UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

Tesi di Laurea

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI UN IBRIDO CELLULOSA NANOCRISTALLINA-PORFIRINA

Relatore: Prof. Tommaso Carofiglio
Controrelatore: Dr. Marco Ruzzi

LAUREANDO: Andrea Sartorelli

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

Lista delle abbreviazioni 6

1. INTRODUZIONE 8

CELLULOSA 10

1.1 Struttura chimica della cellulosa 10

1.2 Struttura cristallina e polimorfismo della cellulosa 11

1.3 Struttura gerarchica e morfologia delle fibre di cellulosa 12

CELLULOSA NANOCRISTALLINA 13

1.4 Aspetti generali della cellulosa nanocristallina 13

1.5 Produzione della cellulosa nanocristallina 14

1.6 Morfologia e auto-organizzazione della cellulosa nanocristallina 15

1.7 Proprietà meccaniche della cellulosa nanocristallina 17

1.8 Modificazioni chimiche della cellulosa nanocristallina 18

PORFIRINE 21

1.9 Generalità sulle porfirine 21

1.10 Complessi metallici delle porfirine 22

1.11 Spettri elettronici 23

1.12 Porfirine sintetiche 25

TERAPIA FOTODINAMICA 26

1.13 Introduzione alla fototerapia 26

1.14 Transizioni elettroniche 27

1.15 Trasferimento intermolecolare dell'eccitazione elettronica 28

1.16 Ossigeno di singoletto 29

1.17 Sensibilizzanti 32

1.18 Meccanismi dell'azione fotodinamica 32

2 SCOPO DEL LAVORO DI TESI 35

3 SINTESI E STRATEGIE DI FUNZIONALIZZAZIONE ADOTTATE 37

3.1 Cellulosa nanocristallina (NCC) 38

3.2 Cellulosa nanocristallina carbossilata (NCC-COOH) 40

3.3 Ammino-tetrafenilporfirina trisolfonata ($TPPS_3$-NH_2) 41

3.4 Ibrido cellulosa nanocristallina-tetrafenilporfirina trisolfonata (NCC-$TPPS_3$) 45

3.5 Metallazione con $Zn(OAc)_2$ dell'Ibrido cellulosa nanocristallina tetrafenilporfirina trisolfonata (NCC-TPP(Zn)S_3) 46

4 RISULTATI E DISCUSSIONE 47

4.1 Caratterizzazione della NCC 48

4.2 Caratterizzazione della NCC-COOH 53
4.3 Caratterizzazione della NCC-$TPPS_3$ 58
4.4 Caratterizzazione della NCC-TPP(Zn)S_3 69
4.5 Determinazione dell'ossigeno di singoletto 72
5 CONCLUSIONI 77
5.1 Sviluppi futuri 80
5.2 Pubblicazione 81
6 PARTE SPERIMENTALE 84
6.1 Solventi e reagenti 85
6.2 Strumentazione utilizzata 88
6.3 Procedure di sintesi 89
6.4 Procedure strumentali 93
7 APPENDICE: SPETTRI DI MASSA MALDI 95
BIBLIOGRAFIA 100
Ringraziamenti 105

Riassunto

Durante il mio lavoro di tesi ho preparato la cellulosa nanocristallina (NCC) ed ho funzionalizzato la superficie di questa con derivati porfirinici. Tra le varie strategie di funzionalizzazione prese in considerazione, la formazione di un legame ammidico tra la nanocellulosa carbossilata (NCC-COOH) e un'ammino porfirina trisolfonata ($TPPS_3$-NH_2) si è rivelata la via più efficiente. Tale ibrido "NCC-$TPPS_3$" è stato caratterizzato con varie tecniche strumentali (UV-Vis, fluorescenza, FT-IR, termogravimetrica, TEM, DLS, potenziale-Z); è stata verificata la capacità di tale materiale di generare ossigeno di singoletto in condizioni di illuminazione e come questa viene influenzata dalla presenza di β-ciclodestrina, una molecola nota per la sua capacità di formare complessi di inclusione con le porfirine idrosolubili. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il NCC-$TPPS_3$ è potenzialmente impiegabile nella terapia fotodinamica.

Abstract

During my thesis I prepared the nanocrystalline cellulose (NCC) and functionalized its surface with porphyrin derivatives. Among the different functionalization strategies I have adopted, the formation of an amide bond between nanocellulose carboxylated (NCC-COOH) and an amino trisulfonated porphyrin ($TPPS_3$-NH_2) has proved to be the most successful way. This hybrid material "NCC-$TPPS_3$" was characterized with various instrumental techniques (UV-Vis, fluorescence, FT-IR, thermogravimetry, TEM, DLS, Z-potential). In addition, I also verified its capacity to generate singlet oxygen upon illumination and how this property is affected by the presence of β-cyclodextrin, a molecule able to form host-guest complexes with water-soluble porphyrins. The obtained results support a potential use of NCC-$TPPS_3$ as sensitizer in photodynamic therapy.

Lista delle abbreviazioni

NCC	cellulosa nanocristallina
NCC-COOH	cellulosa nanocristallina carbossilata
$TPPS_3$-NH_2	amino trifenil porfirina trisolfonata
UV-Vis	spettroscopia ultravioletta/visibile
FT-IR	spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier
TEM	microscopia elettronica a trasmissione
DLS	scattering dinamico della luce
Z-Potential	potenziale zeta
NFC	cellulosa nanofibrillata
TPP	trifenil porfirina
TMβCD	2,3,6-tri-o-metil-β-ciclodestrina
TC	complessi terminali
DP	grado di polimerizzazione
BNC	nanocellulosa batterica
PDT	terapia fotodinamica
MALDI	desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice
APS	ammonio persolfato
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1ossile
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimmide
NHS	N-idrossisuccinimmide

DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone
TFA	acido trifluoroacetico
MES	2-(N-morfolino) acido etansolfonico
D.O.	grado di ossidazione
PM	peso molecolare
ABDA	9,10-antracene-di(metilene) acido dimalonico
NMR	spettroscopia di risonanza magnetica nucleare
TOF	frequenza di turnover

1. INTRODUZIONE

La cellulosa è il biopolimero presente in maggiore quantità sulla terra. Riconosciuta come sostanza dal chimico francese Anselme Payen nel 1838, la cellulosa divenne fin da subito un precursore per varie modificazioni chimiche. Lo studio della sua struttura chimica e delle sue caratteristiche chimico-fisiche, ha aperto la strada al suo utilizzo in un sempre più ampio spettro di applicazioni, come ad esempio il settore alimentare, la produzione della carta, il settore farmaceutico e dei biomateriali.[1] Nel 1950 il professore Ranby Bengt pubblicò i primi lavori sperimentali inerenti alla produzione di sospensioni colloidali di cellulosa per degradazione con acido solforico di fibre di cellulosa.[2,3,4] Questo studio pioneristico assieme ad altri lavori successivi portò alla scoperta di un nuovo nanomateriale detto, cellulosa nanocristallina (nanocrystalline cellulose, NCC).[5,6,7,8]

