo. Tutto il prodotto così idrolizzato è stato aggiunto a una soluzione 1:1 di Acidotrifluoroacetico anidro/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8ml), e mantenuto sotto agitazione magnetica e a riflusso per 12h. Si è quindi rimosso il solvente, ridisciolti in AcOEt e sottoposto a lavaggio con soluzione acquosa di KHSO<sub>4</sub> 10% e Brine. Dopo aver anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> si è portato a secco ottenendo 0.52g di prodotto.

RESA : 84 %.

IR (KBr) :  $\nu$  3327, 3060, 2938, 1719, 1602, 1519  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (ESI-TOF) :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 559.1831 \text{ m/z}$  ;  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sper.}} = 560.2048 \text{ m/z}$ .

$^1\text{H NMR}$  (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  3.44 [d, 2H,  $J=11.8 \text{ Hz}$ ];  $\delta$  3.65 [s br, 2H];  $\delta$  7.19 [d, 6H, 7.4 Hz];  $\delta$  7.41-7.38 [m, 7H];  $\delta$  7.66-7.74 [m, 8H].

$^{13}\text{C NMR}$  (50MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  40.26,  $\delta$  67.89,  $\delta$  112.64,  $\delta$  118.64,  $\delta$  122.66,  $\delta$  123.14,  $\delta$  123.79,  $\delta$  129.11,  $\delta$  130.72,  $\delta$  131.34,  $\delta$  139.03,  $\delta$  151.75,  $\delta$  152.33,  $\delta$  157.00,  $\delta$  177.11.

**Sintesi di Tetra[ TFA-pazoDbg-O ]pentaeritriolo (Octobus System) [7] :**

A una soluzione di pentaeritriolo (2.1mg ; 0.16mmol), TFac-pazoDbg-OH (0.45g ; 0.80mmol) e DMAP (2.3mg ; 0.18mmol) disciolti in 5ml di DMF anidro, è stata aggiunta DIC (0.18g ; 1.44mmol) e la reazione è stata poi mantenuta sotto agitazione magnetica a 50°C per 4 giorni. Si è quindi rimosso il solvente e si è purificato il prodotto di reazione mediante flash cromatografia con eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH ( 98:2) ottenendo 1.65g di solido rosso.

**RESA** : 89 %.

**IR (KBr)** :  $\nu$  3384, 3058, 2940, 1726, 1529 cm<sup>-1</sup>.

**MS (ESI-TOF)** : [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 2300.7638 m/z ; [M+2H]<sup>2+</sup><sub>sper.</sub> = 1151.4121 m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  3.30 [d, 8H];  $\delta$  3.83 [s, 8H];  $\delta$  6.82 [s, 4H];  $\delta$  7.04-7.08 [m, 16H];  $\delta$  7.40-7.47 [m, 24H] ;  $\delta$  7.75-7.83 [m, 32H].

**<sup>13</sup>C NMR** (50MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  40.71,  $\delta$  43.25,  $\delta$  63.04,  $\delta$  66.22,  $\delta$  67.13,  $\delta$  112.54,  $\delta$  118.28,  $\delta$  122.79,  $\delta$  123.26,  $\delta$  123.62,  $\delta$  124.01,  $\delta$  129.15,  $\delta$  130.48,  $\delta$  131.35,  $\delta$  137.11,  $\delta$  152.07,  $\delta$  152.55,  $\delta$  157.00,  $\delta$  170.22.

## 2.2.2 Azo(Ala)<sub>2</sub> : Inziatore a base amminoacidica fotosensibile "lineare" a simmetria C<sub>2</sub>.

---

### Sintesi di Metil N-Boc-L-4-Nitrofenilalanina; [Boc-(p-NO<sub>2</sub>-Phe)-OMe] [8] <sup>(1)</sup> :

Si è sciolta la metil-4-nitrofenilalanina cloridrato (4.90g ; 18.8mmol) in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1 (20ml) , portando il tutto a pH≈9 con Et<sub>3</sub>N. A questa soluzione è stata aggiunta a piccole aliquote una soluzione di Boc<sub>2</sub>O (5.50g ; 25.2mmol) in CH<sub>3</sub>CN (10ml), lasciando il tutto a reagire a r.t. per una notte sotto agitazione magnetica (notando la formazione di cristalli aghiformi bianchi in sospensione). Si è quindi ridotto il volume di due terzi e si è estratto il prodotto in imbuto separatore con AcOEt (200ml), operando alla fase organica alcuni lavaggi acquosi (KHSO<sub>4</sub> 5% ; NaHCO<sub>3</sub> 5% ; Brine). Dopo aver anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e portato a secco si sono ottenuti 5.90g di prodotto che si presenta come un solido bianco.

**RESA** : 97 %.

**IR (KBr)** :  $\nu$  3358, 2985, 1732, 1689, 1524, 1346 cm<sup>-1</sup> .

**MS (ESI-TOF)** : [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 325.1394 ; [M-Boc+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 225.0922 m/z ; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 325.3298 m/z .

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  1.40 [s, 9H];  $\delta$  3.11 [dd, J=13.7, J=5.8, 1H];  $\delta$  3.27 [dd, J=13.7, J=5.7, 1H];  $\delta$  3.73 [s, 3H];  $\delta$  4.58-4.68 [m, 1H];  $\delta$  5.6 [d br, J=7.7Hz, 1H] ;  $\delta$  7.29-7.33 [m, 2H] ;  $\delta$  8.14-8.18 [m, 2H].

### Sintesi di Metil N-Boc-4-Amminofenilalanina; [Boc-(p-NH<sub>2</sub>-Phe)-OMe] [9] :

E' stata eseguita una riduzione catalitica sulla Metil N-Boc-4-Nitrofenilalanina. Inizialmente si è scilto il nitrocomposto (2.40g ; 7.40mmol) in MeOH (50ml). Dopo aver lasciando gorgogliare N<sub>2</sub> nella soluzione per 10min si è aggiunto Pd/C (10% m/m ; 0.305g) facendo fluire nuovamente N<sub>2</sub>. Si è iniziato quindi a flussare H<sub>2</sub> per 20minuti, lasciando poi sotto agitazione per altri 20 minuti.

Si è filtrato il tutto su celite per eliminare il catalizzatore, e portato a secco ottenendo un liquido viscoso incolore. Si è purificato il nostro prodotto mediante separazione in flash cromatografia con eluente AcOEt/Etano (1:1), ottenendo 2.09g di un solido rosato.

**RESA** : 96 %.

**IR (KBr)** :  $\nu$  3397, 3374, 3232, 1741, 1690, 1515  $\text{cm}^{-1}$  .

**MS (ESI-TOF)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 295.1652 \text{ m/z}$  ;  $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+_{\text{sper}} = 195.1231 \text{ m/z}$  ;  
 $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sper.}} = 295.1732 \text{ m/z}$  ;  $[2\text{M}+\text{H}]^+ = 589.3275 \text{ m/z}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.40 [s, 9H];  $\delta$  2.96 [d,  $J=5.7$ , 2H];  $\delta$  3.44 [s br, 2H];  $\delta$  3.70 [s, 3H];  $\delta$  4.45-4.55 [m, 1H];  $\delta$  4.95 [d br,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H] ;  $\delta$  6.59-6.63 [m, 2H] ;  $\delta$  6.87-6.91 [m, 2H].

#### **Sintesi di Metil N-Boc-4-Nitrosifenilalanina; [Boc-(p-NO-Phe)-OMe] [10] :**

Si è aggiunto lentamente Zn in polvere (0.60g ; 9.17mmol) a una soluzione di Metil N-Boc-4-Nitrosifenilalanina (1.070g; 3.30mmol) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.79g; 14.83mmol) in EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  5:1 (42ml). Si è osservato un viraggio della soluzione da incolore a verde chiaro. Dopo 2h si è filtrato su celite per eliminare lo Zn in eccesso e lavato con EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  5:1 (40ml) freddo. Il filtrato è stato versato in una soluzione di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (6.33g; 23.41mmol) in EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  5:1 (35ml) (preventivamente raffreddata in bagno a acqua/ghiaccio) notando il rapido viraggio da verdino a verde pavone. Dopo 30min la miscela è stata diluita con Brine quindi è stata estratta in imbuto separatore con AcOEt, ed in seguito si si è anidrificato la fase organica con  $\text{NaSO}_4$ . Dopo aver rimosso il solvente al rotavapor e separato il prodotto di reazione è stato purificato mediante flash cromatografia con eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  30:1 ottenendo 0.91g di liquido oleoso verde.

**RESA** : 89 %.

**$^1\text{H}$  NMR** (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.40 [s, 9H];  $\delta$  3.13 [dd,  $J=13.4$ ,  $J=6.1$ , 1H];  $\delta$  3.27 [dd,  $J=13.7$ ,  $J=5.4$ , 1H];  $\delta$  3.73 [s, 3H];  $\delta$  4.61-4.67 [m, 1H];  $\delta$  5.8 [m, 1H] ;  $\delta$  7.26-7.40 [m, 2H] ;  $\delta$  7.81-7.85 [m, 1H] ;  $\delta$  8.13-8.17 [m, 1H].

**Sintesi di 4,4'-diazendiildi(Metil N-Boc-alanina); [Azo (Boc-Phe-OMe)<sub>2</sub>] [11] :**

A una soluzione in Acido acetico glaciale (15.0ml) di Metil N-Boc-4-Nitrosifenilalanina (0.91g; 2.94mmol), è stata aggiunta una soluzione di Metil N-Boc-4-Amminofenilalanina (0.91g; 3.08mmol) sempre in Ac. Acetico glaciale (15.0ml) . Dopo 24h è stata evaporata la maggior parte del solvente ed è stato purificato il prodotto di reazione mediante colonna cromatografica con eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 50:1. Dalle frazioni raccolte si è purificato ulteriormente l'azo prodotto per precipitazione da AcOEt con esano ottenendo 0.729g di solido arancio.

**RESA :** 42 %.

**IR (KBr) :**  $\nu$  3356, 1752 1735, 1688, 1520 cm<sup>-1</sup> .

**MS (ESI-TOF) :** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 585.2919 m/z ; [M-Boc+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 485.2484m/z ; [M - tBut+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub>=529.2281 m/z; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub>= 585.2832 m/z.

**<sup>1</sup>H NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  1.41 [s, 18H];  $\delta$  3.06-3.25 [m, 4H];  $\delta$  3.72 [s, 6H];  $\delta$  4.58-4.68 [m, 2H];  $\delta$  5.03 [d br, J=8.1 Hz, 2H] ;  $\delta$  7.24-7.29 [m, 4H] ;  $\delta$  7.81-7.85 [m, 4H].

**Sintesi di 4,4'-bis(metilalanin)azobenzene;[Azo(Ala)<sub>2</sub>] [12] :**

A una soluzione di 4,4'-diazendiildi(Metil N-Boc-alanina) (0.17g; 0.29mmol) in 5ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> si sono aggiunti 5ml di CF<sub>3</sub>COOH lasciando il tutto sotto agitazione per 40min a temperatura ambiente. Dopo aver evaporato la maggior parte del solvente il composto è stato liofilizzato ottenendo 0.178g di prodotto solido giallo.

**RESA :** 99 %.

**IR (KBr) :**  $\nu$  3425, 3007, 1748, 1674 cm<sup>-1</sup> .

**MS (ESI-TOF) :** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 385.1870 m/z ; [M/2+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 193.1192 m/z; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub>= 385.2035m/z.

**<sup>1</sup>H NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  1.42 [s, 18H];  $\delta$  3.20-3.13 [m, 4H];  $\delta$  3.73 [s, 6H];  $\delta$  4.59-4.69 [m, 2H];  $\delta$  5.03 [d br, J=8.2 Hz, 2H] ;  $\delta$  7.25-7.29 [m, 4H] ;  $\delta$  7.82-7.86 [m, 4H].

### 2.2.3 $\text{Tr}(\text{NH}_2)_3$ : Iniziatore “planare” a base triazinica con simmetria $\text{C}_3$

---

#### Sintesi 2,4,6-tris(3-((2-idrossietil)sulfanil)propossi)-1,3,5-triazina<sup>(36)</sup>; [Tr-OH<sub>3</sub>] [13] :

In un pallone si sono inseriti il 2-mercaptoetanololo (8.66g; 110.84mmol), la 2,4,6-tris(allilossi)-1,3,5-triazina (5.03g ; 20.18mmol) e il foto-iniziatore 2,2'-dimetossi-2-fenilacetofenone (DMPA 0.376g; 1.47mmo). Il tutto è stato posto sotto irraggiamento con lampada a 365nm per 40min sotto lenta agitazione magnetica. Dopo aver diluito la miscela di reazione con di MeOH (10.0ml) si è fatto precipitare il prodotto con abbondante Et<sub>2</sub>O (150.0ml). La fase eterea separatasi dall'olio formatosi, è stata decantata e sono stati eseguiti 2 ulteriori lavaggi con Et<sub>2</sub>O, ottenendo 8.20g di prodotto oleoso incolore.

**RESA** : 84 %.

**MS (ESI-TOF)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc.}} = 484.1604 \text{ m/z}$  ;  $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{sper}} = 506.1496 \text{ m/z}$ ;  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{sper}} = 484.1626 \text{ m/z}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  2.00-2.13 [q, 6H]; 2.31 [s br, 3H];  $\delta$  2.66-2.76 [m, 12H];  $\delta$  3.73 [t, J=6.0Hz, 6H];  $\delta$  4.49 [t, J=6.2 Hz, 6H].

#### Sintesi di Acido N-Boc-p-amminobenzoico<sup>(35)</sup>; [Boc-PABA] [14] :

In un pallone si è sciolto l'acido 4-amminobenzoico (2.04g; 14.88mmol) in H<sub>2</sub>O/1,4-diossano 1:2 (45.0ml), aggiungendo Et<sub>3</sub>N (4.0ml). A questa soluzione si è aggiunto Boc<sub>2</sub>O solido (6.70g; 30.70mmol) e si è lasciato reagire il tutto sotto agitazione magnetica per 24h. La soluzione è stata concentrata evaporando il diossano, diluita con H<sub>2</sub>O e si è aggiunto HCl 3M fino a comparsa di un precipitato bianco (7.0ml) Il solido è stato filtrato su gooch e lavato con abbondante acqua (120ml). Si è disciolto con MeOH a caldo il solido appena ottenuto e posto in frigo a cristallizzare. Il precipitato è stato quindi rifiltrato su gooch e lavato con pochi ml di MeOH freddo ottenendo 2.62gdi solido bianco.

**RESA** : 74 %.

**IR (KBr)** : 3368, 2981, 2665, 2545, 1707,1679, 1609, 1590, 1525, 1506, 1409 1233, 1157cm<sup>-1</sup>.

**MS (ESI-TOF)** : [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 238.1074 m/z ; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 238.1101 m/z; [M-tBut+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 182.0490 m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.40 [s, 9H]; δ 7.56 [d, J=8.7Hz, 2H]; δ 7.84 [d, J=8.7Hz, 2H]; δ 9.71 [s, 1H]; δ 12.58 [s, 1H].

#### **Sintesi di Tr-(N-Boc)<sub>3</sub>; [15] :**

In un pallone si sono sciolti Boc-PABA (1.74g; 7.33mmol) , Tr-OH<sub>3</sub> (0.90g; 1.86mmol) e DMAP (0.27g; 2.21mmol) in DMF anidra (15.0ml). Una volta solubilizzato il tutto, si è posto in bagno acqua/ghiaccio e si è aggiunta una soluzione di DMF anidra (5.0ml) contenente EDC·HCl (1.39g ; 7.27mmol) sotto forte agitazione. Dopo 20min si è portato a r.t. e lasciato sotto agitazione per una notte. Dopo aver rimosso il solvente al rotavapor si è ripreso con AcOEt, effettuando dei lavaggi con KHSO<sub>4</sub> 5% , NaHCO<sub>3</sub> 10% e Brine. Dopo aver anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e portato a secco la fase organica, si è purificato il prodotto mediante flash cromatografia con eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 40:1 ottenendo 0.93g di solido bianco.

**RESA** : 44 %.

**MS (ESI-TOF)**: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub>= 1141.4291m/z; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub>= 1141.4532m/z; [M+Na]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 1164.4173m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.52 [s, 9H]; δ 2.09 [p, J=6.6Hz, 2H]; δ 2.77 [t, J=7.1Hz, 2H]; δ 2.87 [t, J=6.9Hz, 2H]; δ 4.40-4.51 [m, 4H]; δ 6.73 [s br, 1H]; δ 7.43 [d, J=8.8Hz, 2H] δ 7.96 [d, J=8.8Hz, 2H].



**Sintesi di Tr(NH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> ; [16] :**

A una soluzione di il Tr-(N-Boc)<sub>3</sub> (0.40g ; 0.35mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0ml), si è aggiunto CF<sub>3</sub>COOH (5.0ml) e si è lasciato reagire sotto vigorosa agitazione per 2h. Quindi si è portato a secco al rotavapor e si è liofilizzato il prodotto ottenuto. Per avere il gruppo amminico reattivo per i successivi step, il solido ottenuto è stato ripreso con AcOEt e sono stati eseguiti due lavaggi basici con NaOH 5%(m/m) e con Brine, anidrificando la fase organica con NaSO<sub>4</sub> per poi allontanare il solvente a pressione ridotta ed ottenere 0.26g di solido giallognolo.

**RESA** : 76 %.

**MS (ESI-TOF):** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 841.2718m/z; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 841.2824m/z; [M+Na]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 863.2811m/z; [M-NH<sub>2</sub>PhCO+2H]<sup>+</sup><sub>sper.</sub> = 722.2470m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.91-2.05 [m, 2H]; δ 2.68 [t, J=7.1Hz, 2H]; δ 2.84 [t, J=6.6Hz, 2H]; δ 4.30 [t, J=6.7Hz, 2H]; δ 4.38 [t, J=6.3Hz, 2H]; δ 4.83 [s br, 1H]; δ 6.59 [d, J=8.7Hz, 2H] δ 7.64 [d, J=8.7Hz, 2H].

## 2.2.4 Tr(Azo)<sub>3</sub> : Inziatore “planare” fotosensibile a base triazinica con simmetria C<sub>3</sub>

---

### Sintesi di N-Boc-4-nitrobenzilammina<sup>(37)</sup>; [17] :

A una soluzione di 4-nitrobenzilammina (2.00g; 10.61mmol) e Et<sub>3</sub>N (2.0ml) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45.0ml), si è aggiunto Boc<sub>2</sub>O solido (3.50g; 16.04mmol) raffreddando in un bagno acqua/ghiaccio. Dopo un'ora si è aggiunto dell'altro Boc<sub>2</sub>O (1.10g; 5.04mmol), e si è lasciata la miscela sotto agitazione magnetica per tutta la notte. Si è quindi diluito con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e si sono operati dei lavaggi acidi con KHSO<sub>4</sub> e con Brine per eliminare la Et<sub>3</sub>N e i sottoprodotti di reazione. Dopo anidificazione con MgSO<sub>4</sub> si è portato a secco e il residuo è stato precipitato da CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con PE, ottenendo 1.80gdi prodotto bianco.

**RESA** : 67 %.

**IR (KBr)** : 3325, 2984, 2935, 2914, 1688, 1520, 1165 cm<sup>-1</sup> .

**MS (ESI-TOF)**: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 253.1183m/z; [M - tBut+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 197.0652m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.45 [s, 9H]; δ [d, J=6.2Hz, 2H]; δ 4.97 [s br, 1H]; δ 7.41-7.46 [m, 2H]; δ 8.15-8.21 [m, 2H].

### Sintesi di Acido 4-[(4-(N-Boc-amminometil)fenil)diazenil]benzoico;[Boc-Azo-COOH] [18]:

A una soluzione di N-Boc-4-nitrobenzilammina (1.01g ; 4.01mmol) e NH<sub>4</sub>Cl (0.69g; 12.94mmol) in EtOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (25.0 ml), si è aggiunto Zn in polvere (0.54g ; 8.26 mmol) pre-attivato mediante trattamento in soluzione di HCl 0.1 M per 10min. Si è lasciato reagire sotto agitazione magnetica per 1h , in seguito è stato aggiunto dell'altro Zn in polvere ( 0.40g ; 6.12mmol). Dopo un'altra ora di agitazione a r.t. si è filtrato su celite e il filtrato è stato versato in un becher contenente una soluzione di FeCl<sub>3</sub> in EtOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (35.0ml) mantenuta a 0°C in bagno acqua/ghiaccio. Dopo 40min si è diluito con brine, estratto con AcOEt, anidificato la fase organica con

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, portata a secco e purificato il prodotto mediante flash cromatografia con eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:1, ottenendo 0.88g di N-Boc-4-nitrosobenzilammina (solido verde). Il nitroso composto è stato disciolto in AcOH glaciale (10.0ml), e a questa soluzione ne è stata aggiunta una seconda contenente l'Acido-4-amminobenzoico in AcOH glaciale (5.0ml). Dopo 48h si è ridotto il volume e si è diluito con AcOEt per effettuare dei lavaggi acquosi con NaHCO<sub>3</sub> e successivamente con KHSO<sub>4</sub>. Dopo aver anidrificato l'AcOEt con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> si è purificato il prodotto contenuto mediante flash cromatografia con miscela eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt aumentando la polarità del solvente (9:1 iniziale, 1:1 finale). Portate a secco le frazioni di interesse si è effettuata una precipitazione da AcOEt con Et<sub>2</sub>O, ottenendo ulteriori 0.37g di azo composto che si presenta come un solido arancione acceso.

**RESA** : 28 %.

**IR (KBr)** : 3343, 2980, 1682, 1507, 1426, 1168 cm<sup>-1</sup>.

**MS (ESI-TOF)**: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub> = 356.1605m/z; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub> = 356.1691 m/z.

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : δ 1.39 [s, 9H]; δ 3.28[s, 1H]; δ 4.24 [d J=6.2Hz, 2H]; δ 7.45-7.50 [m, 2H]; δ 7.89-7.98 [m, 4H]; δ 8.13-8.17 [m, 2H].

#### **Sintesi di Tr(Azo-N-Boc)<sub>3</sub> ; [19] :**

In un pallone raffreddato in bagno acqua/ghiaccio e sotto flusso di N<sub>2</sub> si sono sciolti l' Azo composto **18** (0.32g ; 0.91mmol) e DMAP (36mg; 0.29mmol) in DMF anidra (4.0ml). A questa è stata aggiunta una prima soluzione di Tr-OH<sub>3</sub> (composto [13]) (0.12g; 0.25mmol) in DMF anidra (2.0ml), ed infine una seconda soluzione sempre in DMF anidra (4.0ml) di EDC·HCl (0.19g; 0.97mmol). Si è lasciato il tutto a reagire per 48h a r.t. ed atmosfera inerte, ottenendo una soluzione rosso acceso. Si è quindi ridotto il volume al rotavapor, si sono effettuati dei lavaggi acidi con KHSO<sub>4</sub> 5% ed estratto il prodotto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Dopo anidificazione con MgSO<sub>4</sub> si è ridotto il volume e si è operata una precipitazione con PE, seguita da purificazione mediante

flash cromatografia con eluente a gradiente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (60:1 iniziale; 40:1 finale)ottenendo 0.27g di prodotto solido arancione.