Le straordinarie proprietà meccaniche, la rinnovabilità e sostenibilità del materiale, unite all'ampia possibilità di modificazione chimica hanno attirato negli ultimi anni l'interesse della comunità scientifica. In letteratura molteplici sono gli esempi di applicazione della cellulosa nanocristallina, nel campo della catalisi,[9] dei materiali elettronici e magnetici,[10] della veicolazione di farmaci,[11] della medicina rigenerativa[12] e terapia fotodinamica.[13] In particolare nella terapia fotodinamica recenti pubblicazioni descrivono la sintesi di strutture nanocellulosiche funzionalizzate con porfirine per l'inattivazione batterica promossa con luce visibile.[14]

I successivi paragrafi forniranno al lettore il "background" necessario per meglio comprendere questo lavoro di tesi. In particolare verrà inizialmente descritta la cellulosa, in quanto materiale di partenza impiegato per la sintesi della cellulosa nanocristallina. Successivamente verranno delineate le proprietà chimico-fisiche e le vie di funzionalizzazione della cellulosa nanocristallina. Infine saranno richiamate brevemente le proprietà delle porfirine che conferiscono al materiale un uso funzionale, per esempio, nel campo della terapia fotodinamica. Quest'ultimo argomento verrà brevemente esaminato enfatizzando le proprietà chimiche piuttosto di quelle biologiche.

CELLULOSA

1.1 Struttura chimica della cellulosa

La cellulosa è un omopolimero esistente in natura sotto forma di lunghe catene ad alto peso molecolare, costituite dalla ripetizione di anelli D-glucopiranosici (molecole di glucosio) legati tra loro mediante legame glicosidico β-1,4 [figura 1]. Ogni catena è caratterizzata dalla presenza di un'estremità non riducente (in cui il carbonio C1 è coinvolto nel legame glicosidico) e un'estremità riducente (dove C1 lega un gruppo idrossilico, permettendo così l'apertura dell'anello grlucopiranosico). Il numero di unità ripetitive che compongono la catena può arrivare fino a 20000. Talvolta si considera come unità costitutiva del polimero il cellobiosio ovvero due anelli glucopiranosici.

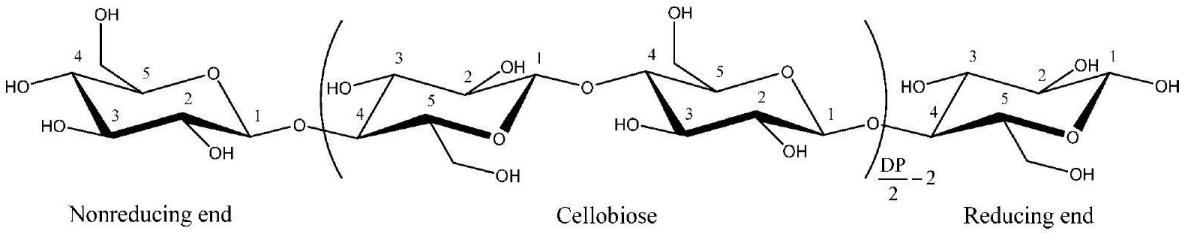


Figura 1: Struttura chimica della cellulosa

Gli anelli glucopiranosici adottano una conformazione a sedia e sono ruotati di 180° uno rispetto all'altro. I tre gruppi idrossilici di ogni anello sono in posizione equatoriale rispetto al piano medio dell'unità glicosidica mentre gli atomi di idrogeno sono in posizione assiale. La presenza dei gruppi idrossilici, oltre a fornire delle caratteristiche idrofiliche al polimero, è responsabile della formazione di un complesso network di legami idrogeno intra e inter-molecolari che stabilizzano la singola catena, fanno si che più catene si aggreghino dando origine ai sistemi cristallini tipicamente osservati nelle fibre di cellulosa che verranno descritti nel paragrafo successivo. Dati di diffrazione dei raggi X, NMR e IR hanno permesso di determinare l'esistenza di un legame idrogeno che si estende dal gruppo idrossilico O(3)-H all'idrogeno H(5) dell'anello adiacente e dall'idrogeno H(6) fino al gruppo idrossilico O(6)-H dell'anello successivo [figura 2].[15,16,17]

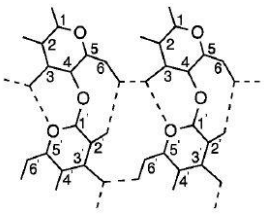


Figura 2: Legami idrogeno nella cellulosa nativa

1.2 Struttura cristallina e polimorfismo della cellulosa

La cellulosa esiste sotto forma di differenti strutture cristalline. La cellulosa nativa, classificata coma **cellulosa I**, viene descritta dal modello di Meyer-Mark-Misch[18,19] [figura 3] che propone una cella cristallina monoclina $P2_1$ con due catene anti-parallele di cellobiosio che si estendono in direzioni opposte lungo l'asse della fibra cellulosica. Attraverso studi ^{13}C-NMR a stato solido, Atalla and Vanderhart[20] nel 1984 scoprirono che la **cellulosa I** si presenta in realtà sotto forma di due fasi cristalline esistenti in rapporti differenti, $\mathbf{I_\alpha}$ e $\mathbf{I_\beta}$, di cui $\mathbf{I_\beta}$ coincide con il modello di Meyer-Mark-Misch mentre la $\mathbf{I_\alpha}$ corrisponde ad una cella cristallina triclina P1 contenente una singola catena. La fase $\mathbf{I_\alpha}$, presente in grande quantità nella cellulosa batterica e cellulosa derivante dall'alga Valonia, è metastabile e attraverso un processo di ricottura tra i 260 °C e 280 °C passa alla fase $\mathbf{I_\beta}$ termodinamicamente favorita. La fase $\mathbf{I_\beta}$ è presente soprattutto nella cellulosa contenuta nel legno, nel cotone e nella ramia. Per entrambe le fasi, i fasci di catene sono disposti in modo parallelo tra loro. La **cellulosa II** è un'altra fase cristallina che si ottiene per rigenerazione chimica della **cellulosa I**, ovvero per dissoluzione in un opportuno solvente e riprecipitazione in acqua, oppure tramite il processo di mercerizzazione con soluzione di idrossido di sodio. La conversione da **cellulosa I** a **cellulosa II** è irreversibile. Il tipo di cella cristallina è monoclina $P2_1$ con differenti parametri di cella rispetto alla corrispondente della cellulosa nativa inoltre i fasci di catene sono antiparalleli tra loro e ciò conferisce alla struttura una maggiore solidità e la rende preferibile per la produzione di tessuti e per applicazioni dell'industria della carta. Alcune specie batteriche producono la **cellulosa II**[21]. La **cellulosa II** e **I** quando è trattata con ammoniaca (gas o liquefatta) o varie ammine, genera la **cellulosa III**. In particolare si distinguono due fasi cristalline, $\mathbf{III_I}$[22] e $\mathbf{III_{II}}$, anche se la struttura della fase $\mathbf{III_{II}}$ non è ancora del tutto chiarita.[23] Le fasi $\mathbf{IV_I}$ e $\mathbf{IV_{II}}$ si ottengono riscaldando rispettivamente la cellulosa $\mathbf{III_I}$ e $\mathbf{III_{II}}$ oltre i 260 °C in glicerolo ed in un modo simile alla **cellulosa III** possono riconvertirsi in **cellulosa I** o **II**. Diverse piante contengono

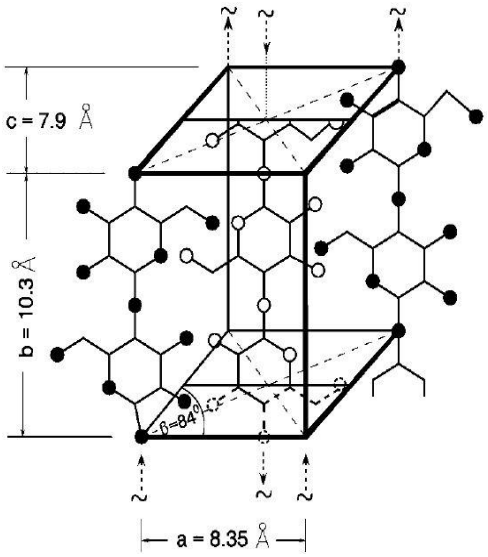


Figura 3: Cella cristallina della cellulosa nativa (modello Meyer-Mark-Misch)

normalmente la **cellulosa IV** nella parete cellulare.[24] In figura 4 sono riassunte le fasi cristalline della cellulosa e la relazione esistente tra di esse.

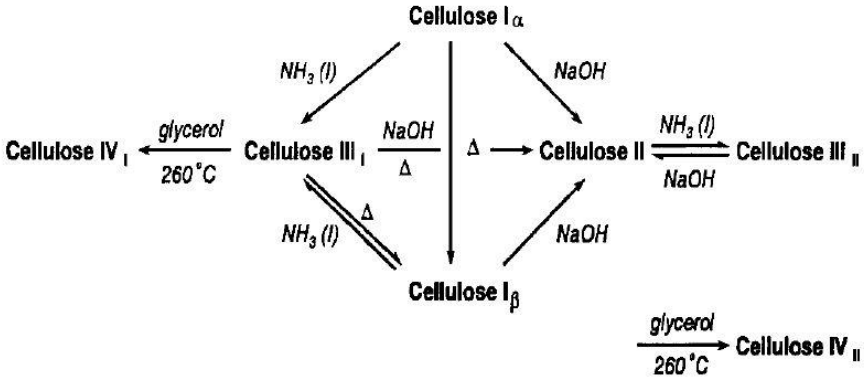


Figura 4: Fasi cristalline della cellulosa

1.3 Struttura gerarchica e morfologia delle fibre di cellulosa

In natura la cellulosa non esiste come singola molecola ma piuttosto sotto forma di fibre risultanti dall'organizzazione gerarchica di più catene cellulosiche che sono il risultato del processo di biosintesi della cellulosa. Il meccanismo non è ancora del tutto chiarito, diversi studi[25,26,27] descrivono la formazione delle catene come il risultato di due processi di polimerizzazione e cristallizzazione che sono svolti da complessi enzimatici chiamati complessi terminali (terminal complexes, TCs), presenti nella parete cellulare delle cellule vegetali. Nelle piante tipicamente 36 catene di cellulosa si aggregano fino a formare un'unità più grande chiamata fibrilla elementare o proto fibrilla, la quale a sua volta si impacca con altre fibrille elementari per formare le microfibrille. Le microfibrille, a loro volta, formano le fibre vere e proprie, che costituiscono la struttura portante delle pareti cellulari vegetali. L'aggregazione è dovuta a forze di Van der Waals e legami idrogeno intra e inter-molecolari. Il diametro di una proto fibrilla è di circa 3.5 nm[28] mentre quello di una microfibrilla differisce in base al tipo di fonte cellulosica considerata,[29] tramite microscopia elettronica e WAXS si è osservato che esso è generalmente compreso tra i 4 e i 35 nm [tabella 1]. Le microfibrille possono raggiungere lunghezze anche dei micrometri[28].

Sample	*diameter (nm)*
Bacterial cellulose	4–7
Cotton linters	7–9
Ramie	10–15
Dissolving pulp	10–30
Valonia cellulose	10–35

[a] Source: Fink et al. (1990).

Tabella 1: Diametro delle microfibrille

Anche se l'impaccamento delle catene cellulosiche consente di avere una struttura ordinata ad elevata cristallinità, dislocate in modo casuale lungo le microfibrille ci sono delle zone para-cristalline o amorfe che risultano dalla distorsione delle fibre che diminuiscono l'efficacia delle forze interne.[30] Queste zone amorfe sono all'origine del processo di formazione della cellulosa nanocristallina, descritto nel paragrafo successivo, che sfrutta l'idrolisi selettiva dei legami glicosidici delle zone amorfe, che essendo meno compatte e in situazione energetica più elevata sono più reattive delle loro controparti cristalline.

CELLULOSA NANOCRISTALLINA

1.4 Aspetti generali della cellulosa nanocristallina

La cellulosa nanocristallina (NCC) è un tipo di nanocellulosa che si ottiene per idrolisi acida della cellulosa nativa. Si differenzia dalla cellulosa batterica (bacterical nanocelluose, BNC) e dalla cellulosa nanofibrillata (nanofibrillated/nanofibrillar cellulose, NFC) per il metodo di sintesi, la morfologia e per i campi d'applicazione. La NCC, prodotta per via chimica, si presenta sotto forma di strutture cristalline filiformi (whiskers) con diametro attorno ai 10-20 nm e lunghezze di qualche centinaio di nanometri. La cellulosa batterica è cellulosa di dimensioni nanometriche prodotta per via biologica dal batterio Acetobacter xylinum, ha morfologia simile alla NCC ma è caratterizzata da rapporto lunghezza-larghezza maggiore. Infine la nanocellulosa fibrillata è prodotta per via in parte chimica e in parte meccanica e raggiunge lunghezze superiori al micrometro. La terminologia utilizzata per indicare questi materiali nella letteratura scientifica non è ancora stata codificata. Di conseguenze spesso sinonimi vengono usati per indicare tipologie diverse di cellulosa creando così confusione e una certa difficoltà nelle ricerche bibliografiche. Ad esempio il termine "microcrystalline cellulose" che indica in generale cellulosa con cristalli di dimensioni micrometriche ottenuta per raffinazione della polpa di legno, compare frequentemente in letteratura per indicare la NCC.