**RESA** : 70 %.

**IR (KBr)** : 3335, 2975, 1716, 1684, 1513, 1167 cm<sup>-1</sup> .

**MS (ESI-TOF)**: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub>= 1495.5889 m/z; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub>= 1495.6822 m/z .

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.48 [s, 9H]; δ 2.01-2.20 [m, 2H]; δ 2.78 [t, J =7.1Hz, 2H]; δ 2.90 [t, J=6.89Hz, 2H];δ 4.39 [s, 2H]; δ 4.46-4.53 [m, 4H]; δ 4.95 [s br, 1H]; δ 7.41-7.45 [m, 2H]; δ 7.89-7.85 [m, 4H]; δ 8.15-8.19 [m, 2H].

#### **Sintesi di Tr(AZO)<sub>3</sub> ; [20] :**

Si è sciolto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0ml) il composto **19** (61mg; 0.041mmol) e quindi si è aggiunto l'acido trifluoroacetico (2.0ml). Dopo 2h sotto agitazione magnetica a r.t. si è allontanato il solvente al rotavapor, riprendendo più volte il solido con CH<sub>3</sub>CN. Dopo aver liofilizzato il composto si ottengono 47mg di prodotto solido dal color arancio.

**RESA** : 96 %.

**IR (KBr)** : 3423, 2955, 1715, 1561, 1271 cm<sup>-1</sup> .

**MS (ESI-TOF)**: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc.</sub>= 1195.4316; [M+H]<sup>+</sup><sub>sper</sub>= 1195.5364 m/z .

**<sup>1</sup>H NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.90-2.00 [m, 2H]; δ 2.70 [t, J =7.1Hz, 2H]; δ 2.92 [t, J=6.3Hz, 2H];δ 3.38 [s br, 2H]; ];δ 4.16 [s, 2H]; δ 4.33-4.46 [m, 4H]; δ 7.68-7.72 [m, 2H]; δ 7.97-8.18 [m, 4H]; δ 8.14-8.18 [m, 2H].

## 2.3 SINTESI DI POLIMERI A BASE DI $\gamma$ -Benzil-L-glutammato

---

### Sintesi di N-Carbossianidride del $\gamma$ -Benzil-L-glutammato; [BLG-NCA]; [21]:

In pallone a tre colli si è sospeso il  $\gamma$ -benzil-L-glutammato (5.10g; 21.50mmol) in AcOEt (70.0 ml), si è aggiunto  $\alpha$ -pinene (6.79g; 49.84mmol) portando poi la miscela a riflusso. A questa miscela è stata aggiunta con imbuto gocciolatore una soluzione di trifosgene (4.42g; 14.89mmol) sempre disciolto in AcOEt (28.0ml). Si è mantenuto sotto vigorosa agitazione e a riflusso per 4h osservando la graduale solubilizzazione dell'amminoacido di partenza. La soluzione è stata ridotta di volume (almeno 2/3) ed è stato precipitato il prodotto mediante aggiunta di PE. Per purificare il prodotto si sono eseguite ulteriori ricristallizzazioni da AcOEt/PE ottenendo infine 3.80g di solido bianco (conservato a -5°C).

**RESA** : 97 %.

**IR (KBr)** :  $\nu$  3225, 2934, 1866, 1842, 1779, 1703  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H NMR}$**  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  2.02-2.36 [m, 2H,  $\beta$ -CH] ;  $\delta$  2.59 [t, J=6.8Hz, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>];  $\delta$  4.37 [t, 1H,  $\alpha$ -CH];  $\delta$  5.14 [s, 2H, CH<sub>2</sub>O];  $\delta$  6.48 [s br, 1H, NH];  $\delta$  7.36 [s, 5H, ArH].

### Sintesi del PBLG con iniziatore [12] a base amminoacidica fotosensibile "lineare" a simmetria C<sub>2</sub>; [Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG]; [22]:

A una soluzione di monomero BLG-NCA (1.10g ; 4.18mmol) in 1,4-diossano (2.0ml) posta sotto flusso di N<sub>2</sub> e sotto ghiaccio, si è aggiunta rapidamente con siringa una soluzione di Azo-iniziatore [12] lineare (5.0mg; 0.013mmol) in 1,4-diossano/DMF 2:1 (0.6 ml). Si è lasciato il tutto a reagire a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 24h. Il polimero è stato fatto precipitare con MeOH e recuperato tramite centrifugazione. Il solido è stato più volte lavato con MeOH e infine con Et<sub>2</sub>O ed è stato posto in essiccatore, ottenendo 0.68g di un solido giallo.

**RESA** : 62 %

**SEC PM**: 86563 (dpi 1.16).

**IR (KBr)** :  $\nu$  3296, 3003, 2951, 1735, 1653, 1545, 1162, 966, 696  $\text{cm}^{-1}$ .

**Sintesi del PBLG con iniziatore [16] “planare” a simmetria  $C_3$ ; [Tr-PBLG]; [23]:**

Ad una soluzione di BLG-NCA (1.01g ; 3.85mmol) in 1,4-diossano (2.5ml) posta sotto flusso di  $\text{N}_2$  e sotto ghiaccio, si è aggiunta rapidamente con siringa una soluzione di iniziatore planare [16]  $\text{Tr}(\text{NH}_2)_3$  (10mg; 0.012mmol) in 1,4-diossano (1.0 ml). Dopo 20min si è tolto il bagno a ghiaccio e si è lasciato il tutto a reagire a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 24h. Dopo aver diluito con 1,4-diossano (3.0ml) si è fatto precipitare il polimero con MeOH, e lo si è filtrato su gooch per poi lavarlo con piccole aliquote di MeOH freddo e  $\text{Et}_2\text{O}$ , ottenendo 0.76g di polimero bianco.

**RESA** : 68 %.

**SEC PM**: (44.762 dpi 1.47).

**IR (KBr)** :  $\nu$  3298, 3034, 2953, 1734, 1651, 1546, 1452, 1163  $\text{cm}^{-1}$ .

**Sintesi del PBLG con iniziatore [20] fotosensibile “planare” a simmetria  $C_3$ ; [Tr(AZO)<sub>3</sub>-PBLG]; [24]:**

A una soluzione di monomero BLG-NCA (1.002g ; 3.81 mmol) in 1,4-diossano (2.3ml) posta sotto flusso di  $\text{N}_2$  e sotto ghiaccio, si è aggiunta rapidamente con siringa una soluzione di Azo-iniziatore planare [20]  $\text{Tr}(\text{AZO})_3$  (0.012g; 0.010mmol) in DMF (1.0 ml). Dopo 20min si è tolto il bagno a ghiaccio e si è lasciato il tutto a reagire a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 24h. Dopo aver diluito con 1,4-diossano (3.0ml) si è fatto precipitare il polimero con abbondante MeOH, e lo si è centrifugato. Il solido è stato lavato con MeOH e  $\text{Et}_2\text{O}$ , ottenendo 0.65g di polimero giallo pallido.

**RESA** : 64 %.

**SEC PM**: 46.812 (dpi 1.56).

**IR (KBr)** :  $\nu$  3300, 3033, 2954, 1735, 1652, 1547, 1452, 1162  $\text{cm}^{-1}$ .

**Sintesi del PBLG con iniziatore [20] fotosensibile "planare" a simmetria  $C_3$ ; [Tr(AZO)<sub>3</sub>- PBLG]; [25]:**

Per ottenere pesi molecolari maggiori è stata modificata la sintesi del polimero [24], variando alcuni parametri di reazione. A una soluzione di monomero BLG-NCA (0.98g ; 3.72mmol) in DMF anidra (2.0ml) posta sotto flusso di  $N_2$  e sotto ghiaccio, si è aggiunta rapidamente con siringa una soluzione di Azo-iniziatore planare [20] Tr(AZO)<sub>3</sub> (4.4mg; 0.0037mmol) in DMF (1.5 ml). Dopo 30min si è tolto il bagno a ghiaccio e si è lasciato il tutto a reagire a 30°C sotto agitazione magnetica per 6 giorni . Dopo aver diluito con DMF (5.0ml) si è fatto precipitare il polimero con abbondante MeOH, e lo si è recuperato tramite centrifugazione. Al termine si sono effettuati dei lavaggi con MeOH e Et<sub>2</sub>O, ottenendo 0.73g di polimero giallo.

**RESA** : 74 %.

**SEC PM**: 186.568 (dpi 1.66).

**IR (KBr)** :  $\nu$  3300, 3033, 2954, 1735, 1652, 1547, 1452, 1162  $\text{cm}^{-1}$ .





## 3. DISCUSSIONE delle SINTESI

### 3.1 Octopus System

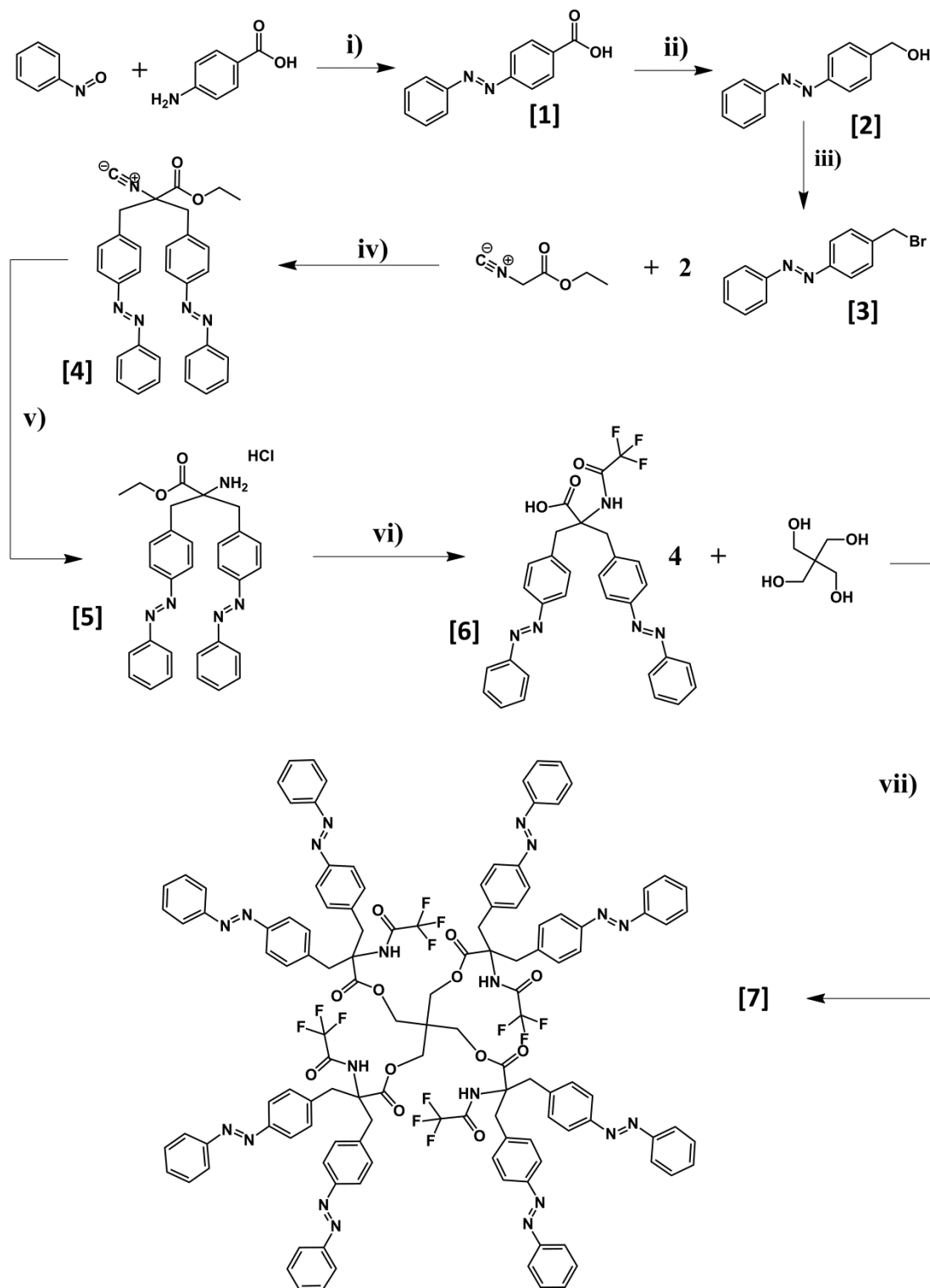
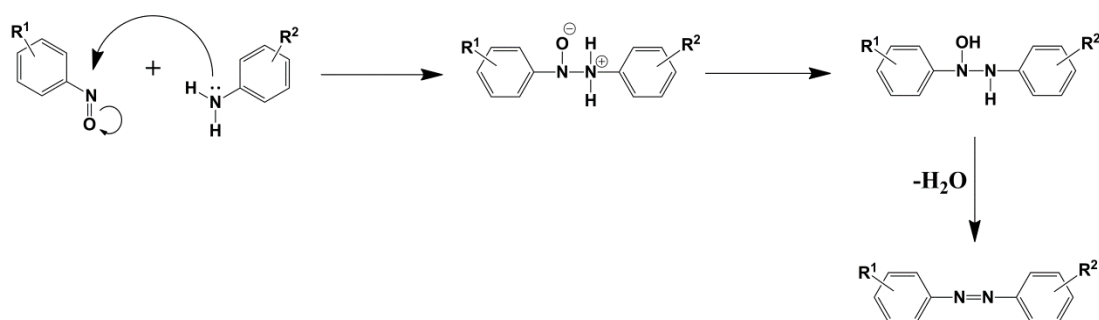


Figura 3.1.1: Strategia sintetica seguita per il prodotto [7].

Per la sintesi del prodotto [7] si è seguito schema sintetico riportato in *figura 3.1.1*. Il primo stadio prevede la sintesi **i)** dell'acido 4-(fenilazo)benzoico mediante reazione di Mills in acido acetico a partire da nitrosobenzene e PABA (acido *p*-amminobenzoico). La condensazione di Mills è stata utilizzata come step sintetico per tutti gli azo-composti di questo lavoro di tesi, e in generale segue lo schema di reazione in *figura 3.1.2*<sup>(27)</sup>:

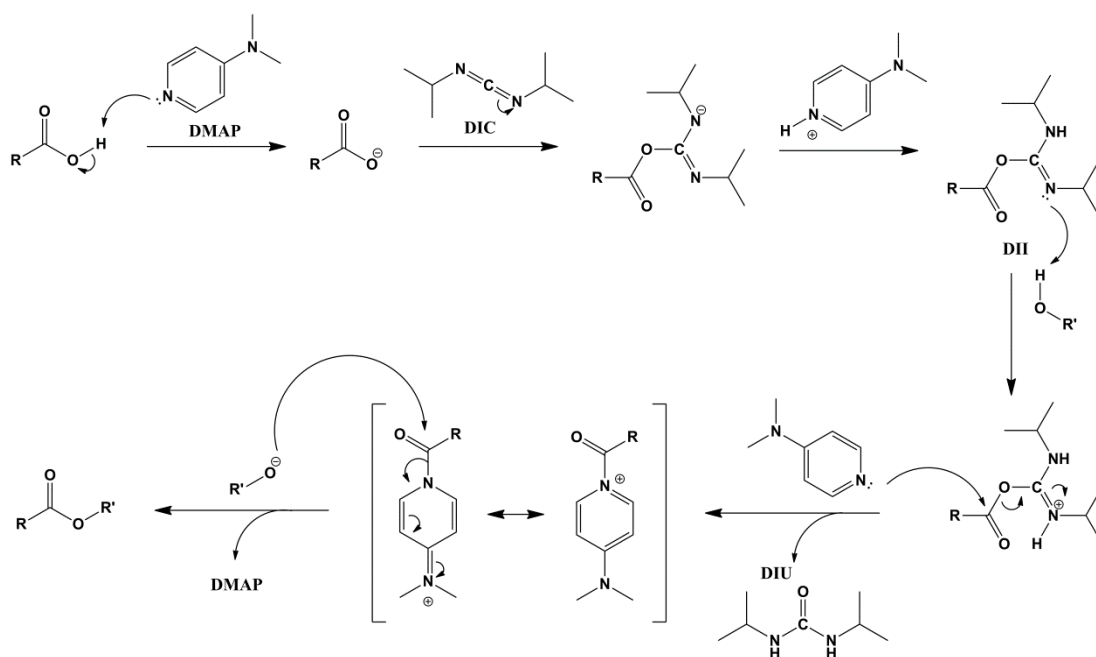


**Figura 3.1.2:** Meccanismo reazione di Mills <sup>(27)</sup>

Seguono poi le reazioni di trasformazione del gruppo carbossilico, dapprima la riduzione ad alcool **ii)** mediante LiAlH<sub>4</sub> in THF anidro e atmosfera inerte, **iii)** seguita dalla sintesi del bromuro a partire dall'alcool [2] mediante reazione con trifenilfosfina e NBS (N-Bromosuccinimide) in THF e atmosfera inerte. Il composto [3] è stato utilizzato in rapporto 2:1 per la reazione **iv)** di di-alchilazione dell'isocianoacetato di etile in presenza di tetrabutylammonio bisolfato e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in acetonitrile anidro per ottenere il precursore [4] dell'amminoacido etil-*bis*(azobenzen)glicina [5] ottenuto come sale cloridrato, mediante idrolisi del gruppo isociano **v)** in ambiente acido (HCl). Il successivo passaggio è **vi)** l'idrolisi dell'estere etilico in KOH seguita dalla protezione all' $\alpha$  NH con un gruppo TFA (trifluoroacetile), mediante trattamento con soluzione 1:1 CF<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> per ottenere il prodotto [6]. A sua volta il TFAc-*p*azoDbg-OH è stato utilizzato nell'esterificazione **vii)** in rapporto 4:1 con il pentaeritriolo, utilizzando DIC per attivare il carbossile e DMAP come catalizzatore. Si ricorda che per tutti gli intermedi [1], [2], [3] e [4] si è resa necessaria una purificazione mediante flash cromatografia.

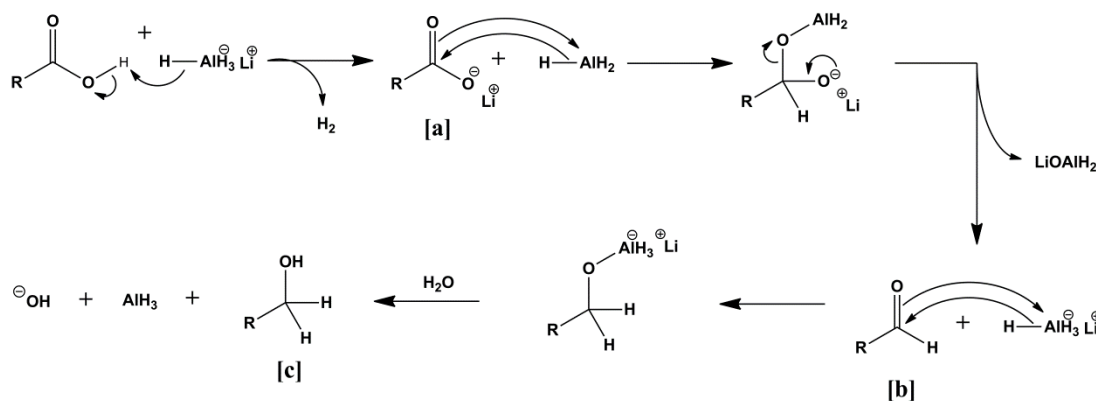
L'ultima reazione, ovvero la tetra esterificazione, nel suo insieme segue lo schema in *figura 3.1.3*<sup>(34)</sup>, in cui la 4-dimetilamminopiridina (DMAP) svolge un duplice ruolo:

- facilita l'attacco del carbossilato alla N,N'-diisopropilcarbodiimmide (DIC) per dare l'isourea (DII);
- funge da agente di trasferimento del gruppo acile attivo, facilmente attaccabile dall'alcool desiderato per dare l'estere prodotto.



**Figura 3.1.3:** Meccanismo esterificazione con DIC e DMAP (0.2eq)<sup>(34)</sup>.

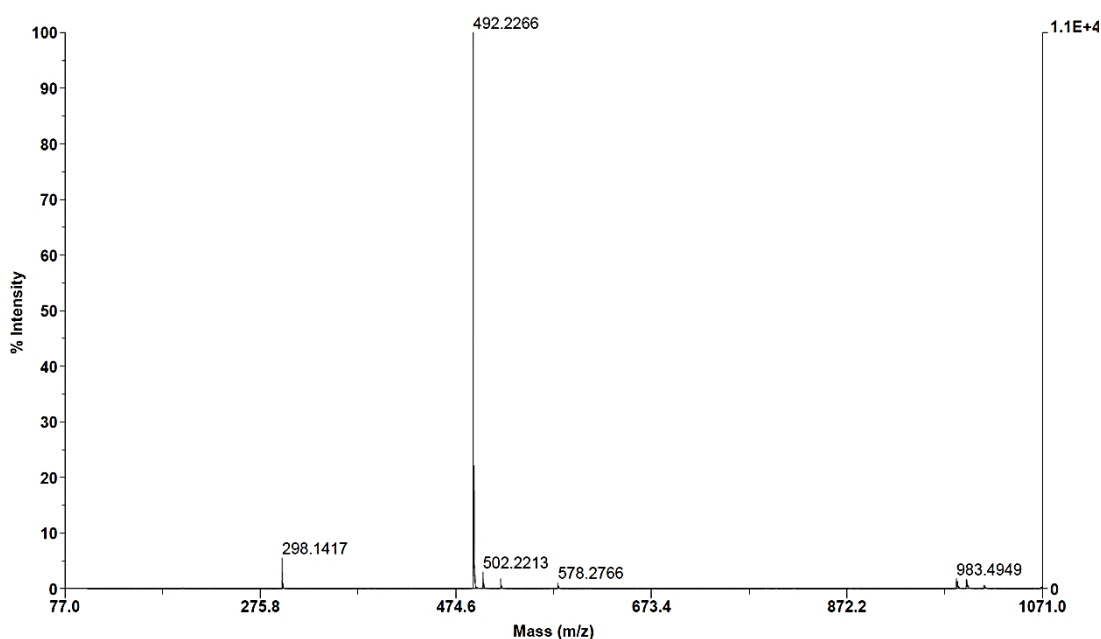
Tuttavia, il passaggio critico della sintesi, data la bassa resa ( $\approx 30\%$ ), è la riduzione **ii**) da Acido carbossilico [1] ad alcool [2] con  $\text{LiAlH}_4$ , di cui è riportato lo schema in *figura 3.1.4*:



**Figura 3.1.4:** Meccanismo di riduzione da acido carbossilico ad alcool con  $\text{LiAlH}_4$ .

La bassa resa in alcool è reputabile ad una scarsa solubilità dei sali intermedi che si formano durante la riduzione, e in particolare a quelli antecedenti la formazione dell'aldeide [b]. Una possibile soluzione potrebbe essere stata la riduzione di un'estere-derivato dell'acido carbossilico [1], in quanto la formazione dell'aldeide non includerebbe il passaggio per il sale di Litio [a], risparmiando in questo modo anche un'equivalente di riducente. C'è da considerare una probabile perdita di prodotto [c] nelle fasi di separazione dai sali di alluminio, sottoprodotti che precipitano inglobando parte dell'alcool di interesse.

In ogni caso, al termine delle reazioni di modifica del gruppo carbossilico (ii e iii) e dopo la successiva di-alkilazione dell'isocianoacetato poi idrolizzato, si ottiene il *bis*[p-(fenilazo)benzil]glicinato di etile · HCl [5] con una discreta purezza. Lo spettro di massa riportato in *figura 3.1.5* mostra il picco relativo al prodotto  $[M+H]^+$  a 492.2266 m/z e il picco del dimero  $[2M+H]^+$  a 983.4949 m/z.



**Figura 3.1.5:** Spettro di massa (ESI-TOF) dell'intermedio [5] che evidenzia la massa del prodotto a 492.2266m/z e quella del rispettivo dimero a 983.4949m/z.

### 3.2 Azo(Ala)<sub>2</sub>: Iniziatore a base aminoacidica fotosensibile “lineare” a simmetria C<sub>2</sub>.

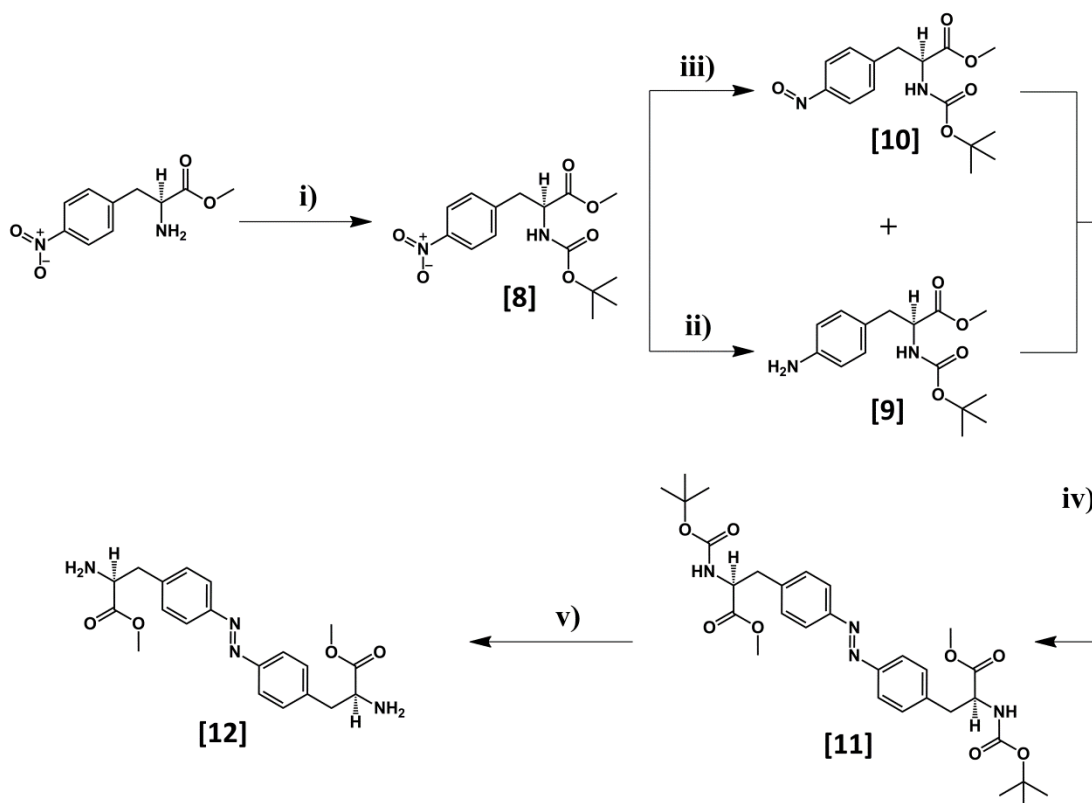
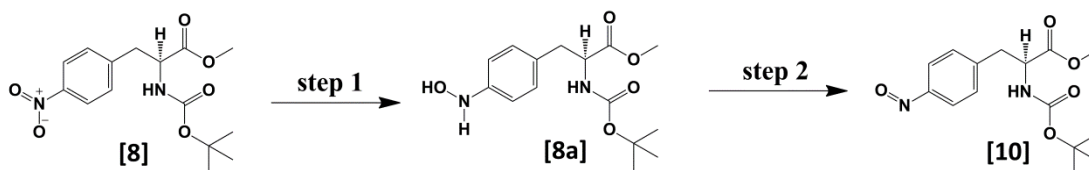


Figura 3.2.1: Strategia sintetica seguita per il prodotto [12]

Per la sintesi del prodotto [12] si è seguita la strategia sintetica riportata in *figura 3.2.1*. Questa comprende una prima protezione del gruppo amminico in  $\alpha$  libero della metil-L-4-nitrofenilalanina mediante formazione di un uretano con il gruppo protettore *terz*butossicarbonile (Boc) che ne diminuisce la reattività. La reazione **i)**<sup>(25)</sup> procede con alta resa ( $\approx 97\%$ ) mediante reazione con di-*terz*-butil dicarbonato ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) in presenza di una base come la trietilammina che attiva i gruppi amminici mantenendoli deprotonati. I prodotti di scarto, vengono eliminati con semplici lavaggi acquosi acidi e neutri. Il successivi due passaggi prevedono la trasformazione del nitro-gruppo per ottenere rispettivamente un gruppo amminico e nitroso. Nel primo caso **ii)**<sup>(25)</sup> si sfrutta la riduzione catalitica con palladio depositato su carbone attivo in presenza di  $\text{H}_2$ . La reazione ha buona resa ( $\approx 96\%$ ), e prevede uno step di purificazione in colonna di silice. Da non sottovalutare è la separazione dalla soluzione del catalizzatore, in quanto viene effettuata filtrandolo su celite in

presenza di metanolo, il che risalta il carattere piroforico del carbone attivo. Molto più problematica è la parallela riduzione del nitro-gruppo a nitroso **iii**)<sup>(25)</sup>. Infatti si compone di più step sintetici da effettuarsi in rapida successione, data l'elevata instabilità degli intermedi, come del prodotto finale. Operativamente si effettua una prima riduzione del gruppo nitro ad idrossilammina con Zn in polvere (pre-attivato con trattamento con HCl 0.1M)<sup>(26)</sup> in presenza di NH<sub>4</sub>Cl, seguita da una ossidazione controllata con FeCl<sub>3</sub> che porta al nitroso composto. A questo segue l'immediata reazione di Mills **iv**)<sup>(25)</sup> in acido acetico per la formazione dell'azo composto [11] (vedi *figura 3.1.2*<sup>(27)</sup>). Questa evolve con resa non eccellente (≈42%), dovuta in larga parte alla instabilità del nitroso composto, che implica la formazione di sottoprodotti<sup>(25)(28)</sup>. L'ultimo step **v**)<sup>(25)</sup> prevede la rimozione del gruppo Boc mediante sblocco in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CF<sub>3</sub>COOH (1:1), per avere il gruppo amminico libero necessario per utilizzare la molecola [12] come iniziatore per la successiva polimerizzazione.

Lo step critico della strategia sintetica è la sintesi del nitroso composto [10], che avviene mediante una reazione two-step, one-pot <sup>(25)</sup>. Questo prevede una prima riduzione con Zn in polvere che forma l'idrossilammina [8a] <sup>(1)</sup>, poi riossidata con FeCl<sub>3</sub> a nitroso [10]<sup>(31)</sup> (*figura 3.2.2*).



*Figura 3.2.2: Schema sintesi [10] <sup>(25)(30)(31)</sup>*

Questi passaggi, a causa dell'elevata instabilità del nitroso composto [10] e ancor più dell'intermedio [8a], rendono impossibile sia il loro stoccaggio (anche a basse temperature) sia la relativa caratterizzazione completa ed esauriente. Per tanto, tutta la sintesi dal passaggio **iii**) al **iv**) con relative estrazioni e purificazioni, devono necessariamente essere eseguite nell'arco della stessa giornata. Di fatto non è possibile isolare mediante colonna di silice<sup>(25)</sup> l'idrossilammina intermedia [8a], mentre il nitroso composto lo si separa solo in maniera grossolana in colonna cromatografica, in quanto decompone in maniera vistosa anche durante l'eluizione

portando ad una separazione insoddisfacente. Inoltre gli  $R_f$  per i composti [8a] [9] e [10] sono molto simili, quindi per avere buone separazioni sono necessarie colonne cromatografiche a percorso lungo, aumentando i tempi necessari alla purificazione. In particolare è assolutamente necessaria la purificazione del nitroso-composto [10] dall'idrossilammina non convertita [8a] prima di procedere con il coupling di Mills. Questo perché nelle condizioni di reazione si formerebbero degli azoxy derivati<sup>(32)</sup>, sottoprodotti ovviamente non graditi (Figura 3.2.3).

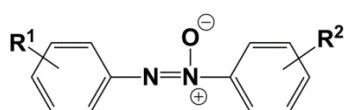


Figura 3.2.3: Esempio di sottoprodotto azoxy<sup>(32)</sup>

Viene riportato a titolo di esempio lo spettro di una frazione impura di azo composto [11] in cui si evidenziano oltre agli intensi segnali aromatici del prodotto desiderato (compresi tra 7.2-7.8ppm) anche gli analoghi segnali aromatici dei sottoprodotti azoxy (8.1-8.3 ppm) (vedi figura 3.2.4).

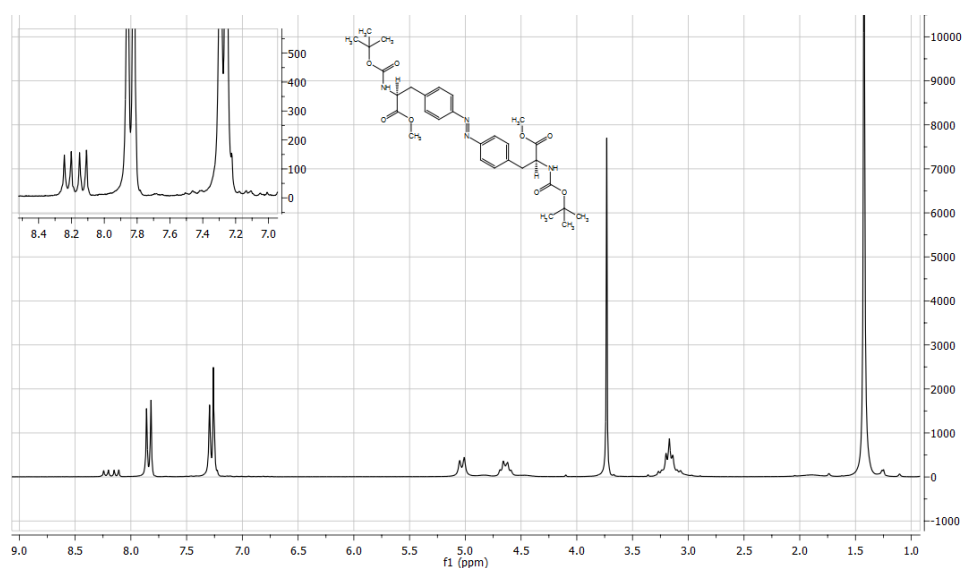
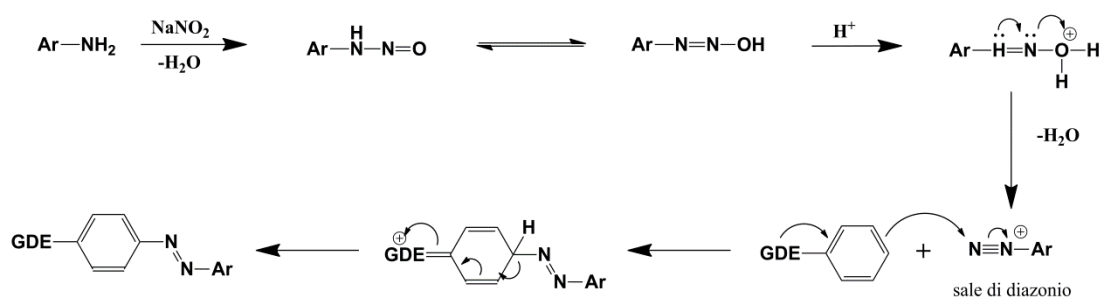


Figura 3.2.4: Spettro  $^1H$  NMR in  $CDCl_3$  di una frazione impura da azoxy derivati, ottenuta durante la purificazione in colonna di silice dell'azo composto [11].

Il secondo step di ossidazione con  $FeCl_3$  procede velocemente e senza coinvolgere in problemi legati alla eccessiva ri-ossidazione a nitro composto [8] di partenza. Il primo step riduttivo con Zn cela per contro molte problematiche. Parametri di fondamentale importanza (oltre la temperatura) sono i tempi di contatto Zn/nitro-composto, la qualità dello Zn in polvere (per questo è stato attivato, eliminando

l'ossido superficiale mediante trattamento con HCl) e il tipo di solvente. Nelle prime prove di reazioni infatti, a causa dello Zn passivato, la reazione non procedeva con buone rese già nel primo step di riduzione, compromettendo la resa dell'intera sintesi. Pur attivando lo Zn la resa in nitroso composto continuava ad essere bassa (<10%) e ciò si è constatato essere dovuto sia al solvente di reazione che ai tempi di contatto Zn/nitro-composto [8]. Infatti sostituendo il 2-metossietanolo <sup>(25)(29)</sup> usato inizialmente a favore di una miscela EtOH/H<sub>2</sub>O 5:1 <sup>(25)(30)</sup> la resa complessiva della reazione **iv)** sale oltre il 40%. Ovviamente tale risultato è stato raggiunto ottimizzando il più possibile anche i tempi di reazione mediante accurato monitoraggio con TLC e velocizzando gli step di purificazione necessari elencati prima. In particolare si è riscontrato che elevati tempi di contatto Zn/nitro-composto aumentano la conversione, ma allo stesso tempo promuovono la reazione secondaria di ulteriore riduzione dell'idrossilammina ad ammina [9], visibile in TLC, non più ossidabile dal Fe(III).

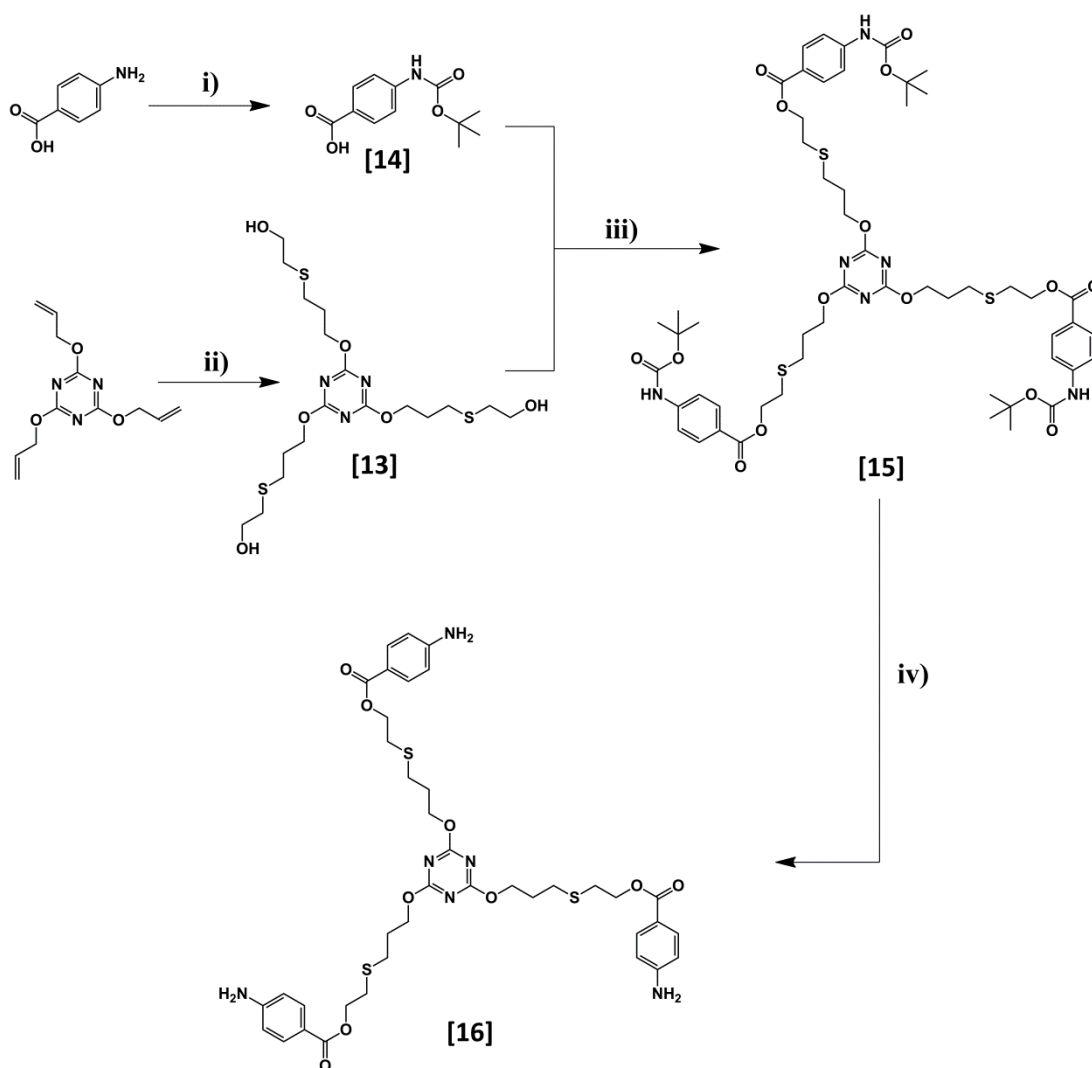


**Figura 3.2.4:** Reazione di diazotazione; Formazione del sale di diazonio seguita da sostituzione elettrofila all'anello aromatico attivato da un gruppo elettron-donatore (EDG).

In alternativa alla produzione del nitroso composto da far condensare con l'anilina derivato, si poteva ricorrere alla reazione che sfrutta la formazione del sale di diazonio dell'ammina derivato [9], per poi effettuare il coupling con un opportuno derivato elettron-ricco della fenilalanina (*figura 3.2.4*). In questo caso però le tipiche condizioni acide<sup>(33)</sup> di reazione per ottenere il sale di diazonio avrebbero rischiato di staccare la protezione sul gruppo amminico. Inoltre in questo caso il prodotto ottenuto non sarebbe stato lo stesso, in quanto funzionalizzato in uno dei due anelli aromatici.



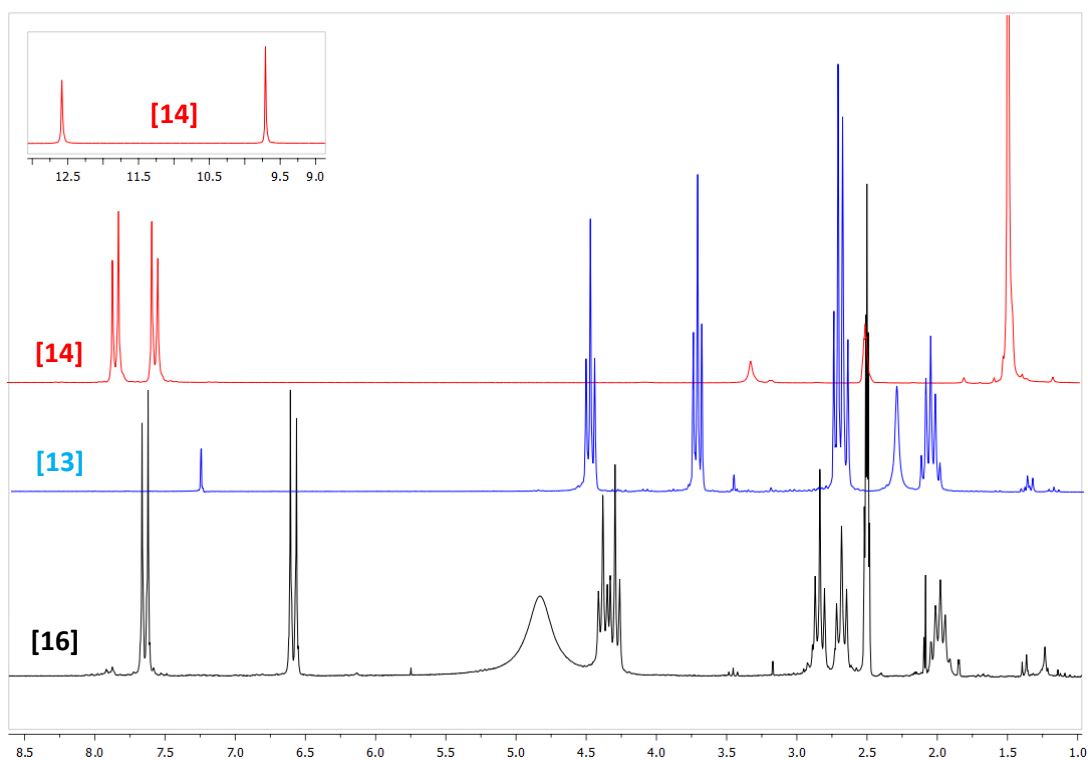
### 3.3 $\text{Tr}(\text{NH}_2)_3$ : Inziatore “planare” a base triazinica con simmetria $\text{C}_3$



**Figura 3.3.1:** Strategia sintetica seguita per il prodotto [16].

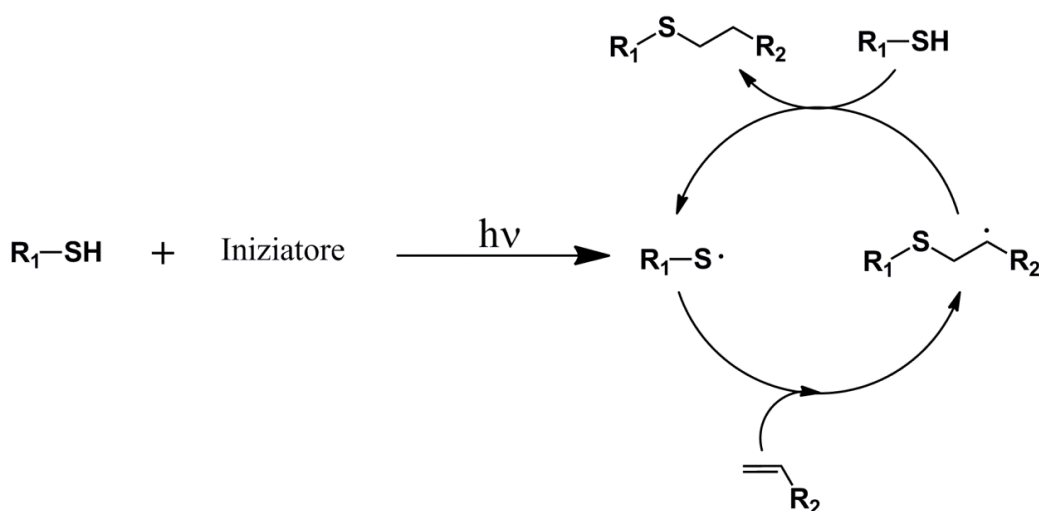
Per la sintesi della piattaforma [16] si è seguita la strategia in *figura 3.3.1*, in cui la prima parte consiste in una sintesi convergente. La reazione **i)** è una semplice protezione del gruppo amminico del PABA, mediante l’anidride  $\text{Boc}_2\text{O}$  in miscela  $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-diossano}$  1:2, che porta al composto [14]<sup>(35)</sup> con buone rese ( $\approx 74\%$ ). La **ii)** è una tipica reazione della classe delle “click chemistry”, detta TioI-ene, in quanto prevede l’addizione del 2-mercaptoetanolio al tris-alchene 2,4,6-tris(allilossi)-1,3,5-triazina, in presenza del foto-inziatore 2,2’-dimetossi-2-fenilacetofenone (DMPA)<sup>(36)</sup> (vedi *figura 3.3.2*). La reazione viene promossa irraggiando con lampada a 365nm

per 40 min la miscela di reazione dove il tioglicole funge anche da solvente. Il prodotto di reazione viene purificato semplicemente mediante precipitazione con Et<sub>2</sub>O con alta resa (84%) in [13] (alte rese, assenza di sottoprodotti e velocità di reazione sono i punti cardine della click chemistry). I composti [13] e [14] sono stati quindi condensati in rapporto 1:3 nella reazione **iii**), mediante utilizzo di 1 eq. di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDC) in presenza di DMAP, per dare il composto [15]. A questo punto sono stati sbloccati i gruppi amminici protetti col gruppo Boc mediante **iv**) trattamento con soluzione 1:1 di CF<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. In *figura 3.3.2* sono riportati gli spettri <sup>1</sup>H-NMR per i composti [14] (rosso), [13](blu) e [16](nero). Nello spettro del composto finale si osservano i segnali aromatici C<sub>3</sub> dovuti all’N-Boc-PABA e la contemporanea scomparsa del protone acido a 12.5ppm dell’acido [14] e del protone alcolico [13] a 2.2ppm in seguito alla loro condensazione nel passaggio **iii**). Inoltre nel prodotto finale [16] non è presente l’intenso segnale a 1.4ppm dovuto al Boc, rimosso nel passaggio **iv**), mentre è ben visibile il segnale allargato della ammina libera, che risuona ai tipici valori di chemical shift delle ammine aniliniche (4.8ppm).