Nanocrystalline cellulose (NCC)	Nanofibrilar cellulose (NFC)
cellulose whiskers	microfibrillar cellulose
cellulose nanowhiskers	cellulose nanofibrils
cellulose microfibrils	cellulose microfibrils
nanocrystal cellulose	
microcrystalline cellulose	

1.5 Produzione della cellulosa nanocristallina

L'idrolisi acida della cellulosa coinvolge preferenzialmente i legami glicosidici delle zone amorfe in quanto esse risultano avere una densità minore rispetto a quelle cristalline e sono più facilmente aggredibili dall'acido.[31,32] In generale durante l'idrolisi il grado di polimerizzazione (degree of polymerization, DP) decresce rapidamente fino a valore minimo (level-off DP, LODP). Da questo punto in poi l'idrolisi completa a glucosio e suoi derivati richiede tempi molto lunghi. Studi di diffrazione dei raggi X e dei neutroni hanno evidenziato che il valore del LODP è in relazione alle dimensioni dei cristalli lungo le catene cellulosiche presenti nella cellulosa e più in generale al tipo di cellulosa d'origine.[33,34] Valori tipici del LODP sono: 250 per il cotone idrolizzato,[35] 300 per le fibre di ramia[34] e fino a 6000 per la cellulosa altamente cristallina derivante dall'alga Valonia.[36]

I fattori che influenzano la preparazione della NCC sono i seguenti:

- **temperatura**
- **tempo di reazione**
- **natura dell'acido**
- **rapporto acido-cellulosa**

In particolare la **natura dell'acido** influenza la stabilità colloidale di NCC in ambiente acquoso, le sue proprietà reologiche e la stabilità termica. Solitamente nell'idrolisi si utilizzano l'acido solforico o l'acido cloridrico. Il primo consente di inserire una carica negativa sulla NCC grazie alla concomitante formazione di esteri solforici sulla superficie dei nanocristalli (che sono deprotonati a pH>3) e quindi promuove la dispersione del prodotto in acqua per repulsione elettrostatica.[37] Tuttavia, la NCC ottenuta in questo modo presenta una termo-stabilità inferiore e si comporta come un fluido newtoniano. D'altra

parte usando l'acido cloridrico si produce una NCC con bassa disperdibilità in acqua e che presenta un comportamento tissotropico a concentrazioni superiori a 0,5% (w/v) e reopettico sotto lo 0,3% (w/v).[38] Generalmente la concentrazione dell'acido solforico che si impiega per idrolisi della cellulosa è del 65% in peso. L**a temperatura** può variare dai 25 °C ai 70 °C e di conseguenza varia il **tempo di reazione** che sarà ovviamente più lungo a basse temperature. Nel 2006 Bondeson, studiando l'ottimizzazione delle condizioni di idrolisi con acido solforico della cellulosa microcristallina ottenuta da abete norvegese, osservò che il prolungamento del tempo di reazione porta ad una decrescita della lunghezza dei nanocristalli di cellulosa e ad un incremento della carica superficiale.[39] Studi successivi evidenziarono che all'aumentare del tempo di reazione e del **rapporto acido-cellulosa** si ha una curva di distribuzione delle dimensioni dei nanocristalli più stretta.[40] La temperatura produce effetti simili a quelli del tempo di reazione ovvero comporta l'ottenimento di cristalli di dimensioni inferiori.[41]

Diverse **tipologie di cellulosa** possono essere utilizzate nella sintesi della NCC, alcuni esempi sono cotone, lino, canapa, polpe sbiancate di legno dolce e duro e cellulosa microcristallina. Un elevato valore di cristallinità nella cellulosa d'origine si traduce in un prodotto finale con dimensioni maggiori, poiché materiali fortemente cristallini hanno una porzione limitata di zone amorfe attaccabili dall'acido.[42]

1.6 Morfologia e auto-organizzazione della cellulosa nanocristallina

Le dimensioni dei nanocristalli di cellulosa dipendono dalle condizioni in cui l'idrolisi acida avviene e dalla sorgente di cellulosa utilizzata. In tabella 2 sono riportati alcuni esempi.

Source	*L* (nm)	*w* (nm)	Aspect ratio (*L*/*d*)	Technique	References
Bacterial	100–1000	10–50	2–100	TEM	Araki et al. (2001)
Cotton	100–150	5–10	10–30	TEM	Araki et al. (2001)
	150–210	5–11	15–42	E-SEM	Miller and Donald (2003)
MCC	~500	10	50	AFM	Pranger and Tannenbaum (2008)
Ramie	50–150	5–10	5–30	TEM	de Menezes et al. (2009)
Sisal	100–500	3–5	20–167	TEM	de Rodriguez et al. (2006)
Tunicate	1160	16	73	DDLS	de Souza Lima et al. (2003)
	100–several 1000	15–30	3–67	TEM	Kimura et al. (2005)
Valonia	>1000	10–20	50–100	TEM	Revol (1982)
Wood	100–300	3–5	20–100	AFM	Beck-Candanedo et al. (2005)

Tabella 2: Proprietà dimensionali della nanocellulosa ottenuta da varie fonti cellulosiche

La morfologia della sezione trasversale cristallina della NCC è legata al meccanismo di biosintesi della cellulosa di origine. Le differenti geometrie del cristallo sono il risultato delle molteplici disposizioni dei TC che sono state osservate in natura nelle pareti cellulari.[25]Osservazioni fatte al TEM mostrano che i nanocristalli di cellulosa ottenuti dall'alga Valonia ventricosa hanno sezione quasi quadrata con lato medio di 18 nm[43] mentre nanocristalli di cellulosa derivanti dagli organismi marini tunicati hanno una sezione rettangolare 8.8 nm x18.2 nm.[44] Per quanto riguarda la morfologia lungo la catena, la NCC derivante da tunicati e la BNC hanno catene avvolte ad elica.[41,45]Questa caratteristica non è stata riscontrata nelle NCC derivanti piante, per le quali si pensa che le catene abbiano una orientazione uniplanare.

In sospensioni acquose a bassa concentrazione le particelle di NCC prodotte con acido solforico sono orientate casualmente e formano una fase isotropica. Quando la concentrazione raggiunge un valore critico, in sospensione si forma una fase anisotropa nematica chirale o fase colesterica, tipica dei liquidi cristallini.[46] Le particelle filiformi di NCC sono allineate lungo più piani, perpendicolari all'asse principale della fase (asse colesterico), secondo una direzione (direttore) che ruota di un certo angolo tra un piano e l'altro. I piani formano una struttura elicoidale con passo P compreso tra i 20 µm e 80 µm [figura 5]. La fase colesterica ha la proprietà di cambiare il piano di polarizzazione della luce e quando osservata con filtri polarizzatori, mostra i caratteristici domini birifragenti. Lasciata a riposo la sospensione di NCC si separa spontaneamente in due fasi, quella superiore isotropa e quella inferiore anisotropa.