**Figura 3.3.2:** Spettri <sup>1</sup>H-NMR in DMSO per i composti [14](rosso) e [16](nero) e in CDCl<sub>3</sub> per [13](blu).

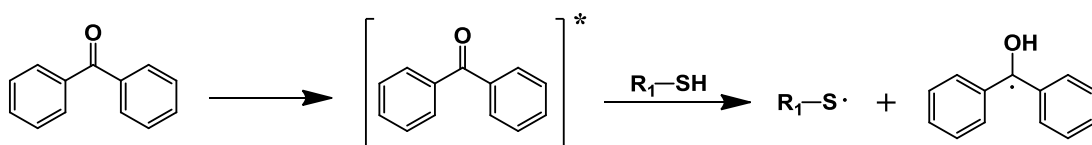
Uno dei passaggi più importanti dell'intera sintesi è sicuramente la reazione "tio-ene". Questa fa parte della famiglia di reazioni della "click chemistry", termine introdotto nel 2001 da K. B. Sharpless, per indicare un tipo di chimica che mira alla sintesi di molecole organiche, legando piccole unità molecolari attraverso legami carbonio-eteroatomo<sup>(37)</sup>. Tali reazioni devono essere: modulabili, stereospecifiche (non necessariamente enantioselettive), procedere con alte rese con sottoprodotti inoffensivi ed eliminabili senza metodi cromatografici, presentare condizioni blande di reazione possibilmente prive di solventi ed avere prodotti facilmente isolabili. Altro tipico esempio di "click chemistry" è la reazione di Huisgen catalizzata da Cu(I)(cicloaddizione 1,3-dipolare tra una azide e un alchimo terminale). Come già detto la tio-ene consiste nella addizione di un tiolo ad un alchene attivata per via fotochimica e segue lo schema in *figura 3.3.3*:



**Figura 3.3.3:** Schema reazione Tio-ene ii).

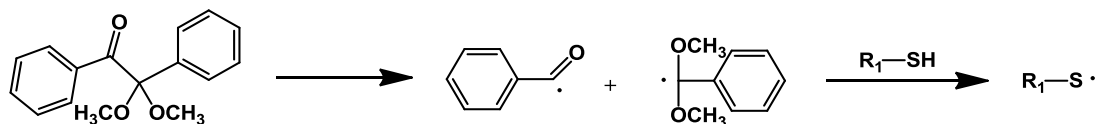
I fotoiniziatori utilizzabili nella reazione possono essere di due tipi:

- Tipo I: l'assorbimento di energia luminosa genera uno stato eccitato sufficientemente reattivo da strappare un atomo di idrogeno al tiolo. Un esempio classico è il benzofenone (*figura 3.3.4*):



**Figura 3.3.4:** Generazione di un radicale  $RS\cdot$  nel caso di un fotoiniziatore di tipo I.

- Tipo II : a seguito dell'assorbimento di un fotone si ha scissione omolitica della molecola che genera due radicali. Questi strappano un protone al tiolo di partenza, generando la specie radicalica che dà inizio alla addizione al doppio legame. Nel nostro caso è stato usato il DMPA (2,2-dimetossi-2-fenilacetofenone) fotoiniziatore di Tipo II (figura 3.3.5):



**Figura 3.3.5:** Generazione di un radicale RS· nel caso di un fotoiniziatore di tipo II.

### 3.4 Tr(Azo)<sub>3</sub>: Iniziatore “planare” fotosensibile a base triazinica con simmetria C<sub>3</sub>

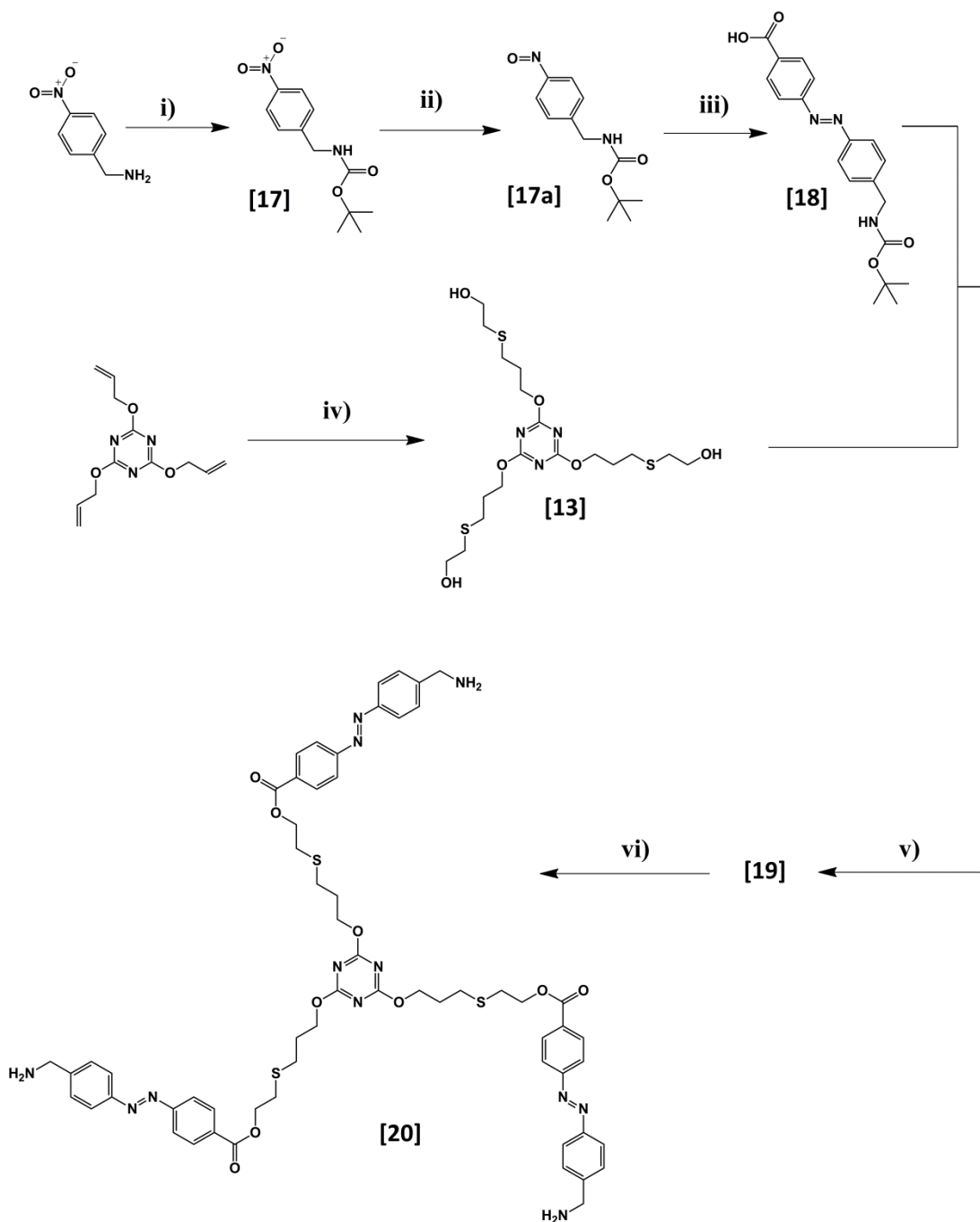
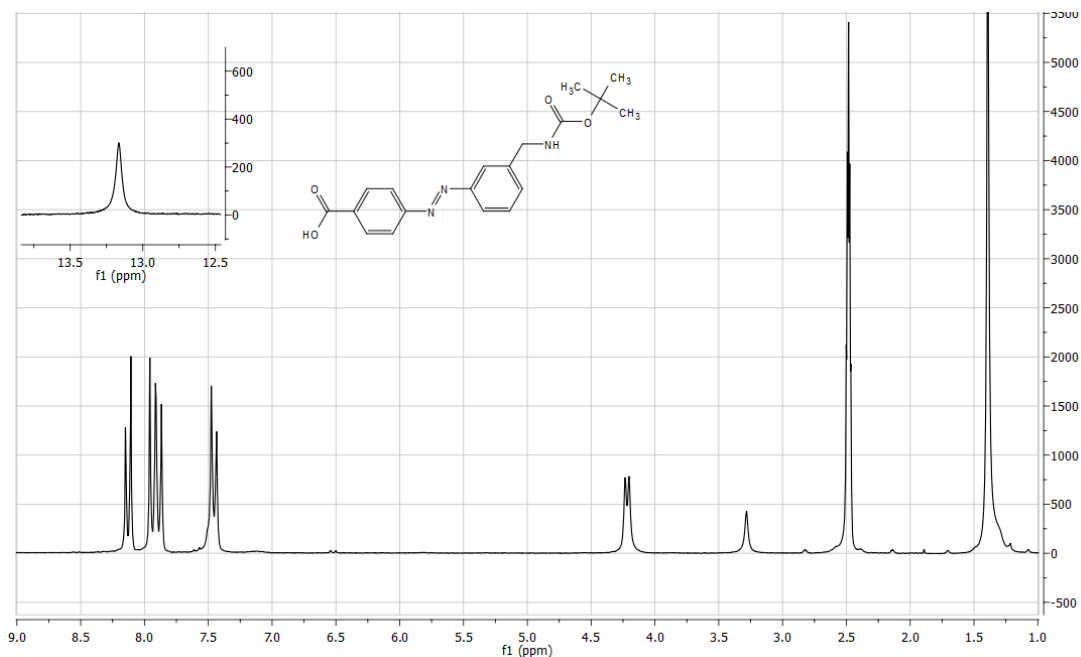


Figura 3.4.1: Strategia sintetica seguita per il prodotto [20].

Il primo passaggio sintetico prevede la protezione **i)**<sup>(38)</sup> del gruppo amminico della 4-nitrobenzilammina con di-*terz*-butil dicarbonato in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presenza della base Et<sub>3</sub>N, ottenendo la N-Boc-4-nitrobenzilammina [17]. Segue la **ii)** formazione della N-Boc-4-nitrosobenzilammina [17a] mediante gli stessi step redox descritti per il nitroso-composto [10]. Quindi prima riduzione a idrossilammina con Zn in polvere e NH<sub>4</sub>Cl in EtOH/H<sub>2</sub>O 5:1, seguita da rapida rimozione dello Zn su celite, riossidazione parziale a nitroso-composto mediante FeCl<sub>3</sub> in EtOH/H<sub>2</sub>O 5:1 e colonna cromatografica per purificare il composto reattivo [17a] di color verde acceso. Questo è stato immediatamente disciolto in AcOH glaciale per far avvenire la reazione Mills **iii)** con l'acido *p*-amminobenzoico (PABA), ottenendo l'unità azobenzenica [18]. Anche in questo caso, è stata sintetizzata la piattaforma triazinica [13] mediante la reazione **iv)** Tiol-Ene vista nel capitolo precedente. A questo punto è stato inserito il frammento molecolare isomerizzabile [18] nella piattaforma, mediante la condensazione **v)** catalizzata dalla DMAP, tra il gruppo alcolico e quello carbossilico a sua volta attivato con EDC ottenendo l'intermedio tris-Boc protetto [19]. Dopo purificazione con colonna cromatografica si sono deprotetti i gruppi amminici **vi)**, con la miscela 1:1 di CF<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ottenendo la piattaforma [20] recante tre gruppi -NH<sub>2</sub> liberi, pronta per fungere da iniziatore per la polimerizzazione successiva.

Il passaggio critico della strategia nel suo insieme, è sicuramente il passaggio **ii)** di sintesi del nitroso-composto [17a]. Nonostante il nitroso sia stato immediatamente impiegato nella fase successiva **iii)** di diazotazione in acido acetico con il PABA, la resa in azo-prodotto [18] rimane molto bassa ( $\approx 27\%$ ), a comprova della difficoltà nel maneggiare questi nitroso-derivati. Tuttavia l'azo composto [18] è stato ottenuto con un buon grado di purezza come osservato dal relativo spettro <sup>1</sup>H-NMR in DMSO rappresentato in *figura 3.4.2*.



**Figura 3.4.2:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  in DMSO dell'azo composto [18] ottenuto dopo purificazione in colonna di silice, con evidenziato il picco del protone acido a 13.2ppm.

Il work-up dell'ultimo step sintetico **vi)** nel passaggio da piattaforma tris-Boc protetta a piattaforma con  $-\text{NH}_2$  liberi è risultato particolarmente critico. In particolare dopo lo sblocco in acido trifluoroacetico si ottiene il sale corrispondente al trifluoroacetato del composto [20] protonato. La necessità di avere un prodotto con i gruppi amminici liberi per la fase di polimerizzazione successiva, ha reso necessario eseguire dei lavaggi basici. Questi sono stati apportati inizialmente con soluzioni di soda al 5%, che hanno però portato alla parziale idrolisi dei legami esterei introdotti nella reazione **v)**. Per questo è stato necessario effettuare i lavaggi con una soluzione al 5% di bicarbonato, meno aggressiva nei confronti degli esteri.

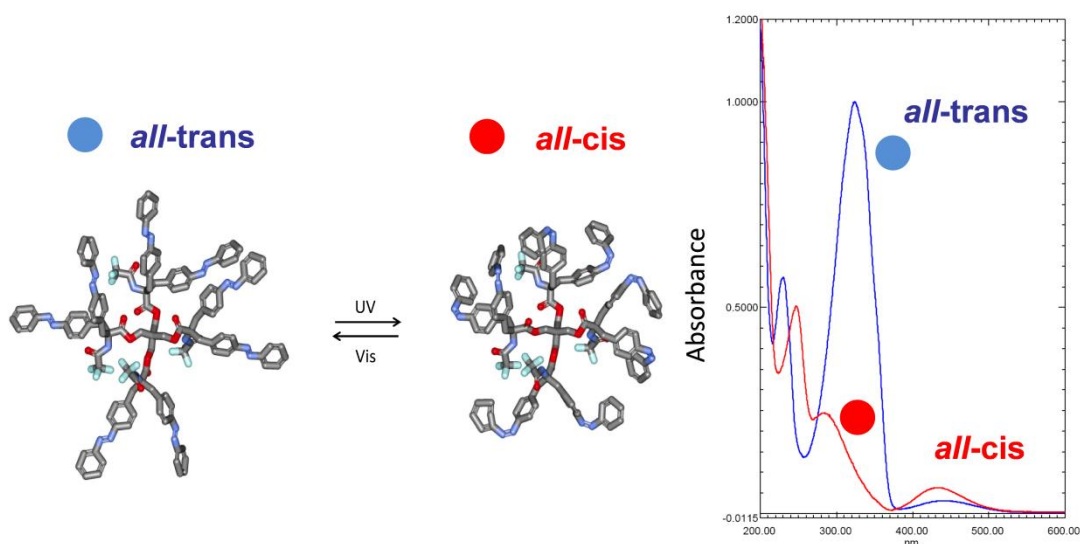




## 4. DISCUSSIONE dei RISULTATI

### 4.1 Octopus System

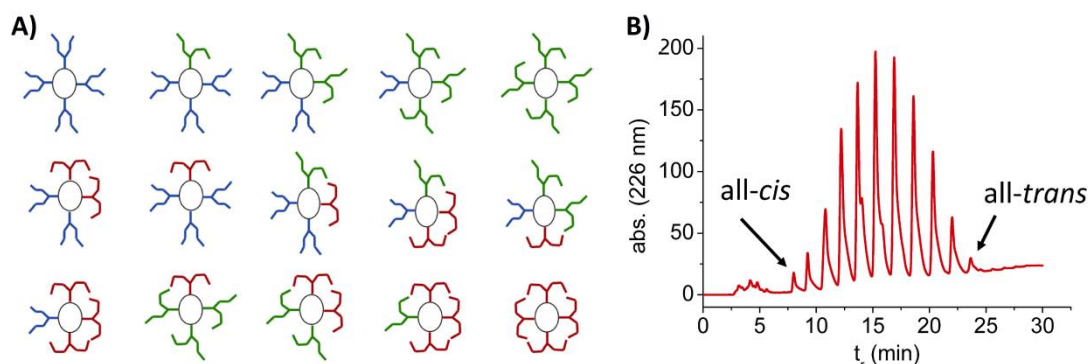
La sintesi del composto "octopus" ci ha consentito di ottenere un struttura multi-azobenzenica di tipo "dendrimerico" di simmetria  $C_4$ , che in principio è in grado di rispondere, reversibilmente, a stimoli luminosi. La risposta a tali stimoli porterebbe ad una notevole variazione sulla forma della molecola. Pertanto se la molecola fosse in grado di auto-associarsi in un sistema supramolecolare voluminoso, il cambiamento conformazionale indotto dalla transizione cis-trans produrrebbe un effetto "macroscopico" sull'intero sistema. Il composto [7] è dunque caratterizzata dalla presenza di 8 unità azobenzeniche (ecco il perché del nome "octopus"): questa molecola può essere vista come un cuore centrale circondato da uno guscio di gruppi azobenzenici. Nella *figura 4.1.1* sono rappresentate le due conformazioni all-*trans* e all-*cis* ed il loro rispettivo spettro di assorbimento



**Figura 4.1.1:** Strutture dell' "Octopus" completamente trans (blu) e cis (rosso); A destra i relativi spettri UV-Vis delle forme tutta trans (blu) e tutta cis (rossa) di una soluzione 0.1 mM in  $CH_3CN$ .

Inizialmente si è proceduto con la caratterizzazione spettroscopica mediante spettrometria UV-Vis in soluzione (in questo caso 0.1 mMol in acetonitrile). La procedura sintetica ha verosimilmente portato alla formazione del composto [7]

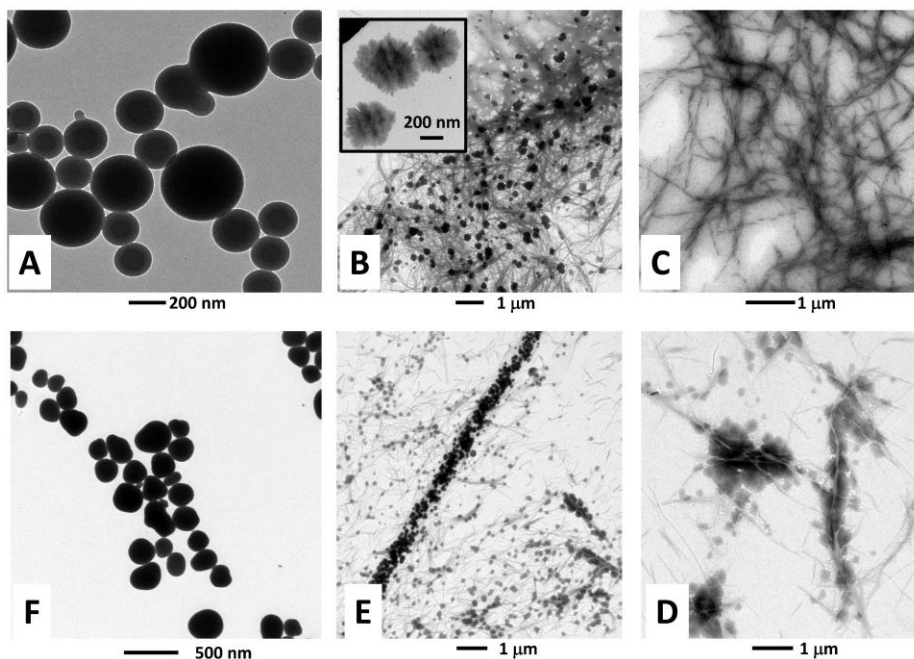
nella conformazione termodinamicamente più stabile, con tutte le unità azobenzeniche in conformazione trans. Lo spettro di assorbimento UV-Vis relativo, evidenzia una banda intensa con massimo a circa 340 nm ed una banda molto più debole a circa 440 nm. A seguito di irraggiamento con una lampada a 365 nm, per un periodo di circa 30 secondi, lo spettro di assorbimento UV-Vis risultante mostra il collasso della banda a circa 340 nm ed un concomitante lieve aumento di quella a 440 nm. Questi risultati sono in accordo con l'andamento del processo di isomerizzazione dei sistemi a base di azobenzene descritti nella parte introduttiva (Cap. 1.5). A seguito di irraggiamento a 440 nm, lo spettro UV-Vis è ritornato esattamente quello di partenza, dimostrando la reversibilità del processo. La peculiarità di questo nostro sistema dendrimerico è che in principio ci sono 15 possibili stati discreti che si possono formare durante l'isomerizzazione all-trans → all-cis. Infatti, come mostrato nella *figura 4.1.2 A*, se l'isomerizzazione non è completa, solo alcune delle unità azobenzeniche avranno cambiato la loro configurazione. Per cercare di capire se effettivamente le specie intermedie si potessero osservare, si è proceduto ad irraggiare una soluzione 10 mM in acetonitrile a tempi successivi analizzandola tramite HPLC in fase inversa. Dopo aver registrato i tempi di ritenzione dei due isomeri dell'octopus all-trans e all-cis (quest'ultimo ottenuto irraggiando il campione con luce a 365nm per 40 minuti) (vedi picchi in *figura 4.1.2 B*), si è riscontrato che nei cromatogrammi intermedi, sono presenti 11 picchi dei possibili 15 ipotizzati, ciascuno corrispondente a un diverso stato discreto.



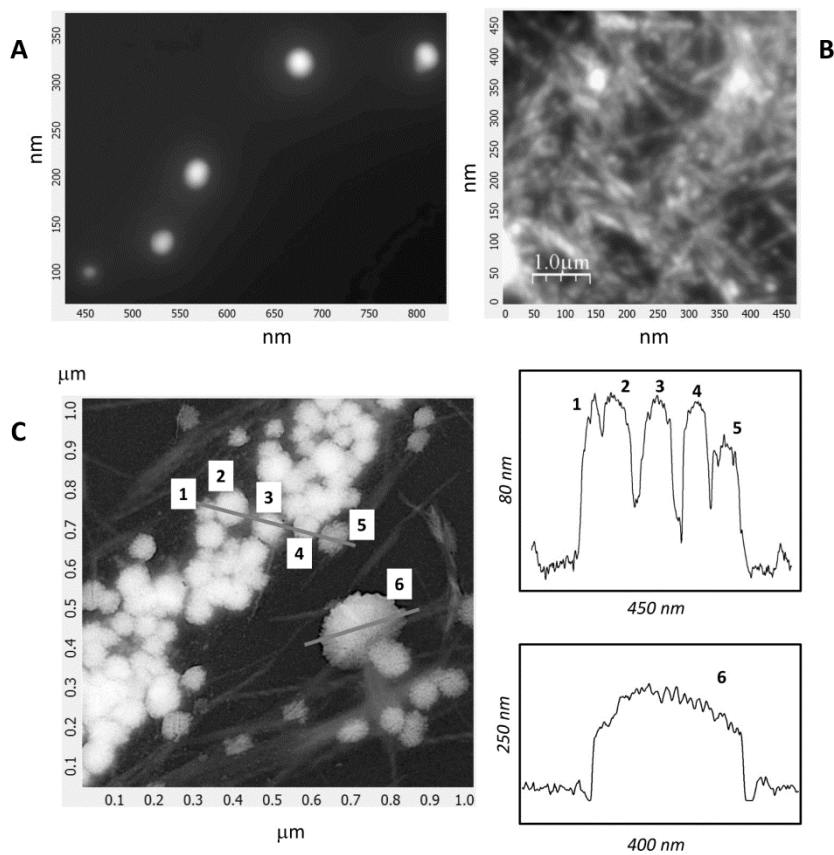
**4.1.2: A)** Rappresentazione dei 15 possibili stati discreti che intercorrono tra octopus all-trans → all-cis e viceversa; **B)** Profilo HPLC in fase inversa del composto [7] dopo 3 minuti di irraggiamento di una soluzione 10 mM di "Octopus" in acetonitrile.

Ciò indica che nel processo di irraggiamento le isomerizzazioni cis-trans avvengono in momenti diversi, non cooperativamente, pertanto la forma geometrica della molecola cambia tramite un processo graduale, che prevede la transizione attraverso forme diverse. Questo sistema ci è sembrato altamente promettente come tipologia di “building-block” per la costruzione di sistemi supramolecolari in grado di rispondere agli stimoli della luce. Il “self assembly” del composto [7] è stato eseguito attraverso il processo di dialisi, che crea le condizioni ideali per l’autoassemblamento. La soluzione del composto [7] in solvente organico (7:3 THF/DMF) viene inserita in una sacca da dialisi (membrana con cut off 12kD) , lasciandola dializzare contro acqua per almeno 48h. Alla fine del processo di dialisi, all’interno della sacca si è formata una sospensione colloidale in acqua. Tale sospensione è stata analizzata tramite microscopia a trasmissione elettronica (TEM), scoprendo la formazione di microstrutture sferiche di tipo vescicolare, con dimensioni variabili da 200 a 500 nm visibili in *figura 4.1.3 A*.

Sulla base dei risultati appena ottenuti dall’analisi HPLC, si è provato ad irraggiare la stessa soluzione colloidale per tempi diversi tramite luce a 365 nm, per verificare se fosse possibile indurre un cambio strutturale sulle microstrutture. Irradiando per 10 minuti, si è osservata la formazione di un network di fibre nelle quali si sono evidenziate delle strutture sempre sferiche ma di tipo “spugnoso” (*figura 4.1.3 B*). Proseguendo per altri 5 minuti con l’irraggiamento a 365nm il sistema muta definitivamente la sua morfologia, completando la transizione da sfere a fibre (*figura 4.1.3 C*). A questo punto un’ulteriore irraggiamento non ha prodotto ulteriori effetti sulla forma delle microstrutture, e si è dunque provveduto con l’irraggiamento tramite luce a 450 nm. Dopo 5 minuti è stato possibile osservare la graduale scomparsa della struttura fibrosa a favore di quella spugnosa (*figura 4.1.3 D*), il che indica che il ri-arrangiamento dalla forma *cis* a quella *trans* ha come effetto la ri-organizzazione delle strutture fibrose in aggregati più compatti. Dopo ulteriori 15 minuti di irraggiamento la struttura fibrosa è praticamente scomparsa, formando prevalentemente strutture spugnose e sferiche (*figura 4.1.3 E*). Un ulteriore prolungamento di 15 minuti dell’irraggiamento ha condotto al ripristino delle strutture vescicolari come visibile in *figura 4.1.3 F*.



**Figura 4.1.3:** Immagini TEM del processo di transizione strutturale supramolecolare “vescicole-spugne-fibre” indotto dall’irraggiamento a 365nm nel tempo [A(tempo 0),B(10min),C (15min)] e 450nm nel tempo D(tempo 5),E(tempo 20),F(tempo 35min) .



**Figura 4.1.3:** Immagini AFM di strutture supramolecolari ottenute dal self assembly del composto [7]:  
**A)** vescicole, **B)** fibre, **C)** mix di fibre e strutture spugnose con i relativi profili di altezza (a numeri uguali corrispondono le relative altezze).

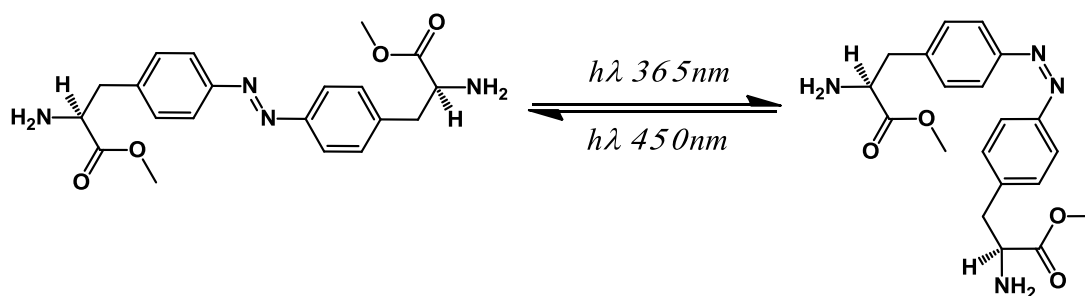
Le strutture evidenziate con le analisi TEM sono state ulteriormente osservate tramite la microscopia a forza atomica (AFM). In *figura 4.1.4* sono riportate le strutture sferiche (A), le fibre (B) e le spugne (C). Inoltre in *figura 4.14 C* si è riportato il profilo irregolare dell'altezza in questa tipologia di microstrutture intermedia che è indice di una superficie rugosa, motivo per cui questa struttura è stata definita "spugna".

In conclusione, l'abilità di questo composto nel promuovere strutture supramolecolari ben ordinate sottolinea l'importanza dell'amminoacido *pazoDbg* in questo campo di ricerca. In particolare (i) le due catene laterali del bis-azo-amminoacido danno origine a interazione di stacking aromatico che sono sufficientemente forti da generare il self-assembly e (ii) queste interazioni possono essere distrutte o allettate dall'assorbimento della luce così da fare diventare il sistema modulabile, in forma, dalla luce. Questo esempio è il primo in letteratura in cui la reversibilità del sistema passa attraverso tre tipi di morfologie, interamente guidato dall'irraggiamento.

## 4.2 Polimero con iniziatore “lineare” a simmetria C<sub>2</sub>.

### 4.2.1 Polimero fotosensibile [22] Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG.

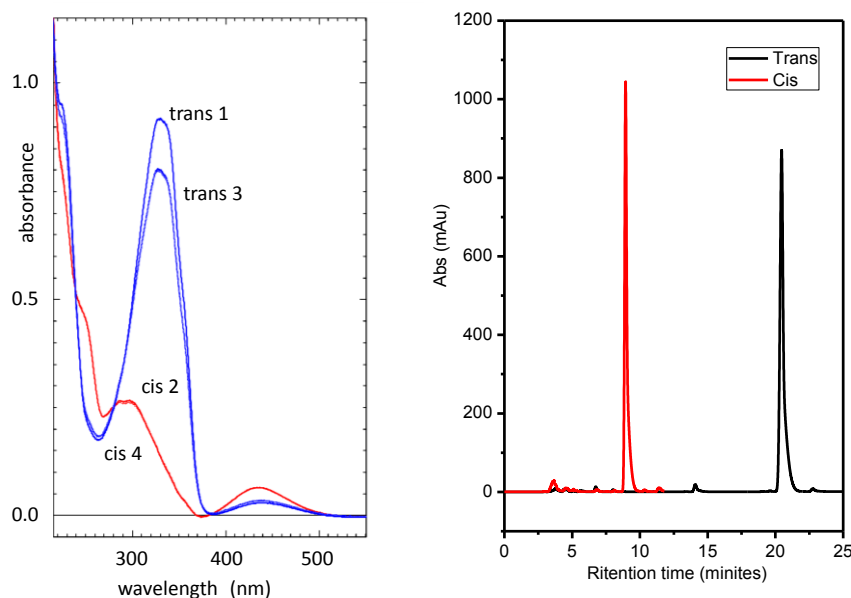
Il composto [12], abbreviato in Azo(Ala)<sub>2</sub>, contiene una unità azobenzenica che può isomerizzare nelle forme *trans-cis*. Tale processo è schematizzato in *figura 4.2.1*, ed è stato studiato attraverso tecniche UV-Vis e HPLC a fase inversa, i cui risultati sono mostrati nella *figura 4.2.2*.



**Figura 4.2.1:** Processo di foto-isomerizzazione del composto [12] chiamato Azo(Ala)<sub>2</sub>.

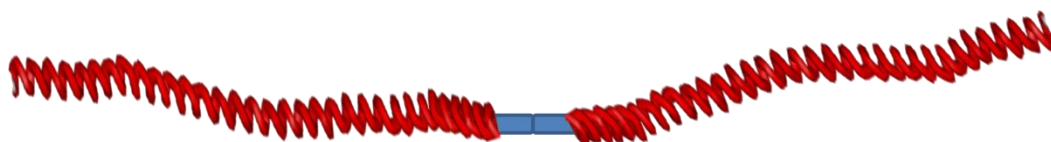
Nel caso dello studio Uv-Vis, si è preparata una soluzione 0.1 mM di [12] in metanolo e si è registrato un primo spettro UV-Vis (indicato come *trans 1* in *figura 4.2.2*). Successivamente la curvetta UV è stata irraggiata per 60 secondi con luce a 365 nm. Lo spettro Uv-Vis risultante (indicato come *cis 2* in *figura 4.2.2*) è quello caratteristico per la forma *cis* dell'azobenzene. Si è proceduto ad illuminare quest'ultima soluzione con luce a 450 nm e si è registrato nuovamente lo spettro Uv-Vis (indicato come *trans 3* in *figura 4.2.2*) che è perfettamente sovrapponibile con il primo spettro antecedente ad ogni tipo di irraggiamento. Il ciclo è stato ripetuto un'altra volta, confermando la piena reversibilità del processo di foto-isomerizzazione. La foto-isomerizzazione è stata monitorata anche attraverso HPLC (*figura 4.2.2*), dove il composto *trans* (1 mM in metanolo) è stato identificato ad un tempo di ritenzione di circa 21 minuti, mentre quello *cis* (ottenuto dopo irraggiamento con lunghezza d'onda di 365 nm, per 3 minuti) mostra un tempo di ritenzione pari a 9.5 minuti. Dato che l'HPLC a fase inversa separa in base alla interazioni idrofobiche, la grande variazione nei due tempi di ritenzione suggerisce che il composto *trans* abbia una natura molto più idrofobica del corrispondente

isomero cis, compatibile con la variazione del momento di dipolo da 0 a 3 Debye, che accompagna l'isomerizzazione da *trans*→*cis*.



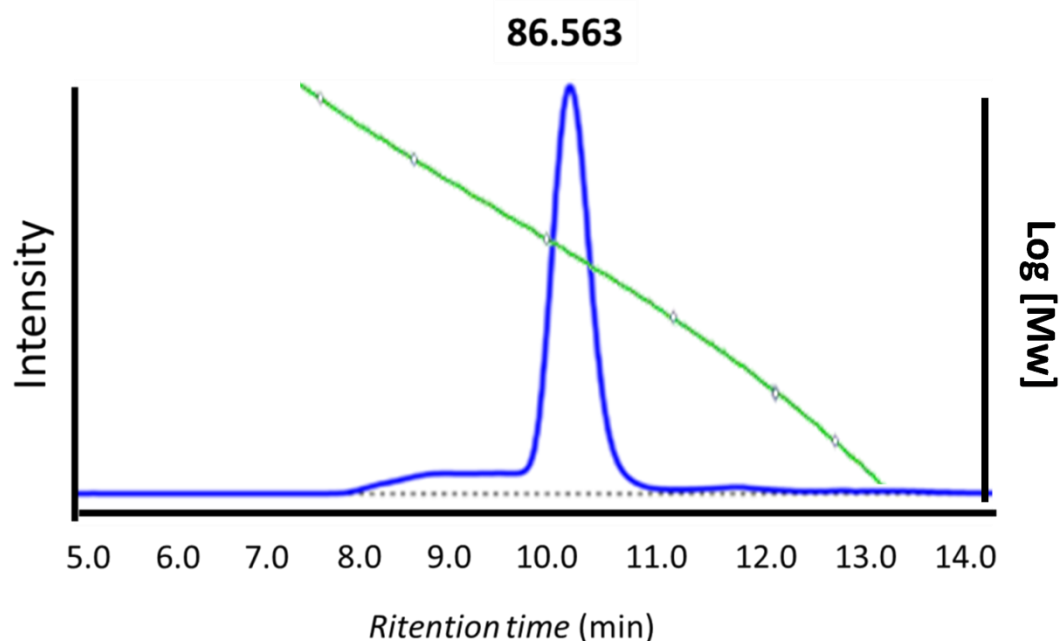
**Figura 4.2.2:** A sinistra, spettri UV-Vis di [12] a differenti cicli di irraggiamento (365 e 450 nm). A destra, profili cromatografici HPLC a fase inversa di [12] per g i isomeri *trans* (nero) e *cis* (rosso).

Successivamente si è proceduto con la polimerizzazione dell'NCA del benzil-L-glutammato, utilizzando come iniziatore amminico il nostro Azo(Ala)<sub>2</sub> appena sintetizzato. Il nostro fine infatti è l'inserimento di una unità isomerizzabile fotosensibile nella struttura di un polimero a base peptidica. In questo caso si ottiene un polibenzil glutammato che presenta nel backbone una unità azobenzonica. In linea di principio questa potrebbe trasferire le sue proprietà fotochimiche al polimero stesso, rendendolo un "materiale" fotosensibile. In figura 4.2.3 viene riportata una schematizzazione del polimero prodotto in questo modo, chiamato Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG.



**Figura 4.2.3:** Schematizzazione del polimero [22] Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG, ottenuto attraverso la polimerizzazione dell'NCA del belzil glutammato utilizzando [12] Azo(Ala)<sub>2</sub> come iniziatore.

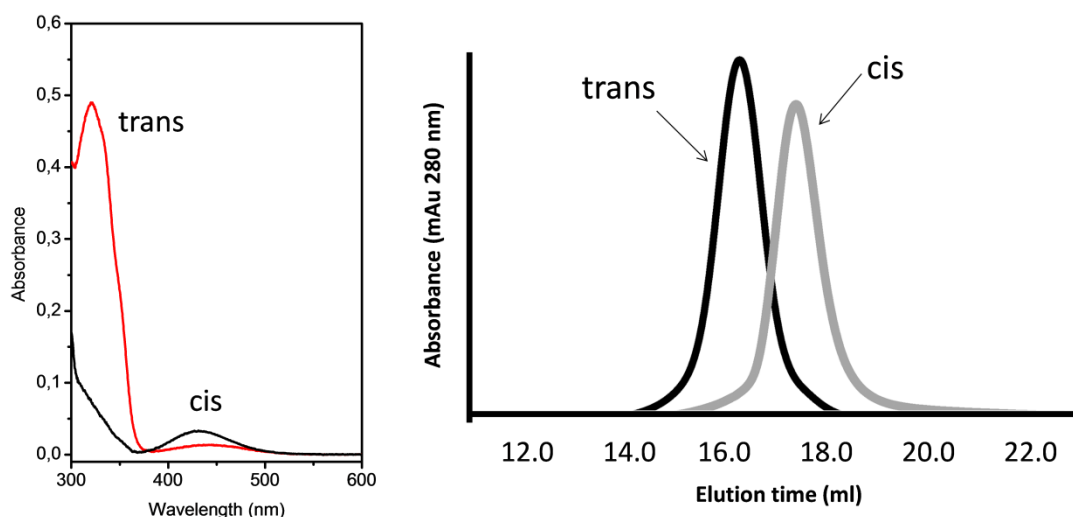
La reazione di polimerizzazione è stata condotta sciogliendo la NCA in 1,4-diossano alla concentrazione di 2.44 M sotto atmosfera inerte, e raffreddata a 0 °C. Successivamente è stato introdotto l'iniziatore (in rapporto 375:1) sciolto nel minimo volume di miscela 1:1 diossano/DMF. Si è lasciato che la miscela di reazione arrivasse a temperatura ambiente e poi la reazione è stata termostata a 30 °C per 24 ore. Durante questo periodo si è osservato un cambio progressivo della viscosità della soluzione, che alla fine a stento permetteva il movimento dell'ancoretta magnetica. Al termine della reazione, il prodotto è stato precipitato mediante l'aggiunta di metanolo. La sospensione è stata centrifugata a 6500 giri per 10 minuti e le acque madri così ottenute, sono state decantate mentre il precipitato è stato risospeso in metanolo e centrifugato nuovamente. Questa operazione è stata ripetuta per 3 cicli, utilizzando nell'ultimo caso dell'Et<sub>2</sub>O. Infine si è raccolto il polimero precipitato e lo si è messo a seccare sotto vuoto. Il polimero [22] è stato analizzato mediante size exclusion chromatography (SEC), per la determinazione del peso molecolare medio numerico. Si è provveduto alla preparazione di una retta di calibrazione (indicata in verde nella *figura 4.2.4*) utilizzando miscele di standard di polistirene a PM noto e bassa polidispersione. Il risultato delle analisi è riportato in *figura 4.2.4*.



**Figura 4.2.4:** Profilo SEC del polimero Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG (linea blu), e retta di calibrazione (in verde) preparata con standard di polistirene a PM noto.



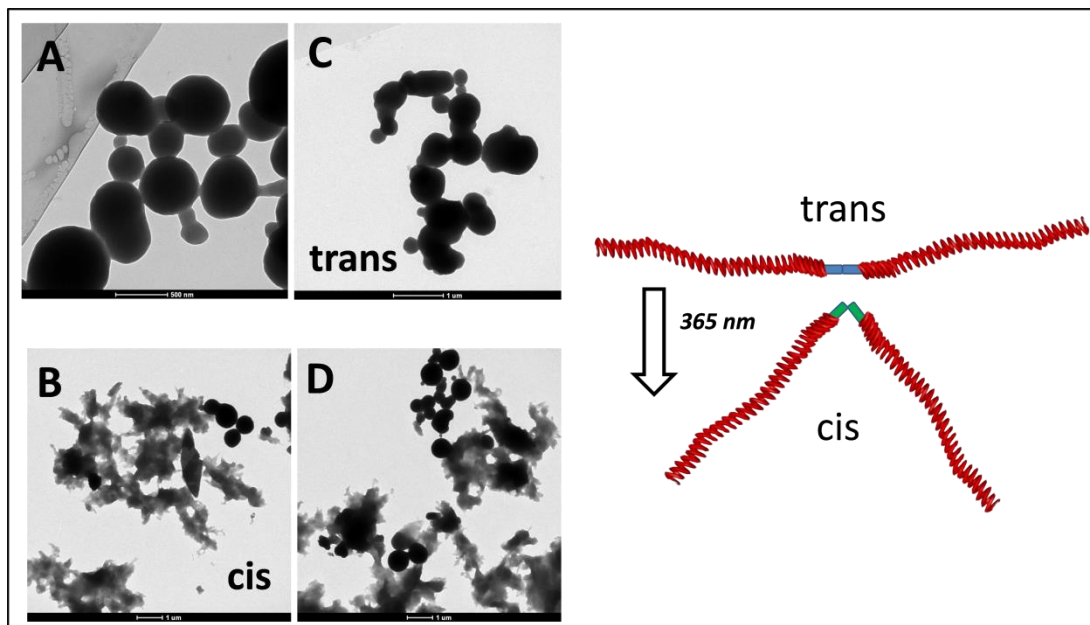
Il peso molecolare previsto nel caso ideale di una conversione del 100 % dell’NCA è di circa 100000g/mol, mentre il risultato ottenuto ha mostrato un PM di 86.563, con una buona polidispersione (dpi) pari a 1.16. Questo significa che mediamente ogni braccio del polimero contiene 164 unità di benzilglutammato. Successivamente si è testato il comportamento del polimero Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG in seguito all’irraggiamento a 365nm e 450nm, per verificare che l’unità isomerizzabile sia stata effettivamente inglobata nel polimero e che le proprietà di risposta a stimoli luminosi siano state conservate. Per tale motivo si sono registrati gli spettri UV-Vis e i profili SEC del polimero [22] disciolto in THF prima e dopo irraggiato per 15 minuti a 365 nm (figura 4.2.5).



**Figura 4.2.5:** A sinistra, spettri UV-Vis e a destra cromatogrammi SEC del polimero [22] Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG prima (*trans*) e dopo (*cis*) irraggiamento alla lunghezza d’onda di 365 nm.

Dai risultati emerge innanzitutto che effettivamente il polimero contiene l’unità azobenzenica (spettro UV-VIS di figura 4.2.5), e che soprattutto risponde agli stimoli luminosi. Di fatto le due forme isomeriche dello stesso polimero necessitano di volumi di eluzione differenti (cromatogramma SEC di figura 4.2.5). La forma *cis* infatti, sembra più compatta, il che gli permette di arrivare prima al detector nella prova SEC, del corrispondente polimero *trans*. Confermata la possibilità di controllare il processo di isomerizzazione sul polimero, si è passati al tentativo di formare microstrutture ordinate mediante il processo del self assembly. Il risultato migliore si è ottenuto attraverso il processo di dialisi (contro acqua) partendo dal composto [22] così come sintetizzato (10mg) sciolto in una miscela di 7:3 THF/DMF

(5.0ml). La sospensione così ottenuta è stata analizzata con le microscopie TEM ed i risultati sono riportati in *figura 4.2.6*.