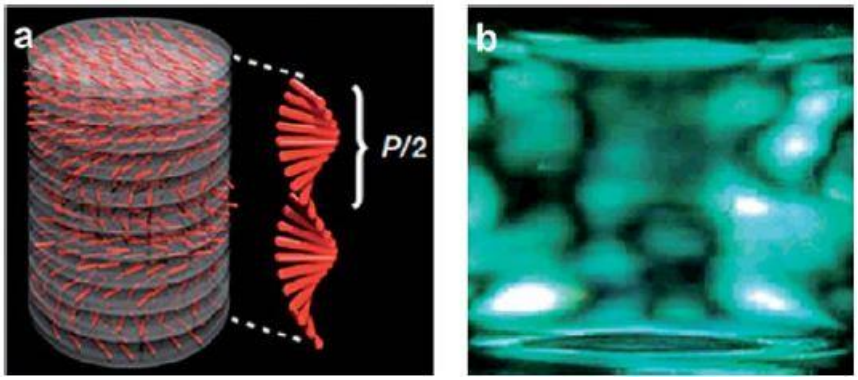


Figura 5: a) Rappresentazione schematica della fase nematica chirale, P=passo dell'elica chirale b) domini birifrangenti

Si possono ottenere delle fasi anisotrope anche in solventi apolari, utilizzando NCC stabilizzata con opportuni surfattanti.[47] Ciò che rende interessanti dal punto tecnologico questi fasi anisotrope è la possibilità di evaporare il solvente ed ottenere film solidi di NCC

iridescenti, che conservano la struttura della fase chirale e sono potenzialmente applicabili nel campo dei materiali decorativi o carte di sicurezza (le proprietà ottiche di tali materiali non possono essere riprodotte per stampa o fotocopia).[48]

In **solventi acquosi** il valore di concentrazione della sospensione NCC solfonata al quale si forma la fase nematica chirale dipende dalla densità di carica e generalmente è compreso tra l'1% e il 10% (w/w). Studi quantitativi[49,50] hanno evidenziato che la presenza di elettroliti, nonché la loro concentrazione e dimensioni ioniche, influenzano la proprietà della fase nematica. In particolare all'aumentare della quantità di elettrolita diminuisce la fase anisotropa e il passo dell'elica ad essa associata. Inoltre all'aumentare delle dimensioni dello ione aumenta il valore di concentrazione critico per la formazione della fase anisotropa. Infine la presenza di macromolecole come destrani o coloranti ionici induce alla formazione di due fasi, una isotropa e l'altra anisotropa.[51,52,53] In **solventi organici s**i osserva la fase chirale ma il passo dell'elica chirale risulta essere molto più piccolo (4 µm) e la concentrazione di NCC più alta (fino a 36%) rispetto a quando si hanno sospensioni acquose.[54]

Inoltre la NCC deve essere opportunamente funzionalizzata superficialmente per risultare disperdibile in solventi organici.

1.7 Proprietà meccaniche della cellulosa nanocristallina

In teoria la nanocellulosa ottenuta per idrolisi acida può essere considerata come un materiale costituito da un monocristallo di cellulosa (grado di cristallinità 100%) in quanto l'idrolisi elimina le zone amorfe (zone difettuali delle microfibrille). In realtà l'idrolisi non è completa, ne consegue che il prodotto risultante ha un grado di cristallinità inferiore al 100%. Tipicamente si va dal 54 al 88% in base al tipo di cellulosa d'origine[55]. Misurare le proprietà meccaniche di tali cristalli di dimensioni nanometriche è difficoltoso per cui le prime informazioni sono state ricavate dai cristalli nativi di cellulosa, ritenendo ragionevole pensare che la NCC abbia proprietà simili quanto più si avvicina al valore massimo di cristallinità (100). Nel 1962 Sakurada fu il primo a determinare sperimentalmente per via difrattometrica il valore del modulo elastico dei cristalli di cellulosa, in particolare cellulosa I ricavata da ramia (138 GPa).[56] Calcoli teorici basati su modelli di dinamica-meccanica molecolare forniscono un valore del modulo di Young compreso tra i 100 e 160 GPa in accordo con gli studi Sakurada.[57] Valori simili sono stati calcolati con nanocellulosa

prodotta da tunicati via spettroscopia Raman[58] e microscopia AFM[59]. L'elevata rigidità della cellulosa nanocristallina unita all'elevato carico di rottura (7500 MPa), all'alto rapporto lunghezza-diametro, l'elevata area specifica (150-250 m^2/g) e biodegradabilità[60] rendono la NCC un'ottima alternativa ai filler inorganici utilizzati nei materiali polimerici. Il miglioramento delle proprietà meccaniche portato da tali filler è causato dal "network" rigido che la NCC è in grado di formare grazie ai legami idrogeno. Tanto maggiore è l'adesione tra questo network e la matrice polimerica, tanto più è elevato il miglioramento delle proprietà. A tale scopo, è necessario massimizzare la disperdibilità della NCC nella matrice polimerica idrofobica, mitigando le sue caratteristiche idrofiliche mediante inserimento sulla superficie cellulosica di funzionalità organiche relativamente apolari. Il limite maggiore della NCC come filler risiede nella sua bassa stabilità termica, in quanto la temperatura di decomposizione termica è nell'intervallo 200-300 °C.

1.8 Modificazioni chimiche della cellulosa nanocristallina

La NCC ha un elevato numero di gruppi idrossilici (OH) superficiali che possono essere coinvolti in molteplici reazioni chimiche. L'unità costitutiva della catena cellulosica possiede tre gruppi OH. Gli OH sugli atomi di carbonio in posizione 3 e 2 sono di tipo secondario mentre l'OH sul carbonio in posizione 6 è primario. L'OH primario, essendo più reattivo rispetto agli altri, è il gruppo funzionale che partecipa alle reazioni chimiche di funzionalizzazione della cellulosa. Gli scopi principali delle reazioni chimiche sulla superficie cellulosica sono:

a) incrementare la disperdibilità del materiale in solventi organici e la compatibilità con matrici non polari/idrofobiche;
b) inserire gruppi funzionali particolari che conferiscono al materiale potenziali applicazioni;

Dalla letteratura[61] è noto che le modificazioni chimiche interessano la superficie cellulosica, ma tempi prolungati di reazione e/o reagenti aggressivi possono intaccare la struttura cristallina del materiale comportando così delle modifiche morfologiche profonde. In figura 6 sono riportate le più comuni modificazioni superficiali della NCC.