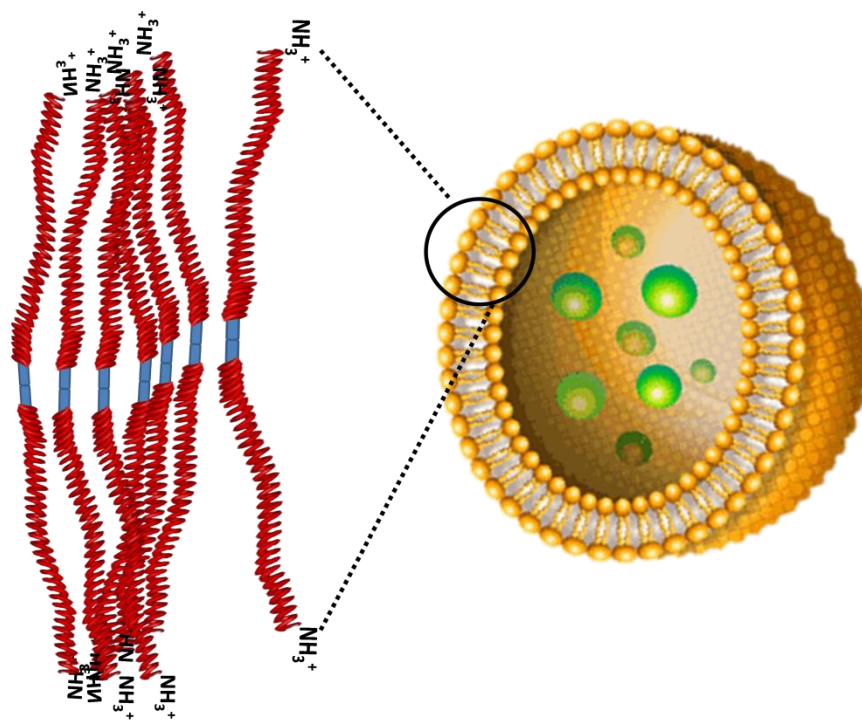


**Figura 4.2.6:** A sinistra, immagini TEM rispettivamente prima (**A e C**) e dopo irraggiamento a 365 nm per tempi diversi (5min per **B**, 1min per **D**) del polimero [22] Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG sottoposto a dialisi contro acqua. A destra rappresentazione della variazione geometrica indotta nel polimero dalla isomerizzazione dell'unità azobenzenica nel backbone.

Le immagini A e C nella *figura 4.2.6* si riferiscono allo stesso campione di polimero [22] posto a dialisi, e mostrano come questo si organizza in strutture supramolecolari ordinate di tipo vescicolare sferiche, con dimensioni di circa 500 nm. A questo punto si è proceduto ad irraggiare con la lampada a 365 nm per 6 minuti, osservando al TEM come tali strutture siano letteralmente “esplose” in *figura 4.2.6 B*. Per scrupolo si è tentato di irraggiare lo stesso campione per un tempo inferiore (60secondi), ma si è ottenuto il medesimo risultato (*figura 4.2.6 D*), con il collasso delle vescicole che avviene quindi molto rapidamente, anche in assenza di totale conversione *trans*→*cis*.

Il collasso delle vescicole è quindi sperimentalmente correlato all'isomerizzazione dell'unità azobenzenica presente nell'iniziatore, provocata dall'irraggiamento a 365nm. Ciò significa che probabilmente la forma angolata *cis* deforma completamente la superficie delle sfere, provocandone il collasso. Verosimilmente, la struttura sferica è di tipo “liposomico”, cioè costituita da una membrana “doppio strato” e caratterizzata da un volume interno cavo, riempito dal solvente. Ciò sarebbe in accordo con la natura del polimero, che presenta una elevata componente idrofobica (la parte azo e tutte le unità benziliche del PBLG), ma

contemporaneamente reca due gruppi amminici nelle sue parti terminali, che se protonati ( $-\text{NH}_3^+$ ), fungerebbero da “teste idrofiliche” esposte al solvente acquoso (figura 4.2.7). Il cambio di geometria nel singolo polimero, porterebbe quindi le strutture osservate a disassemblarsi, in quanto il polimero non riuscirebbe più a formare un strato di membrana ordinato e ben impaccato.



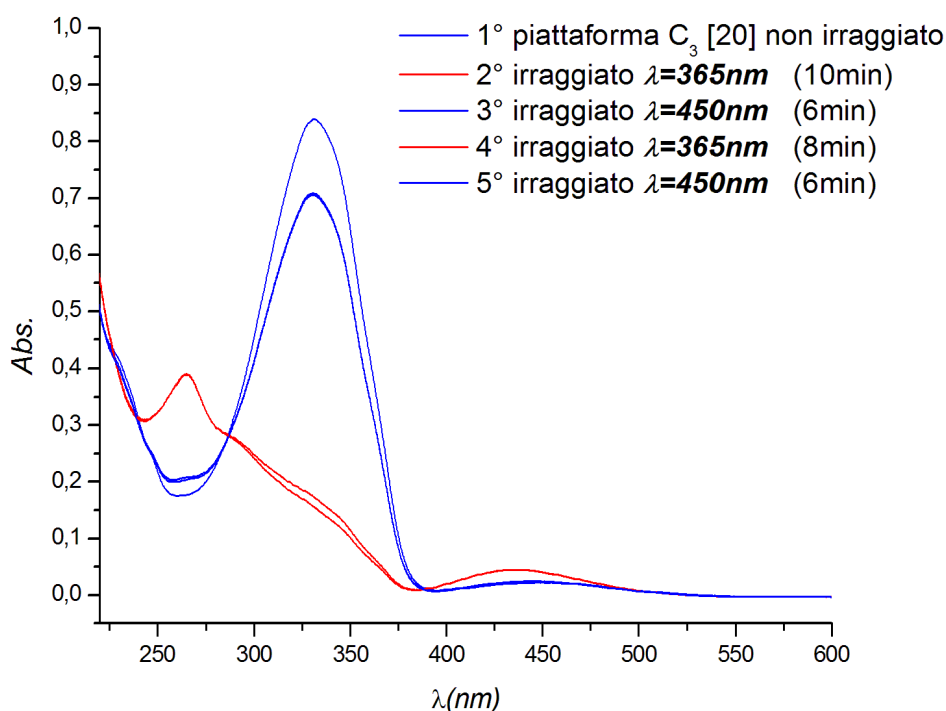
**Figura 4.2.7:** Ipotesi della formazione di una membrana a doppio strato a seguito del processo di “self-assembly” del polimero [22] Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG. La parte idrofobica è ordinata lungo degli assi e nascosta dal solvente esterno (H<sub>2</sub>O) mentre i gruppi NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sono ben esposti ad esso.

Per questo sistema non si sono ottenuti risultati con irraggiamento a 450 nm. La parte importante di questo studio è la possibilità di costruire un sistema supramolecolare ordinato a partire da un polimero lineare. La possibilità di inserire un gruppo in grado di isomerizzare con la luce, ha fatto sì che la struttura fosse in grado di rispondere a questa tipologia di stimolo. Inoltre la risposta è molto veloce (circa 60 secondi di irraggiamento) e porta all’esplosione della vescicola. Pertanto, sono in corso studi per lo sfruttamento di questo sistema per l’incapsulamento di vari substrati ed un loro rilascio in condizioni foto-controllate.

## 4.3 Polimeri con iniziatori “planari” a simmetria $C_3$ .

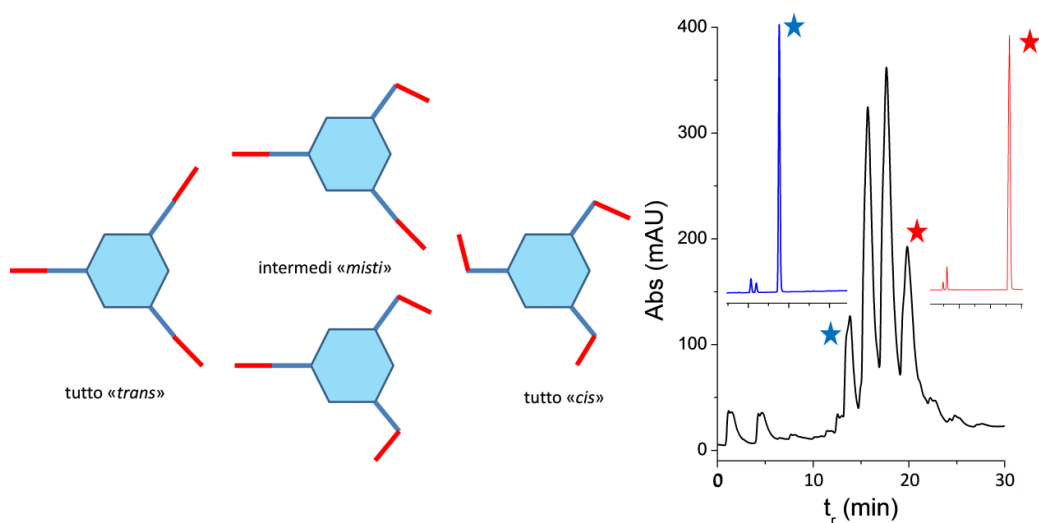
### 4.3.1 Polimero fotosensibile [24] $\text{Tr}(\text{Azo})_3\text{-PBLG}$ .

Come nel caso dell’iniziatore  $\text{Azo}(\text{Ala})_2$  con simmetria  $C_2$ , anche le piattaforme a simmetria  $C_3$  [16] e [20] sono state concepite con lo scopo di utilizzarle come iniziatori ammici per la polimerizzazione dell’NCA del benzil glutammato. In tal modo ci si aspetta di ottenere dei polimeri che rechino tre “braccia” a partire da un nucleo di simmetria planare trigonale. Per quanto riguarda la piattaforma [20] denominata  $\text{Tr}(\text{Azo})_3$  in virtù delle tre unità azobenzeniche contenute in esso, si è innanzitutto proceduto con la verifica del processo di isomerizzazione prodotto dalle solite prove di irraggiamento a 365 e 450nm (figura 4.3.1).



**Figura 4.3.1.** Cicli di irraggiamento a 365 e 450nm della piattaforma [20]  $\text{Tr}(\text{Azo})_3$ , con i relativi tempi di esposizione.

In questo caso il numero di isomeri possibili a seguito dell’isomerizzazione è quattro e cioè le due forme all-*cis* e all-*trans* e i due intermedi “misti”. Effettivamente all’HPLC si sono osservati al massimo quattro segnali, ottenuti per un tempo di irraggiamento intermedio tra la forma all-*trans* e all-*cis* (figura 4.3.2).

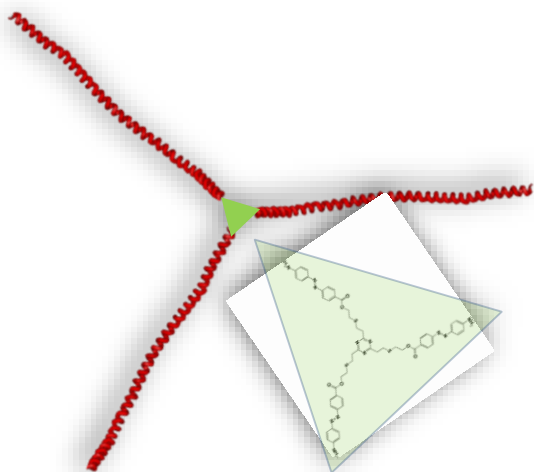


**Figura 4.3.2.** Schematizzazione della piattaforma [20] Tr(Azo)<sub>3</sub> a simmetria C<sub>3</sub> e del suo processo di isomerizzazione. A destra il profilo cromatografico HPLC che evidenzia la presenza di 4 segnali durante il processo di isomerizzazione all-cis(in Blu)/all-trans(in Rosso).

In rosso nella *figura 4.3.2* è riportato il cromatogramma HPLC a fase inversa del composto [20] nella sua forma all-*trans*. Dopo 10 minuti di irraggiamento a 365 nm si è ripetuta l'iniezione all'HPLC ed è stato ottenuto il profilo riportato dal cromatogramma in blu corrispondente all'isomero all-*cis*. Si sono quindi condotti altri esperimenti di irraggiamento a tempi diversi, 2,4,6, 8 minuti, e in *figura 4.3.2* viene riportato il cromatogramma in nero, relativo ad un tempo di irraggiamento di 4 minuti, ed evidenzia la presenza di 4 specie isomeriche, come aspettato.

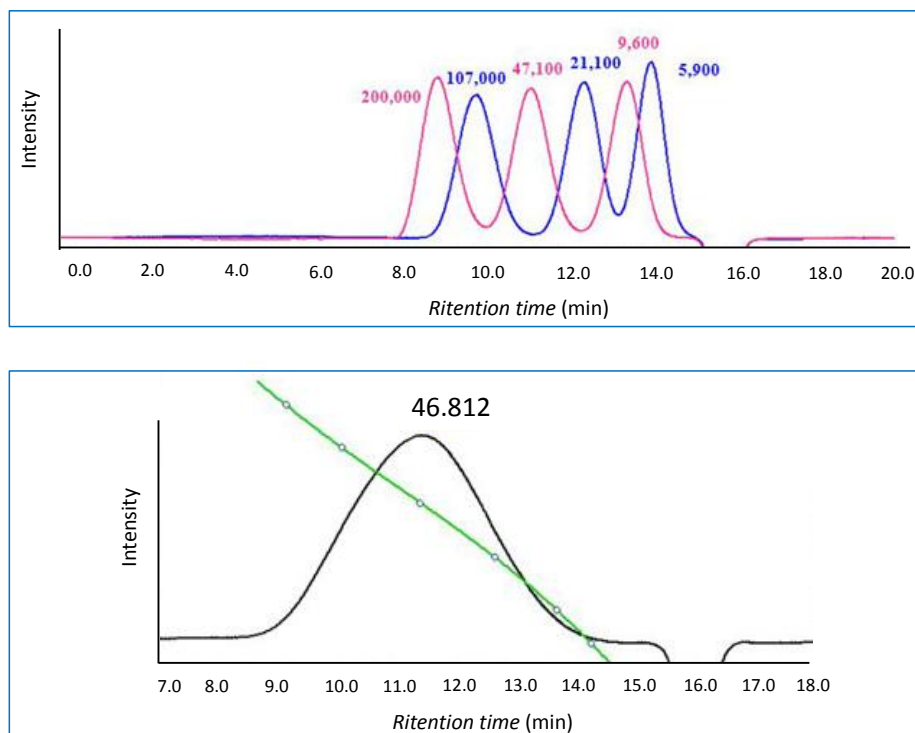
Come detto prima, la sintesi di questa piattaforma è finalizzata alla costruzione di un polimero peptidico a base di benzil-L-glutammato che, come nel caso del polimero [22] Azo(Ala)<sub>2</sub>-PBLG, sia responsivo a stimoli luminosi. In particolare viene riportata una raffigurazione schematizzante il polimero [24] (*figura 4.3.3*), chiamato Tr(Azo)<sub>3</sub>-PBLG dato il particolare iniziatore utilizzato. La sintesi del polimero è stata condotta sciogliendo la NCA in 1,4-diossano alla concentrazione di 1.65 M sotto atmosfera inerte, e raffreddata a 0 °C. A questa è stato introdotto rapidamente l'iniziatore [20] (in rapporto 380:1) sciolto in un minimo volume di DMF. Si è lasciato che la miscela di reazione arrivasse a temperatura ambiente e poi la reazione è stata termostata a 30 °C per 24 ore. Anche in questo caso durante la polimerizzazione si è osservato un aumento progressivo della viscosità della miscela. Al termine della reazione, il prodotto è stato precipitato mediante

l'aggiunta di una abbondante quantità di metanolo, il tutto centrifugato a 6500 giri per 15 minuti. Dopo aver decantato le acque madri il polimero è stato risospeso in metanolo e centrifugato nuovamente, per poi essere nuovamente centrifugato. Questa operazione è stata ripetuta per 2 cicli con MeOH e 1 ciclo con Et<sub>2</sub>O, mettendo infine il prodotto [24] ad essiccare in giara sotto vuoto.



**Figura 4.3.3:** Rappresentazione schematica del polimero [24] Tr(Azo)<sub>3</sub>-PBLG che risalta la simmetria C<sub>3</sub> conferita dall'iniziatore triazinico [20].

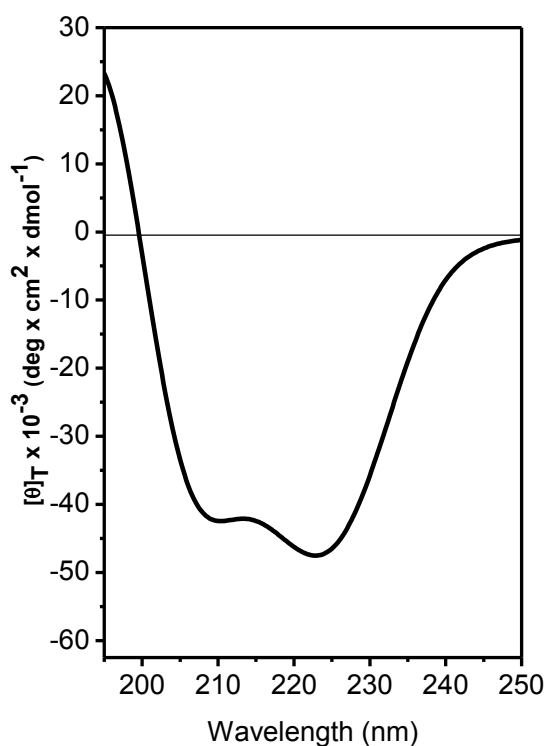
Il polimero è stato quindi caratterizzato mediante "size exclusion chromatography" (SEC) per determinarne il peso molecolare medio numerico (figura 4.3.4).



**Figura 4.3.4:** In alto le curve di iniezione di standard polistirenici a bassa dispersione necessari alla calibrazione. Sotto il profilo SEC del polimero [24] Tr(Azo)<sub>3</sub>-PBLG.

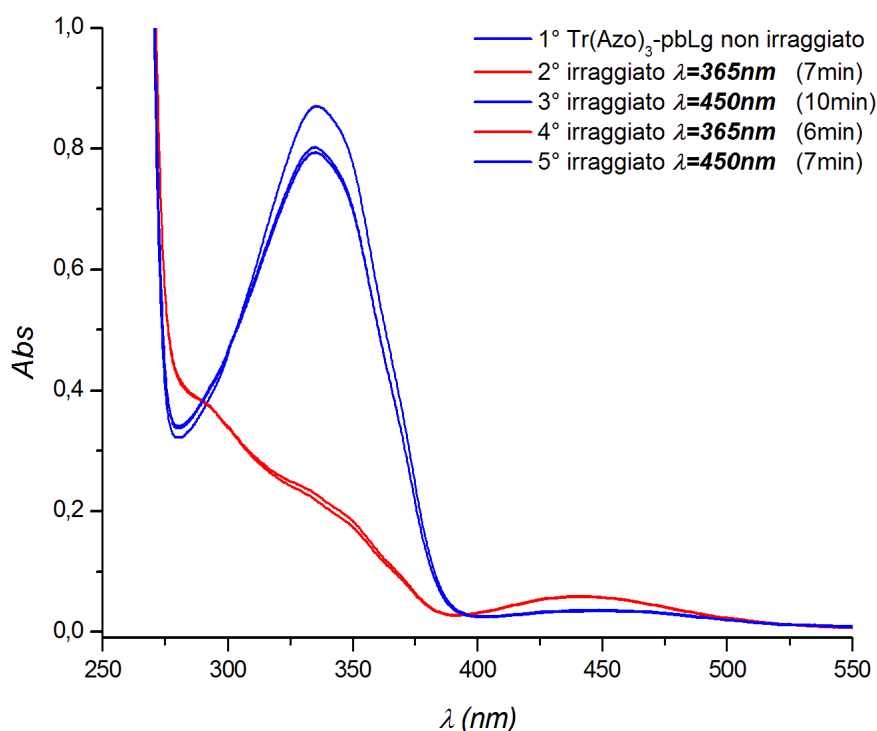
Per eseguire questa analisi, si è eseguita inizialmente una calibrazione con una serie di standard polistirenici a stretta distribuzione. Successivamente si è analizzato il polimero che ha dato come risultato un PM di 46.812 con un dpi pari a 1,56 quando il peso molecolare aspettato, nel caso della addizione del 100% dei monomeri era di circa 101.000. Questo significa che mediamente ciascuno dei tre “bracci” contenga circa 58 unità monomeriche. Il fatto che la viscosità della miscela di reazione sia aumentata molto durante il passare delle ore, ha reso la reazione sempre più lenta, ma questo è un aspetto tipico delle reazioni polimeriche.

Per confermare le nostre ipotesi fatte fin ora sulla struttura del polibenzil glutammato si è utilizzata la tecnica del dicroismo circolare, che ci permette di capire se lo scheletro polipeptidico acquista in soluzione una particolare struttura secondaria. La prova è stata quindi effettuata in esafluoropropanolo (HFIP) come solvente e dalla forma risposta ottenuta, cioè la presenza dei due massimi negativi a 226 e 208 nm, ha evidenziato la formazione di strutture elicoidali, di tipo  $\alpha$ -elica (Figura 4.3.5), come previsto.



**Figura 4.3.5:** Spettro di dicroismo circolare (in HFIP) per il polimero Tr(Azo)<sub>3</sub>-PBLG con simmetria C<sub>3</sub>.

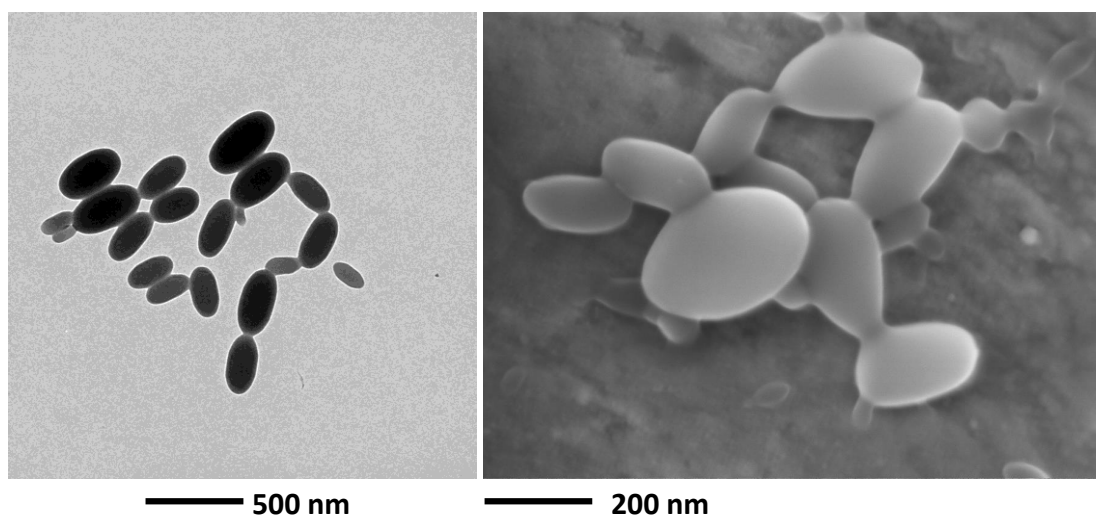
Le analisi FT-IR allo stato solido evidenziano la formazione delle bande ammidiche ( $1652$  e  $1547\text{ cm}^{-1}$ ) e dell'estere benzoico ( $1735\text{ cm}^{-1}$ ), mentre lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  risulta fortemente allargato nei suoi segnali a causa della bassa mobilità del polimero in soluzione. A questo punto si è provveduto a confermare la presenza delle unità foto-isomerizzabili all'interno del polimero, mediante cicli di irraggiamento a  $365$   $450\text{nm}$  che inducono il cambio di configurazione *trans-cis* (figura 4.3.6).