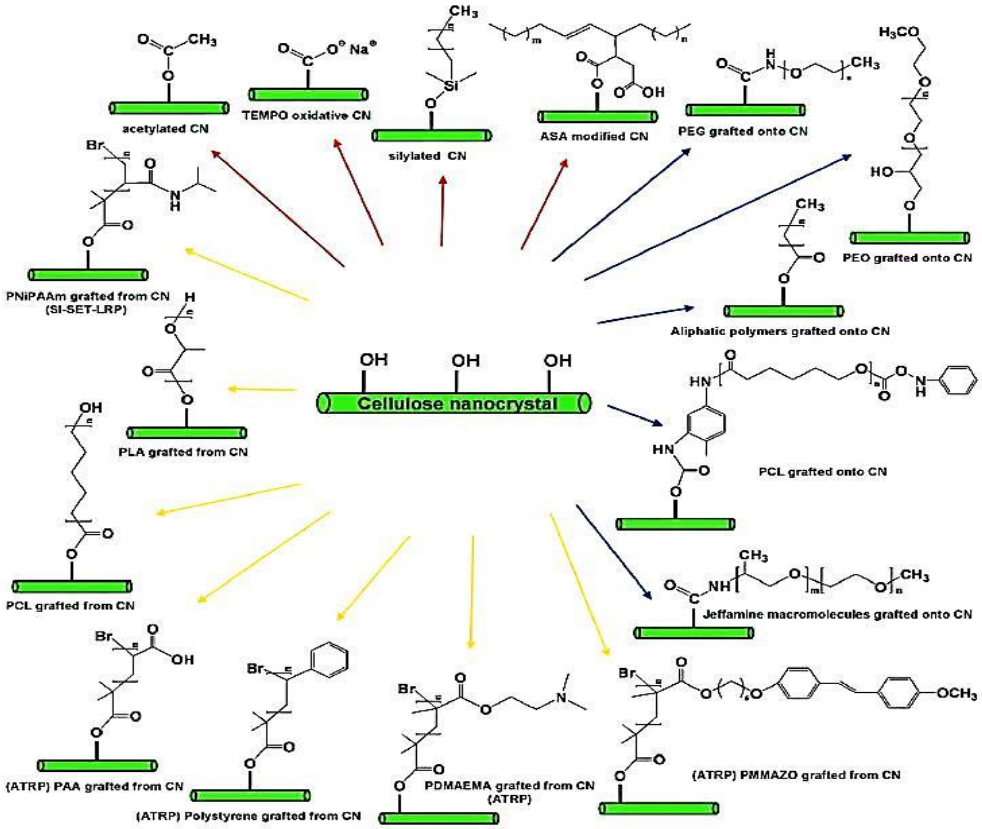


Figura 6: Modificazioni chimiche della cellulosa nanocristallina

Nella figura le frecce di vario colore indicano differenti tipologie di modificazione. Le frecce rosse indicano reazioni di sostituzione dei gruppi OH con piccole molecole (1°TIPO), le frecce blu indicano reazioni di ancoraggio di catene polimeriche effettuate con differenti reagenti di coupling (2°TIPO). Infine le frecce gialle indicano reazioni di ancoraggio di catene polimeriche attraverso polimerizzazione superficiale a partire da iniziatori immobilizzati sulla superficie (3°TIPO). Le reazioni impiegate nel presente lavoro di tesi appartengono alla prima tipologia e verranno meglio descritte nel paragrafo relativo alle strategie di funzionalizzazione.

Per quanto riguarda le altre due tipologie di reazione, esse possono essere considerate entrambe delle metodologie di ancoraggio (grafting) di polimeri. Più specificatamente, la prima, che è la più sfruttata, è definita "grafting-on" mentre la seconda è detta "grafting-from". Nel 2008 i chimici Youssef Habibi e Alain Dufresne utilizzarono l'approccio grafting-on per ancorare catene di policaprolattone (PLC) di vario peso molecolare alla NCC attraverso reazione di coupling via gruppo isocianato. Essi trovarono che il PLC era in grado di cristallizzare sulla superficie della NCC per gradi di funzionalizzazione elevati. Con lo stesso metodo sono state eseguite altre funzionalizzazioni mediante ancoraggio di: poliuretano[62], amino-polietilenglicole (PEG-NH_2) con radicale nitrossido (TEMPO)[63],

oligomeri di DNA[64] e polipropilene maleato[65]. Il metodo grafting-from è stato usato per crescere catene polimeriche sulla superficie di NCC attraverso la polimerizzazione radicalica a trasferimento di atomo (ATRP) che consente di avere un elevato controllo sul peso molecolare del polimero. Il processo di polimerizzazione prevede due stadi: (1) esterificazione dei gruppi OH con 2-bromo-isobutilbromuro seguita dalla polimerizzazione del monomero (2). Diversi lavori in letteratura riportano casi di grafting-from con monomero stirene[66], azobenezene[67] e N,N-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEMA)[68].

Esempi di vie di funzionalizzazione particolari sono riportate in figura 7.

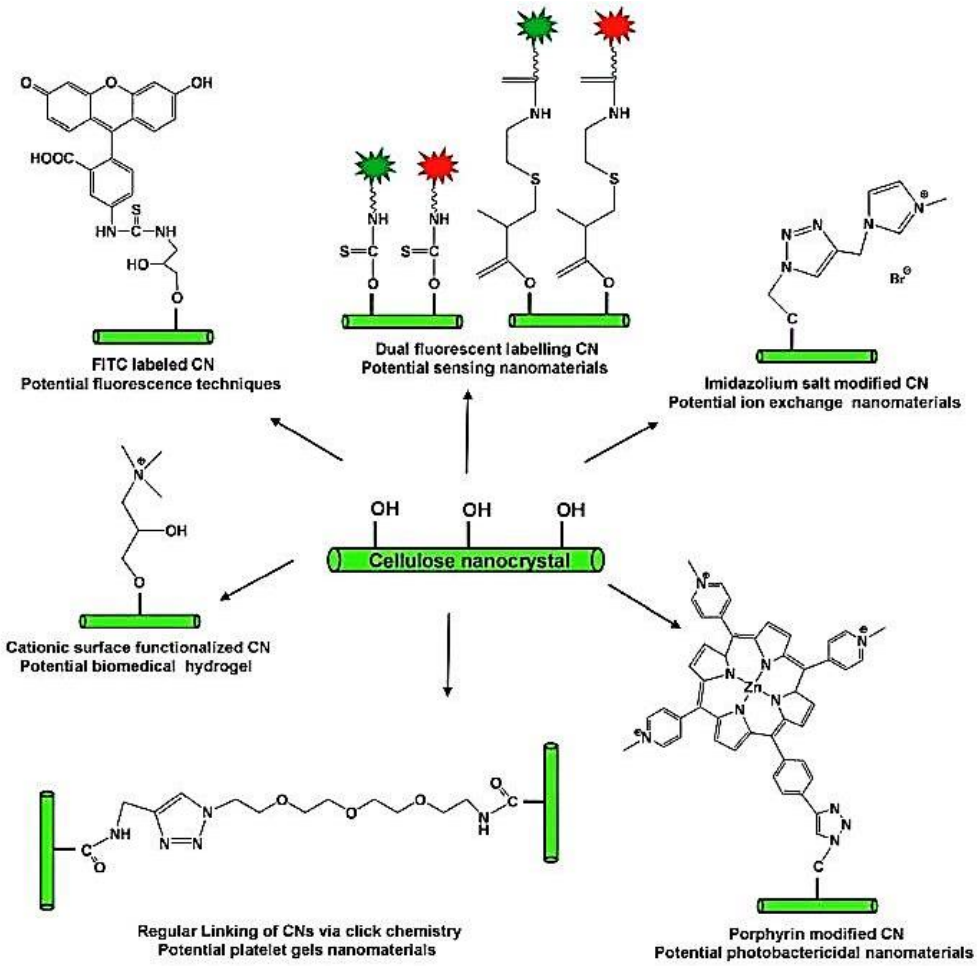


Figura 7: Applicazioni potenziali della cellulosa nanocristallina modificata chimicamente

La funzionalizzazione di NCC con molecole fluorescenti è utile per lo studio dell'assorbimento cellulare e della biodistribuzione in sistemi in vivo dei nanocristalli di cellulosa. Nel 2007 i chimici Dong e Roman descrissero un metodo per legare covalentemente la fluoresceina-5-isotiocianato (FITC) alla NCC.[69] Esso prevede

l'inserimento di una funzionalità epossidica sulla superficie cellulosica tramite reazione con epicloridrina. Successivamente l'anello epossidico viene aperto per reazione con ammonio idrossido il quale introduce un gruppo amminico primario (NH_2). Infine NH_2 reagisce con il gruppo isotiocianato della FITC per formare una tiourea. Si possono legare molecole fluorescenti sulla NCC anche in altri modi: 1) reazione tra il gruppo isotiocianato della FITC e i gruppi OH cellulosici deprotonati, 2) reazione via tiolo-ene click chemistry, 3) coupling tra un estere succinimidico e un gruppo ammino.[70] Altre funzionalizzazioni si ottengono legando molecole via click chemistry, ad esempio porfirine su NCC modificata per applicazioni in terapia fotodinamica,[14] sali di imidazolo per creare nanomateriali potenzialmente impiegabili come resine a scambio ionico,[71] oppure rendendo cationica la superficie cellulosica attraverso reazione con epossipropiltrimetilammonio cloruro per formare degli idrogel tissotropici.[72]

PORFIRINE [73]

1.9 Generalità sulle porfirine

Le porfirine sono una classe di composti macrociclici costituiti da quattro unità pirroliche legate tra loro mediante quattro atomi di carbonio metinici (**=CH–**). La molecola capostipite delle porfirine è la porfina, la cui struttura è riportata in figura 8 assieme ai due sistemi di nomenclatura delle porfirine. La prima nomenclatura (I) introdotta dal premio Nobel Hans Fischer è stata sostituita da quella IUPAC (II), più efficace nell'indicare porfirine sostituite.

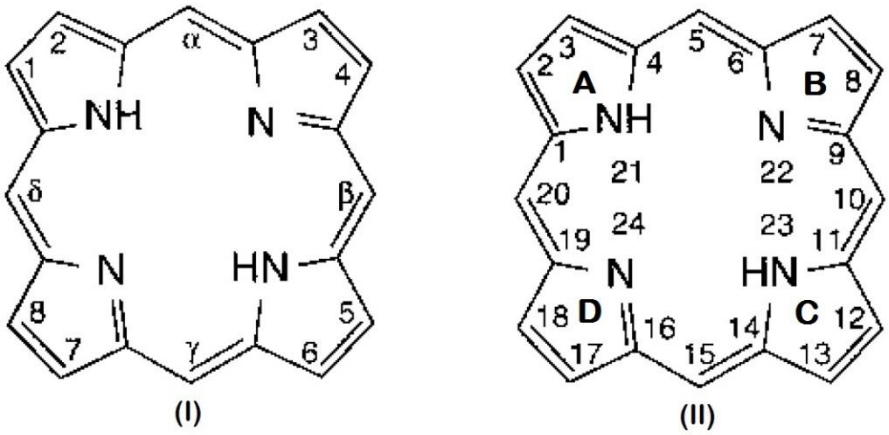


Figura 8: Struttura porfina con sistema di nomenclatura Fischer (I) e IUPAC (II)

Nella nomenclatura IUPAC le posizioni 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 sono indicate come α-pirroliche, le posizioni 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 sono dette β-pirroliche e le posizioni 5, 10, 15, 20 sono dette meso. I quattro anelli pirrolici sono etichettati con le lettere A-B-C-D.
Il sistema porfirinico è planare con una larghezza di 9 Å, e diametro della cavità interna di 4 Å. Esso risulta insolubile in acqua e poco solubile in solventi organici. Generalmente all'aumentare del grado di sostituzione del sistema porfirinico aumenta la solubilità in solventi organici e al tempo stesso accresce l'impedimento sterico che porta ad una parziale perdita di planarità del sistema macrociclico. Nella molecola sono presenti 22 elettroni π di cui 18 conferiscono l'aromaticità alla porfina e la loro delocalizzazione è rappresentata in figura 9.

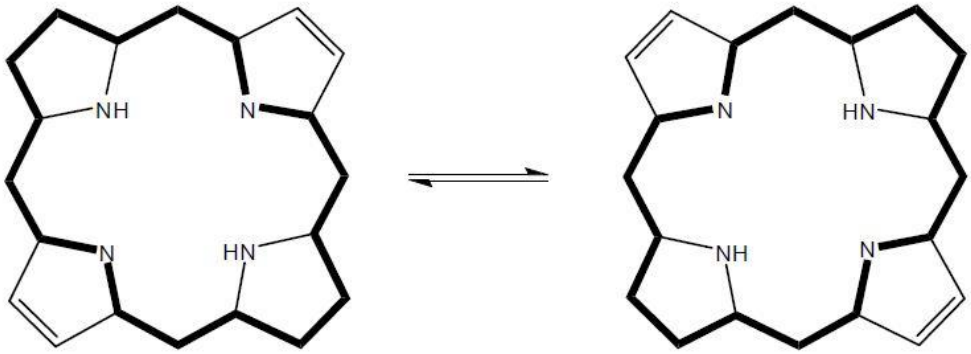


Figura 9: Delocalizzazione del sistema aromatico della porfina

1.10 Complessi metallici delle porfirine

Gli atomi di azoto imminici al centro dell'anello porfirinico possono essere attaccati da reagenti elettrofili o essere protonati per dare specie mono e dicationiche. I gruppi N-H sono invece leggermente acidi e vengono deprotonati in presenza di basi forti. La metallazione delle porfirine comporta la deprotonazione dei due idrogeni imminici e la formazione di un legante dianionico. Generalmente, per metallare una porfirina si utilizza il sale del metallo assieme ad un sistema tampone o una base. Il modo più semplice di monitorare una reazione di metallazione è mediante spettroscopia UV-Vis, come si vedrà nei prossimi paragrafi. I metalli con orbitali d vuoti o pieni (es. Al(III) o Zn(II)) formano complessi porfirinici che hanno stati eccitati più lunghi rispetto ai corrispondenti dei metalli con orbitali parzialmente occupati. Come si vedrà nei paragrafi successivi, ciò è importante per la generazione di ossigeno di singoletto. La velocità di demetallazione dipende dal tipo di complesso, ad esempio i complessi a base di Mg sono facili da demetallare mentre quelli di Al sono

piuttosto inerti. Di seguito sono indicate le condizioni acide per provocare la demetallazione di vari complessi.