**Figura 4.3.6:** spettri di assorbimento UV-Vis di una soluzione in THF di polimero [24] ( $0.0138\text{g}/3\text{ml}$ ) dopo irraggiamento a  $365\text{nm}$  (forma *trans* in blu) e dopo irraggiamento con luce a  $450\text{nm}$  (forma *cis* in rosso).

Verificato che il composto fosse in grado di foto-isomerizzare, si è proceduto alla formazione di strutture supramolecolari attraverso il processo di “self-assembly” mediante dialisi di una soluzione di  $10\text{mg}$  di  $\text{Tr}(\text{Azo})_3\text{-PBLG}$  in  $5\text{ ml}$  di soluzione  $7:3$  THF/DMF contro acqua (membrana con cut-off di  $12\text{kD}$ ). La sospensione così ottenuta è stata sottoposta alle microscopie TEM e SEM i cui risultati sono riportati in figura 4.3.7.

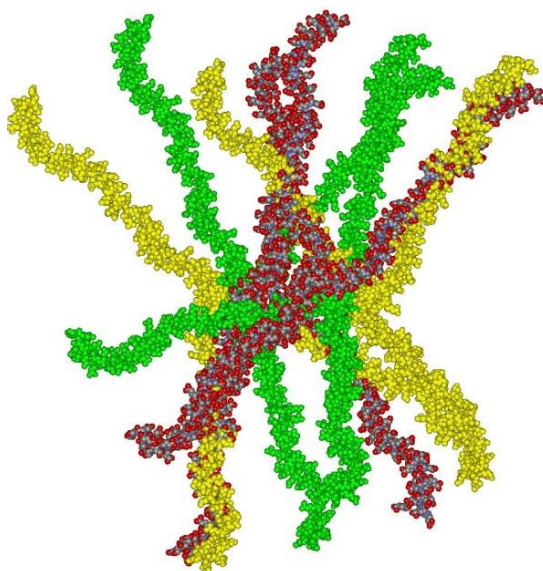




**Figura 4.3.7:** Immagini TEM (sinistra) e SEM (destra) delle strutture supramolecolari ottenute dal “self-assembly” del polimero fotosensibile [24] a simmetria  $C_3$ .

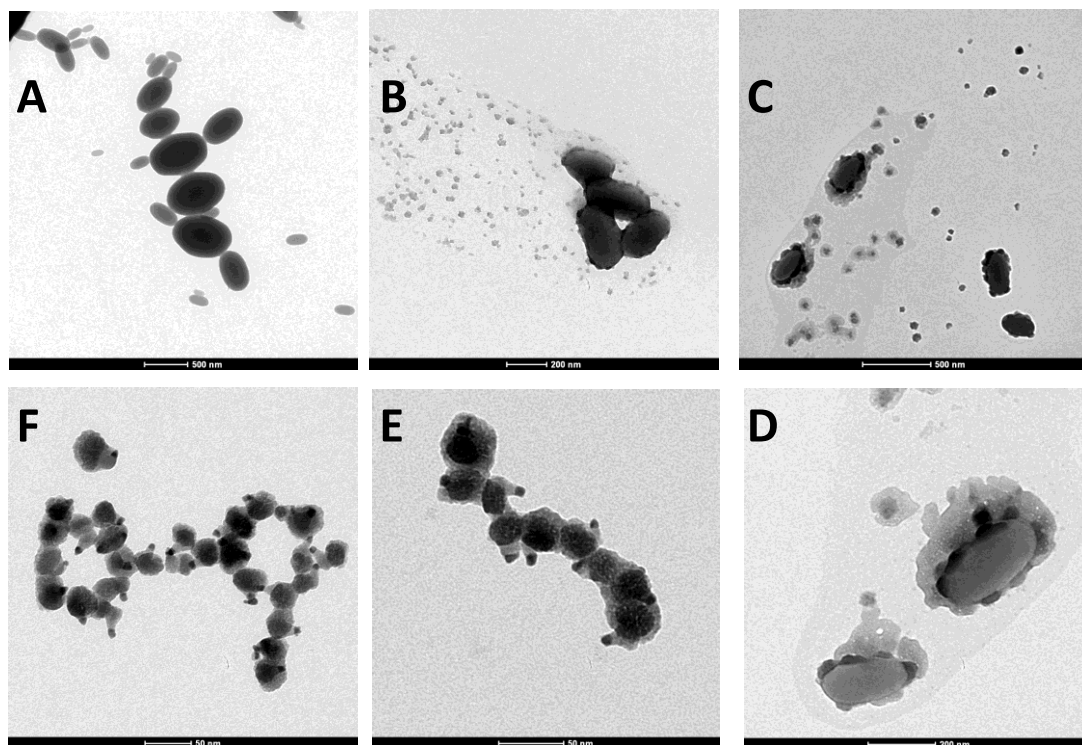
Si nota la formazione di strutture regolari di forma ovale delle dimensioni comprese tra 100 e 300 nm. Queste strutture derivano dalle interazioni non covalenti che coinvolgono le catene peptidiche. Particolare importanza hanno sicuramente le interazioni  $\pi$ - $\pi$  tra i benzili delle catene laterali delle singole “braccia”. Tali interazioni possono portare a varie tipologie di impilamento più o meno ordinate, che nel loro insieme danno vita alle strutture ovoidali appena viste. Data la geometria triangolare della piattaforma, prevedere la disposizione reciproca delle singole molecole di polimero tra di loro è sicuramente più difficile del caso del polimero lineare [22], e per questo immaginiamo che la rappresentazione più realistica sia un intrecciamento random delle catene polipeptidiche in modo

indipendente dal nucleo trigonale a cui appartengono (Figura 4.3.8), pur mantenendo nel loro insieme un impaccamento ordinato.



**Figura 4.3.8:** Possibile modello di disposizione casuale delle catene di PBLG derivanti dalle interazioni deboli che intercorrono tra di esse.

Ottenute le microstrutture, si è provato ad irraggiarle con luce a 365nm, al fine di ricercare cambiamenti strutturali di tali aggregati molecolari. I risultati sono mostrati nella *figura 4.3.9*.



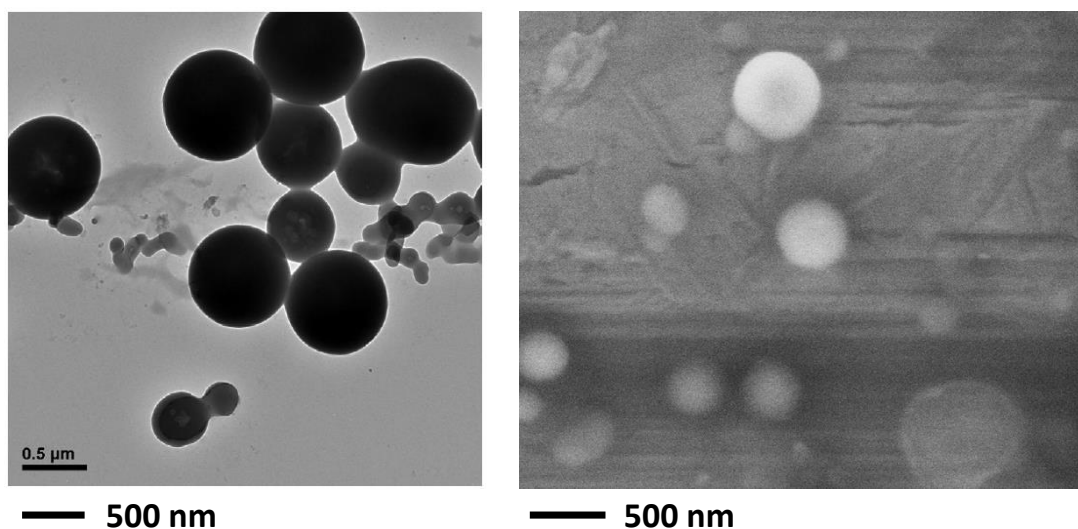
**Figura 4.3.9.** Immagini TEM registrate dopo diversi tempi di irraggiamento (A=0, B=5, C=10, D=10, E=20, F=30 minuti).

Dalle immagini TEM si nota come dopo i primi 5 minuti di irraggiamento a 365nm, le strutture ovali tendono a deformarsi perdendo del materiale (*figura 4.3.9 A*). Dopo 10 minuti è possibile osservare una evidente, seppur parziale, disgregazione delle microstrutture iniziali (B), meglio mostrata nel dettaglio della *figura 4.3.9D*, dove si nota la formazione di strutture sferiche che si staccano dalla struttura ovale. Dopo 20 minuti di irraggiamento (D) le strutture ovali sono diventate un insieme di oggetti sferici ancora connessi tra loro, meglio definite dopo ulteriori 10 minuti di irraggiamento (F). Queste strutture finali sono di tipo sferico e hanno dimensioni molto inferiori a quelle di partenza (circa 30 nm). Complessivamente il processo si può assimilare ad una separazione, da strutture ovali grandi (200-300 nm) a strutture sferiche piccole (20-40 nm). Questo risultato implica che l'isomerizzazione *trans*  $\rightarrow$  *cis* ha portato al ri-arrangiamento delle interazioni tra le catene polimeriche, che si sono riorganizzate generando una nuova morfologia. I primi

tentativi sotto irraggiamento di luce visibile a 450nm per ottenere le strutture di partenza non sono stati per il momento positivi e sono tutt'ora sotto studio. Rimane comunque molto interessante il processo di "scissione", in quanto la singola struttura ovale si ri-arrangia in sfere più piccole.

### 4.3.2 Polimero NON-Azo [23] Tr-PBLG a simmetria $C_3$ .

Al fine di verificare che il ri-arrangiamento delle microstrutture fosse un fenomeno che coinvolgesse l'unità azobenzenica, si è deciso di sintetizzare un polimero con simmetria  $C_3$  non recante le unità di azobenzene. Per farlo si è utilizzato l'iniziatore appositamente sintetizzato [16], chiamato  $\text{Tr}(\text{NH}_2)_3$  data la natura triazinica di partenza e la contemporanea assenza dei gruppi azobenzenici. Con un protocollo sintetico del tutto analogo al precedente, è stato ottenuto il polimero [23] (chiamato semplicemente Tr-PBLG) con peso molecolare di 44.762 (dpi=1.47), anch'esso caratterizzato dalle strutture  $\alpha$ -elicoidali e da circa 56 unità monomeriche per "braccio". Con lo stesso approccio della dialisi, si è quindi promosso il self-assembly che ha generato questa volta forme sferiche, (figura 4.3.10).

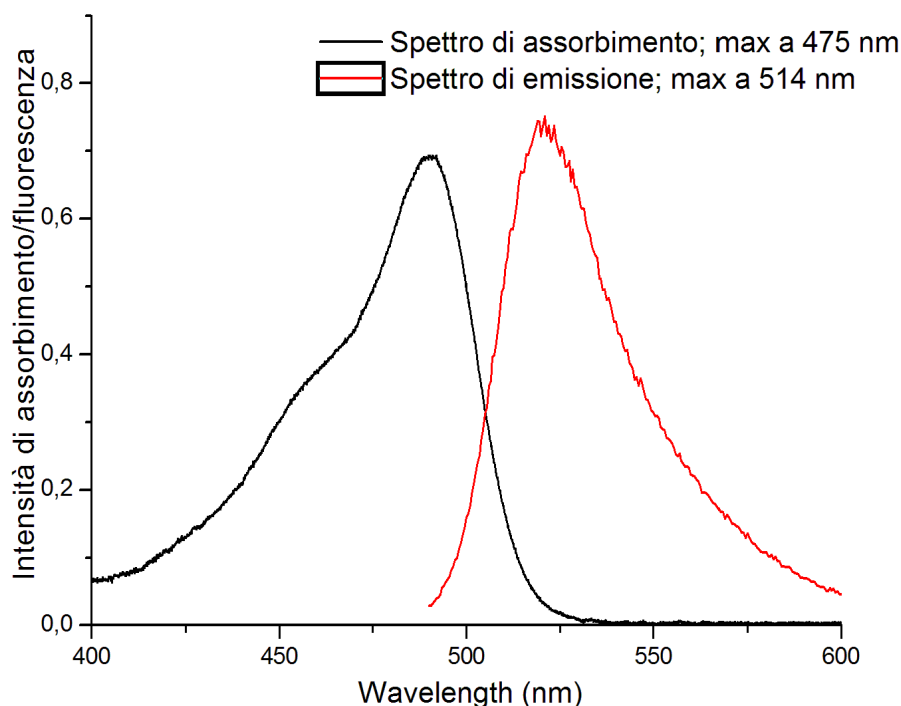


**Figura 4.3.10:** Immagini TEM (sinistra) e SEM (destra) delle strutture supramolecolari ottenute dal "self-assembly" del polimero [23] Tr-PBLG NON fotosensibile a simmetria  $C_3$

La sospensione colloidale è stata irraggiata a 365nm per differenti tempi, raggiungendo anche i 120 minuti. Le vescicole sono rimaste tali, senza subire nessuna variazione strutturale. Pertanto, con riferimento al polimero precedente [24], la transizione morfologica è da attribuirsi proprio al processo di isomerizzazione delle unità azobenzeniche.

### 4.3.3 Incapsulamento di un fluoroforo in [23] Tr-PBLG

Vista la stabilità alla radiazione dimostrata da queste ultime vescicole (che non recano l'unità azo) si è deciso di indagare questo aspetto, incapsulando una specie fluorescente al loro interno. In tal modo si mira a sfruttare il rilascio di fluoroforo nel caso di rottura di queste strutture per mezzo di alcuni stimoli/variazioni ambientali. Tra i vari cromofori abbiamo utilizzato la 5(6)-carbossifluoresceina, che presenta uno spettro di assorbimento/emissione come riportato in *figura 4.3.11*, con picco per l'assorbimento a 475nm e 520nm per l'emissione.



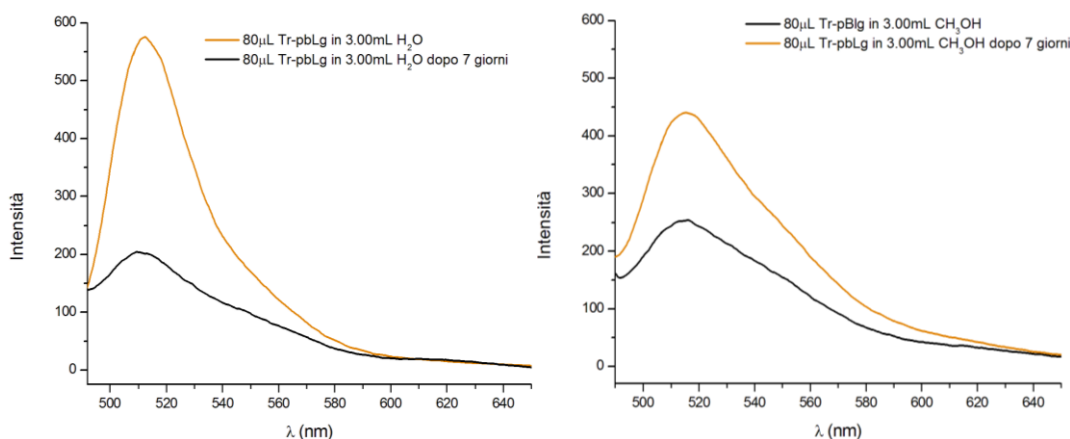
**Figura 4.3.11.** Spettri di assorbimento (spettrofotometro-curva nera) ed emissione (spettrofluorimetro  $\lambda_{exc} = 475$  nm curva rossa) di una soluzione 50  $\mu$ M di 5(6)-carbossifluoresceina in acqua a pH neutro.

Pertanto, si è eseguito il self-assembly del polimero [23] in presenza del fluoroforo, in modo che questo venisse inglobato all'interno delle vescicole in fase di formazione. Sperimentalmente si è preparata una soluzione di 10mg di polimero [23] in 5 ml di miscela 7:3 THF/DMF e a questa si sono aggiunti 0.200ml di una soluzione di carbossifluoresceina sempre in THF/DMF 7:3 (15mg/5ml). Il tutto è stato posto a dializzare contro acqua per 24h, notando che la soluzione all'interno della sacca da dialisi da un colore giallo acceso passa gradualmente ad un rosa lattiginoso. Infatti tramite il processo di dialisi, la carbossifluoresceina che non si è introdotta nella cavità delle vescicole passa all'esterno della sacca da dialisi. La soluzione colloidale ottenuta, è stata ulteriormente purificata dalla eventuale carbossifluoresceina rimasta in soluzione, tramite GPC (gel permeation chromatography) eluendo H<sub>2</sub>O mq. Pertanto alla fine dei processi di purificazione è stata ottenuta una sospensione colloidale acquosa di colore rosa. Tale sospensione è stata osservata al TEM per verificare la forma sferica delle vescicole (con esito positivo), per poi registrarne lo spettro di fluorescenza.

Si è quindi proceduto con l'aggiunta a tale soluzione di detergenti (0.200ml Triton X-100 al 10%) o solventi (MeOH, DMF) per promuovere il collasso o la solubilizzazione del polimero, in modo da indurre la liberazione di carbossifluoresceina dalle strutture vescicolari. Sorprendentemente, non è stato possibile realizzare questo obiettivo, anche provando ad utilizzare gli stessi solventi puri e sottoponendo al sonificatore le soluzioni. La struttura supramolecolare posseduta dal campione infatti, è risultata molto stabile e non si è potuto rivelare un aumento di emissione come sperato. Le soluzioni contenenti le vescicole riempite con la carbossifluoresceina sono state quindi lasciate a riposo a temperatura ambiente per 7 giorni, prima di ripetere nuovamente le misure di fluorescenza. Con grande sorpresa, queste hanno mostrato un notevole aumento nel valore di emissione riconducibile alla carbossifluoresceina (banda centrata a  $\lambda=514\text{nm}$  data una eccitazione a  $\lambda=475\text{nm}$ ). In *figura 4.3.11* sono riportati gli esempi in H<sub>2</sub>O e MeOH come solventi per le vescicole, facendo presente che per poter registrare gli spettri di emissione dopo una settimana senza saturare il segnale o diluire le soluzioni, si è dovuto ridurre la larghezza della fenditura al

rivelatore da 7.0 a 3.0nm. Tali soluzioni sono state preparate diluendo 80 $\mu$ L di sospensione acquosa del polimero self-assemblato purificato mediante GPC con 3.0ml di solvente. La concentrazione del polimero non è quindi nota, il che non rappresenta un grave inconveniente visti i fini qualitativi di queste prove.

Da queste misure di fluorescenza si nota inoltre come la carbossifluoresceina quando è contenuta nelle vescicole manifesti un effetto di “quench”, tipico di sistemi in cui il fluoroforo è confinato e in alta concentrazione (*Figura 4.3.11*).



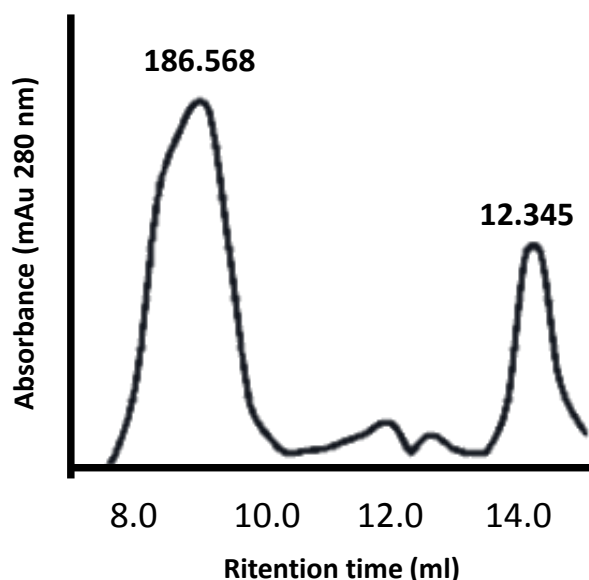
**Figura 4.3.11:** Spettri di fluorescenza in H<sub>2</sub>O (a sinistra) e in MeOH (a destra) del polimero [23] self-assemblato in presenza di 5(6)-carbossifluoresceina, a tempo 0 (in nero) e dopo una settimana di riposo (arancio).

La soluzione acquosa a riposo da 7 giorni è stata quindi nuovamente osservata al TEM, confermando ancora la presenza di strutture vescicolari. Probabilmente il processo di rilascio della carbossifluoresceina avviene a seguito di vari equilibri dinamici tra le singole unità polimeriche che nell’associarsi e dissociarsi creano piccoli spazi nella membrana della vescicola consentendo il rilascio della carbossifluoresceina in soluzione. Pertanto, questo può essere visto come un sistema in grado di rilasciare il contenuto lentamente, proprietà interessante per applicazioni che richiedono un rilascio, di molecole o farmaci, controllato nel tempo.

#### 4.3.4 Polimero [25] Tr-PBLG ad alto Peso Molecolare.

La stabilità riscontrata in queste microstrutture è sicuramente dovuta alla forza delle interazioni intermolecolari tra le catene polipeptidiche. Si è immaginato quindi che l'aumento del peso molecolare possa incrementare la stabilità delle vescicole stesse. L'idea di creare polimeri a base di PBLG con pesi molecolari superiori rispetto a quelli ottenuti finora, è stata sviluppata utilizzando l'azo-iniziatore  $\text{Tr}(\text{Azo})_3$ .

La procedura sintetica ha seguito gli stessi step fondamentali delle precedenti polimerizzazioni, aumentando questa volta il rapporto monomero/iniziatore a 1000:1. Inoltre, per aumentare la solubilità del prodotto si sono sciolti sia il monomero NCA che l'azo-iniziatore[20] in dimetilformammide (DMF), termostatando la reazione a 30°C per 6 giorni. Come sempre durante questo periodo si è osservato un cambio della viscosità della miscela, senza comunque osservare formazione di precipitati. Al termine della reazione, in prodotto è stato precipitato mediante l'aggiunta di una abbondante quantità di metanolo.

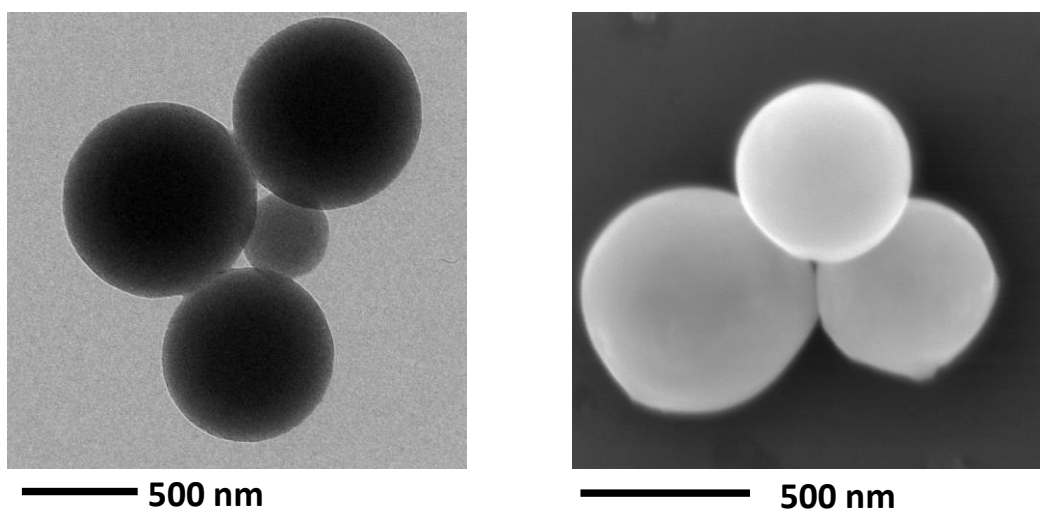


**Figura 4.3.12:** Profilo SEC del polimero  $\text{Tr}(\text{Azo})_3$ -PBLG [25] ad alto peso molecolare, che fornisce per il picco principale un peso molecolare medio numerico di 186568 con polidispersione pari a 1.66.

Il peso molecolare aspettato per una conversione del 100 % dell'NCA era di circa 267.000, mentre il risultato ottenuto mostra un PM di 186.500 (dpi=1.66). Questo

significa che mediamente ogni braccio del polimero contiene 235 unità di benzil glutammato, che sono il quadruplo delle 58 presenti nel polimero analogo più corto [24] e delle 56 presenti nel polimero non-azo [23].

Il composto ottenuto è stato convertito in microstrutture sferiche nelle stesse condizioni del suo analogo a più basso peso molecolare, osservate con le tecniche di microscopia elettronica TEM e SEM (Figura 4.3.13).



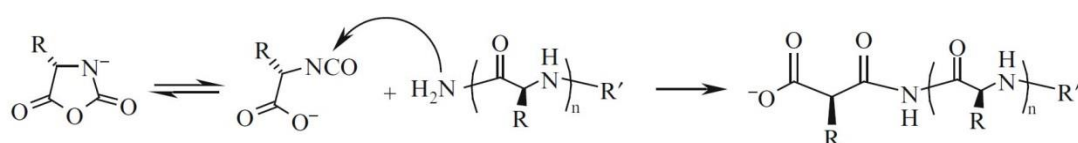
**Figura 4.3.13:** Immagini TEM (sinistra) e SEM (destra) delle strutture supramolecolari ottenute dal “self-assembly” del polimero  $\text{Tr}(\text{Azo})_3\text{-PBLG}$  [25] ad alto peso molecolare a simmetria  $C_3$

L’irraggiamento di tali microstrutture con  $\lambda$  365nm, pur essendo composte di polimero fotosensibile (l’iniziatore presenta 3 gruppi azobenzenici), non ha prodotto nessuna transizione morfologica. E’ doveroso il confronto con il polimero gemello [24] che invece se irraggiato va incontro ad un processo di scissione. La perdita del carattere foto-reattivo da parte del campione [25] è sicuramente legata all’aumento del peso molecolare, che quadruplica passando da 44700 a 186500. L’aumento quindi di “compattezza” e stabilità (anche a stimoli luminosi questa volta) è da attribuirsi al rafforzamento delle interazioni tra le braccia peptidiche, come supposto in precedenza. Bisogna comunque contare che aumentando il PM, diminuisce anche la densità degli snodi fotosensibili il che contribuisce al crollo della risposta agli stimoli luminosi.



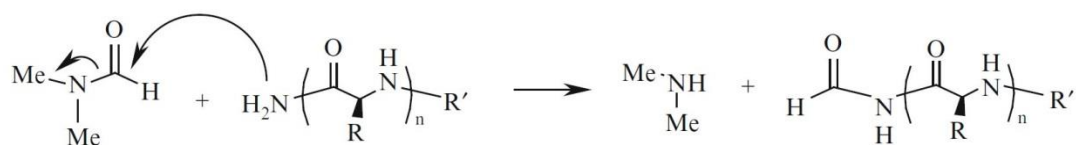
### 4.3.5 Reazioni secondarie nella polimerizzazione della $\gamma$ -benzil-L-glutammato NCA.

Il cromatogramma SEC in *figura 4.1.12* fornisce l'indice di polidispersione più alto ottenuto in questo lavoro di tesi, e inoltre dal profilo si vede che esistono altre distribuzioni a più basso peso molecolare, una delle quali abbastanza intensa a PM di 12.000 circa. Tali osservazioni ci danno lo spunto per parlare delle reazioni secondarie che incombono durante il processo di polimerizzazione del monomero NCA. Come accennato nel capitolo introduttivo 1.6, vi sono due meccanismi di polimerizzazione possibili: NAM (normal amine mechanism) e AMM (activated monomer mechanism). Nel nostro caso, per la polimerizzazione si vuole sfruttare il meccanismo NAM che coinvolge i nostri iniziatori amminici visti finora. Il problema è che queste due reazioni complementari tra loro per l'accrescimento della catena, risultano essere l'una la principale reazione collaterale dell'altra<sup>(24)</sup>. Per esempio se l'ammina terminale del PBLG formatosi dal meccanismo NAM partita grazie ad un nostro iniziatore, al posto di agire come nucleofilo su una molecola di monomero fungesse da base strappando invece un protone all'azoto eterociclico, l'accrescimento si fermerebbe promuovendo la nascita di una nuova catena polipeptidica che non contiene l'iniziatore e che accresce secondo il meccanismo AMM (si forma l'anione NCA). Ciò fa aumentare l'indice di polidispersione, e rende impossibile il controllo sulla natura dei gruppi terminali nel prodotto (R-NH<sub>2</sub> o R-NCA). L'utilizzo quindi di basi per mantenere attiva l'ammina terminale dell'iniziatore/polimero non è possibile, in quanto promuoverebbe il meccanismo AMM (non desiderato), sempre che la base non sia abbastanza nucleofila da fungere lei stessa da iniziatore. Oltretutto il meccanismo AMM cela una pericolosa reazione di terminazione base catalizzata, illustrata in *figura 4.3.14*<sup>(24)</sup>.



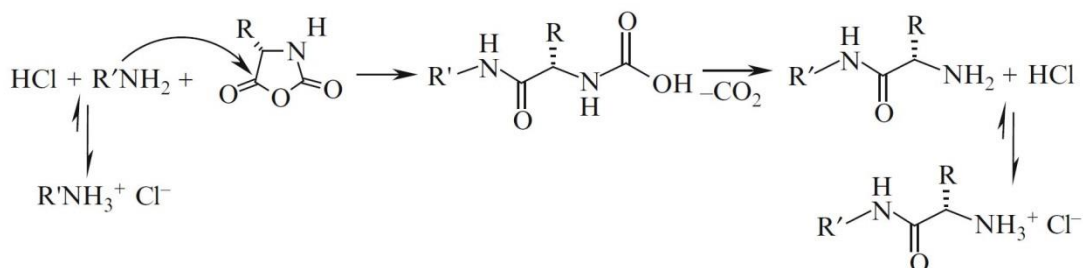
**Figura 4.3.14:** Terminazione di catena polipeptidica mediante reazione con anione NCA.

In questo caso l'anione NCA mediante un riarrangiamento interno, forma un isocianato che reagendo con un'ammina libera terminale, inserisce in coda al polimero un gruppo carbossilato inattivo ai fini della polimerizzazione. Pertanto la reazione appena vista è a tutti gli effetti una reazione di terminazione. Altra reazione di terminazione può incombere se si utilizza come solvente di reazione dimetilformamide (DMF), come mostrato in *figura 4.3.15*<sup>(24)</sup>. In questo caso l'ammina terminale del polimero in accrescimento potrebbe portare un attacco nucleofilo al carbonile della DMF, portando all'inserimento di un gruppo formilico terminale.



**Figura 4.3.15:** Terminazione di catena polipeptidica mediante reazione con solvente DMF.

Recenti studi<sup>(24)</sup> hanno dimostrato come al diminuire della temperatura di reazione la presenza di questi "end- groups" indesiderati (carbossilato e formile) cali notevolmente, motivo per cui nella sintesi la prima fase di polimerizzazione viene eseguita in bagno a ghiaccio. Una possibile soluzione sarebbe l'utilizzo dell'iniziatore in forma cloridrata, il che porterebbe a una netta repressione della reazione di formazione dell'anione NCA, fonte di reazioni secondarie e di terminazione che fanno aumentare l'indice di polidispersione. Per contro però l'ammina dell'iniziatore sarebbe fortemente de-attivata, e per questo la polimerizzazione procederebbe con tempi molto lunghi e rese basse in conversione di monomero (vedi *figura 4.3.16*)<sup>(24)</sup>.

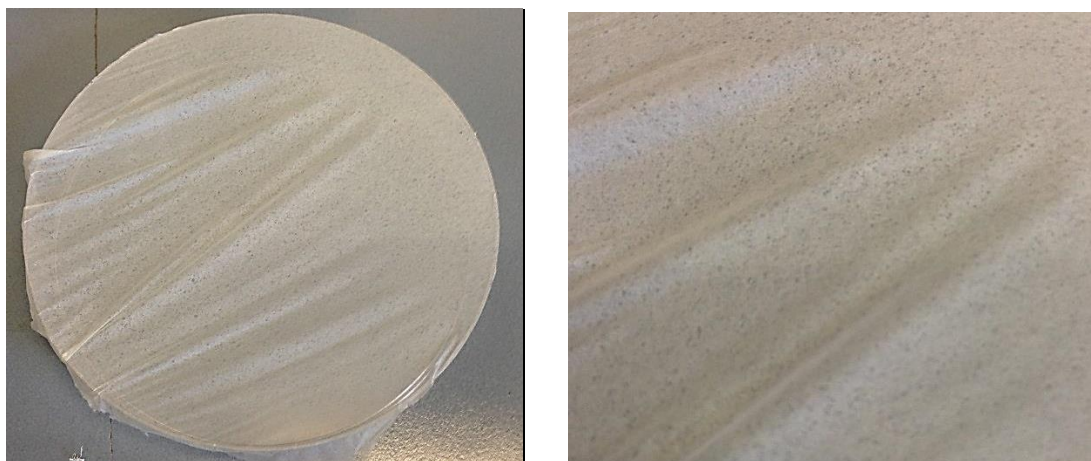


**Figura 4.3.16:** Polimerizzazione di NCA in presenza di iniziatore amminico cloridrato.

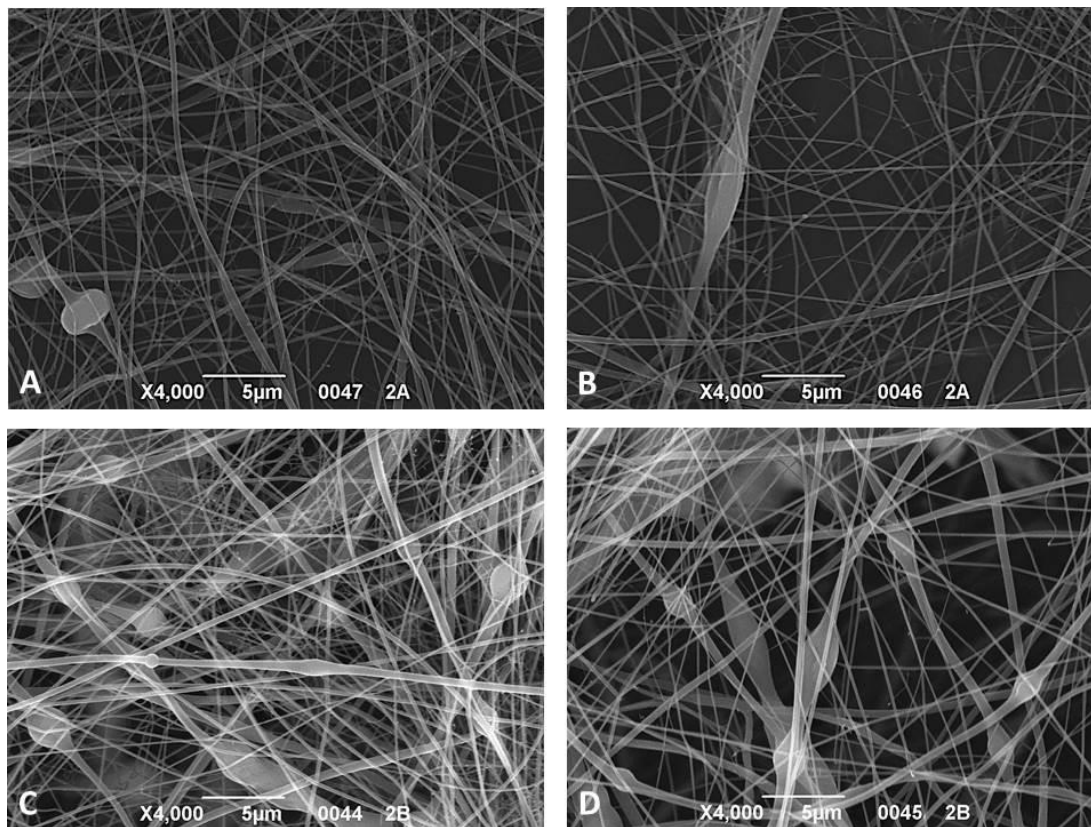
### 4.3.6 Electrospinning per la formazione di fibre.

Scoperta la proprietà di forte associazione esaltata dall'alto peso molecolare nel campione  $\text{Tr}(\text{Azo})_3\text{-PBLG}$  [25], si è deciso di fruttarla per tentare di ottenere fibre attraverso il processo di "elettrofilatura" (detta anche electrospinning)<sup>(39)</sup>. Tale tecnica, sfruttata in ambito prettamente polimerico, impiega forze elettrostatiche per produrre fibre di dimensioni sub-millimetriche (dai 2nm a qualche micrometro) per stretching uniassiale di una soluzione o un fuso. Ciò avviene tramite l'applicazione di un campo elettrico (10-20KV) tra la punta di un estrusore (ago di una siringa) ed un collettore, che nel nostro caso è una piastra metallica. Questo sistema consente di estrarre dalla punta dell'ago polimeri sciolti (eventualmente particolati sospesi) o fusi polimerici caricati all'interno di una siringa che, tramite una pompa volumetrica (*syringe pump*), escono dall' ago formando un getto di fluido. Successivamente il getto così formato viene stirato e assottigliato fino a formare una fibra omogenea, questo a causa dell'evaporazione del solvente e della repulsione tra le cariche. Le fibre così formate si depositano su di un opportuno collettore. Si ricorda che la formazione di un getto di fluido e non di un distacco tipo "spray" è dovuto alla elevata coesione molecolare posseduta dal campione.

Operativamente, il nostro polimero [25] è stato disciolto ad una concentrazione del 16% in peso in acido dicloroacetico per dare una soluzione omogenea ad alta viscosità. Il risultato di questo processo è mostrato in foto *figura 4.3.17*.



**Figura 4.3.17:** Immagini del prodotto ottenuto per elettrofilatura del polimero ad alto PM [25]  
 $\text{Tr}(\text{Azo})_3\text{-PBLG}$  (0.150g/0.600ml in  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ ).



**Figura 4.3.18:** Immagini SEM del prodotto di elettrofilatura per il polimero ad alto PM [25]  $\text{Tr}(\text{Azo})_3\text{-PBLG}$  (0.150g/0.600ml in  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ ), recante simmetria  $C_3$ .

Tali fibre mostrano un diametro che spazia dai 20nm ai 100nm, con dei nodi che raggiungono anche i 350 nm probabilmente dovuti a zone in cui il solvente è rimasto intrappolato all'interno delle fibre. In particolare le immagini SEM riportate non mostrano cambiamenti morfologici tra prima e dopo irraggiamento a 360nm, pur aumentando i tempi di esposizione (A→C 2min ; B→ D 8min) del campione. Questo può essere dovuto alla bassa libertà di movimento spaziale delle singole catene allo stato solido, dove l'impaccamento gioca un ruolo fondamentale. Sono comunque in corso di studio variazioni nella procedura di preparazione dei campioni lavorati con l'elettrospinning. Comunque sia , è da notare che non esistono esempi in letteratura di elettrospinning su sistemi a base di poli benzyl glutammato, il che rende interessante questo campo di ricerca.

## 5. CONCLUSIONI.

---

In conclusione i punti rilevanti di questo elaborato di Tesi sono che:

1. Il *para*-AzoDbg si è dimostrato un ottimo candidato per le applicazioni supramolecolari che riguardano la formazione di microstrutture in grado di riarrangiare la propria morfologia a seguito dell'assorbimento di luce a lunghezze d'onda specifiche. Il risultato rilevante è che il cambio morfologico tra le microstrutture vescicola-"spugna"-fibra è un processo reversibile che dipende dalla radiazione incidente e dal tempo di irraggiamento.
2. L'introduzione di sonde azobenzeniche in polipeptidi (PBLG) ha mostrato la possibilità di generare sistemi ben organizzati in grado ancora una volta di rispondere agli stimoli delle radiazioni. In particolare passando da polimeri lineari (simmetria  $C_2$ ) a polimeri ramificati (simmetrie  $C_3$ ) si sono potuti osservare notevoli diversità nei risultati ottenuti dall'irraggiamento che porta all'isomerizzazioni dei gruppi azobenzenici, come il collasso o la scissione delle vescicole. Ciò si riflette ovviamente nelle possibili applicazioni svolte da questi diversi prodotti. È stato anche possibile utilizzare la tecnica dell'elettrofilatura per generare fibre macroscopiche delle quali si stanno valutando le proprietà di riarrangiamento foto indotto.



## 6. BIBLIOGRAFIA

---

1. J.M. Lehn, From Molecular to Supramolecular Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (1995).
2. K.L. Prime, G.M. Whitesides, *Science* **24** (1991) 1164-1167.
3. A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Langmuir* **10** (1994) 1498-1511.
4. S. Guldin, Self-Assembly of Soft Matter. In: Inorganic Nanoarchitectures by Organic Self-Assembly. Springer International Publishing, (2013) 1-17.
5. M. Mba, A. Moretto, L. Armelao, M. Crisma, C. Toniolo, M. Maggini, *Chem. Eur. J.* **17** (2011) 2044-2047.
6. P. Fats, E. Longo, F. Rastrelli, M. Crisma, C. Toniolo, A. I. Jimnez, C. Cativiela, A. Moretto, *Chem. Eur. J.* **17** (2011) 12606-12611.
7. J. W. Steed, J.L. Atwood, Supramolecular chemistry. John Wiley & Sons (2009).
8. P. Yin, H.M. Choi, C.R. Calvert, N.A. Pierce, *Nature*, **451** (2008) 318-322.
9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, **9**, (1970) 3471.
10. C. Toniolo, E. Benedetti, *Trends Biochem. Sci.* **16** (1991) 350.
11. E. Mitscherlich, *Annalen der Pharmazie* (1834), 311-314.
12. F. Würthner, J. Rebek Jr., *Angewandte Chemie International Edition in English* **34** (1995) 446-448.
13. M. Baroncini, S. Silvi, M. Venturi, A. Credi, *Chem. Eur. J.* **16** (2010) 11580-11587.
14. G. Sudesh Kumar, D. C. Neckers, *Chem. Rev.* **89** (1989) 1915-1925.
15. E. Merino, *Chem. Soc. Rev.* (2011), DOI 10.1039/c0cs00183j.
16. Autorenkollektiv, *Organikum*, Wiley-vch, Weinheim, 2001.
17. Y.-K. Lim, K.-S. Lee, C.-G. Cho, *Organic Letters* **5** (2003) 979-982.
18. H. Rau, in *Photoreactive Organic Thin Films*, Academic Press, 2002, 3-47.
19. J.D. Han, J.X. Ding, Z.C. Wang, S.F. Yan, X. Zhuang, X.S. Chen, J.B. Yin, *Sci. China. Chem.* **56** (2013) 729-738.
20. T.J. Deming, *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 858-875.
21. W. Tansey, S. Ke, X.Y. Cao, M.J. Pasuelo, S. Wallace, C. Li, *J Control. Release* **94** (2004) 94, 39-51.

22. K.Y. Chang, L.W. Cheng, G.H. Ho, Y.P. Huang, Y.D. Lee, *Acta Biomater*, **5** (2009) 1937-1947.
23. L. Dekie, V. Toncheva, P. Dubruel, EH. Schacht, L. Barrett, LW. Seymour, *J. Control. Release* **65** (2000) 187-202.
24. J. Cheng, J. Deming, *Top. Curr. Chem* **310** (2011) 1-26.
25. J. Juodaityte, N. Sewald, *J. Biochem.* **112** (2004) 127-138.
26. B. P. Bandgar, S. N. Chavarea, S. S. Pandit, *J.Chin.Chem.Soc-Taip* **52** (2005) 125-128.
27. M. Elbing, "Functional molecular building blocks", (2004).
28. H. Zollinger, *Diazo Chemistry I. Aromatic and Heteroaromatic Compounds*, Vch, New York (1994).
29. S.B. Park, R.F. Standaert, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 6557-6560.
30. P.F. Santos, P.S. Almeida, A.M. Lobo, S. Prabhakar, *Heterocycles* **55** (2001) 1029-1043.
31. I.D. Entwistle, T. Gilkerson, R.A. Johnstone, R.P. Telford, *Tetrahedron* **34** (1978) 213-215.
32. M.H. Davey, V.Y. Lee, R.D. Miller, T.J. Marks, *J. Org. Chem.* **64** (1999) 4976-4979.
33. L. Novák, M. Hanania, P. Kovács, J. Rohály, *Heterocycles* **45** (1997) 2331-2347.
34. B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int.* **17** (1978) 522-524.
35. M. W. Jones, G. Mantovani, C. A. Blindauer, S. M. Ryan, X. Wang, D. J. Brayden, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 7406-7413.
36. K. L. Killops, L. M. Campos, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 5062-5064.
37. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2004.
38. C. L. M. Goodyer, E. C. Chinje, M. Jaffar, I. J. Stratford, M. D. Threadgill, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003), 4189-206.
39. Z. M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.* **63** (2003) 2223-2253.



## Ringraziamenti

---

*Ora che ho finito questo mio internato di tesi, e si chiude un'importante capitolo della mia vita è doveroso ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuto in tutti questi anni. Un ringraziamento innanzitutto ai miei genitori che mi hanno dato questa opportunità. Ringrazio tutta la mia famiglia e Arianna, che ha sempre creduto in me e nelle mie capacità.*

*Un ringraziamento alla prof.ssa Alberta Ferrarini per i consigli e la disponibilità.*

*Ringrazio Ale, non solo perché relatore del mio lavoro di Tesi e per l'aiuto pratico in laboratorio, ma soprattutto per il lato umano dimostrato, la disponibilità, la flessibilità e per il clima frizzante che sa infondere in laboratorio. Le giornate anche se talvolta cariche di lavoro, sono passate in maniera piacevole e per questo avrò sempre un bel ricordo di questa esperienza.*

*Un grazie a tutti i compagni di laboratorio, laureandi e dottorandi con qui ho condiviso gran parte del mio tempo in quest'ultimo anno: a Daniela per l'aiuto gli utili consigli e la modestia nel darli; ad Elena per la pazienza e la disponibilità in laboratorio; e ad Andrea fonte di risate, goleador e importanti news dal mondo. Un grazie a Omar, Davide, Marion, Dario, Daniele e Andrea per i momenti spensierati e non passati insieme in laboratorio e in ufficio, e un augurio per la loro prossima Laurea.*

*Per le bellissime giornate e poche ma intense serate, per i "full immersion" di studio, per avermi fatto divertire ed essermi stati amici ringrazio i miei compagni di corso Marco, Giovanni e Claudio e auguro loro tutta la gioia e la fortuna possibile per la vita.*

*Per ultimi, ma non per importanza, ringrazio tutti gli amici che negli anni mi sono stati vicini, anche se ora lontani, perché è anche merito loro se oggi sono arrivato fin qui.*