CONDIZIONI ACIDE	**COMPLESSI PORFIRINICI DEMETALLATI**
H_2O	Li(I), Na(I), K(I), Hg(II), Ca(II), Hg(II)
HOAc	Mg(II)
HCl (2M)	Zn(II), Cd(II), Fe(II), Sn(II)
H_2SO_4 concentrato	Cu(II), Co(II), Ni(II), Fe(III)
Resistenti alla demetallazione	Al(III), VO(IV), Sn(IV)

1.11 Spettri elettronici

Lo spettro elettronico di assorbimento di una tipica porfirina [figura 10] presenta un'intensa banda attorno ai 400 nm dovuta alla transizione al secondo stato elettronico eccitato ($S_0 \rightarrow S_2$), chiamata banda di Soret o banda B, e delle bande più deboli attorno ai 550 nm dovute alla transizione al primo stato elettronico eccitato ($S_0 \rightarrow S_1$), chiamate bande Q. L'intensità e il numero delle bande Q dipende dal grado di simmetria di sostituzione della porfirina e dal suo stato di metallazione. Le bande Q e B sono originate da transizioni π-π^* e trovano la loro spiegazione nel modello dei quattro orbitali proposto da Martin Gouterman nel 1960.

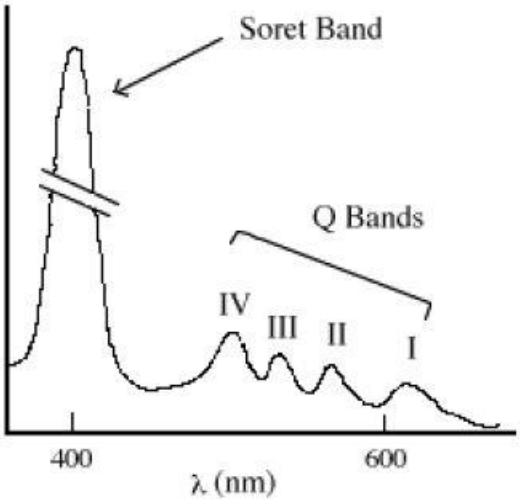


Figura 10: Spettro Uv-Vis di una tipica porfirina

Secondo il modello di Gouterman, basato sulla teoria di Hückel [figura 11], le transizioni elettroniche π-π^* nei sistemi porfirinici avvengono tra i due orbitali HOMO (b_1,b_2,degeneri)

e due orbitali LUMO (c_1,c_2, la cui degenerazione dipende dalla sostituzione dell'anello). Le transizioni tra questi orbitali non sono degeneri in virtù dell'"interazione di configurazione" che definisce un set di funzioni d'onda "nuove" per descrivere lo stato elettronico della molecola. In particolare l'interazione di configurazione è un metodo matematico che esprime le funzioni d'onda dello stato elettronico della molecola come combinazione lineare di determinanti di Slater, ognuno dei quali rappresenta una determinata configurazione elettronica della molecola.

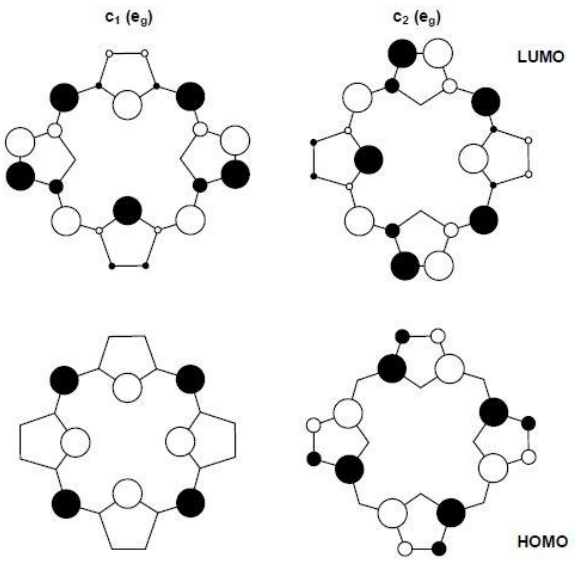


Figura 11: Orbitali di frontiera del sistema porfirinico

Nelle porfirine metallate "*regolari*" cioè quelle contenenti metalli aventi il guscio elettronico d vuoto (d^0) o pieno (d^{10}), gli orbitali dπ (d_{xz} , d_{yz}) del metallo a bassa energia interagiscono poco con gli orbitali di anti-legame π^* della porfirina. D'altra parte, nelle i*psoporfirine* cioè le porfirine metallate con metalli aventi orbitali d parzialmente occupati (d^m con m=6-9) è presente una significativa interazione tra gli orbitali dπ e i π^* (retrodonazione π) che causa un incremento del gap energetico π-π^* e quindi uno shift ipsocromico delle bande di assorbimento.

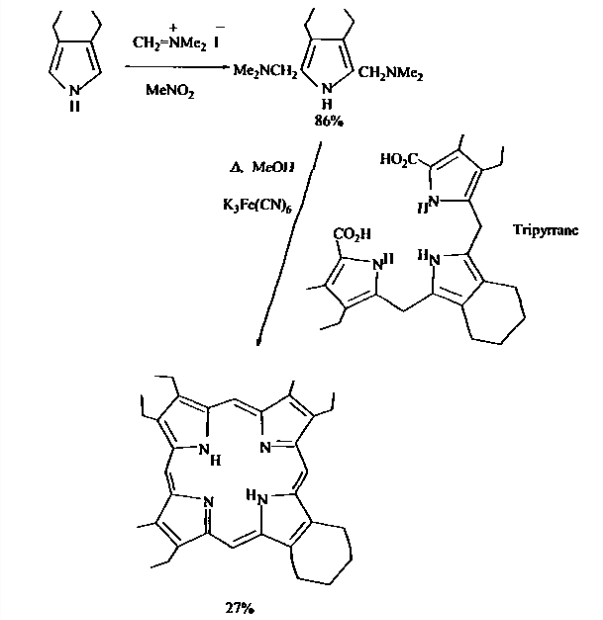
La porfirina nella sua forma libera ha un grado di simmetria minore rispetto alla corrispondente porfirina metallata. Di conseguenza, essa presenta quattro bande Q, due classificate come α responsabili della transizione vibro-elettronica 0-0_x e 0-0_y, e le altre due, dette β, responsabili della transizione vibro-elettronica 0-1_x e 0-1_y. La porfirina metallata e quella protonata presentano solo due bande Q, α 0-0 e β 0-1 poiché le direzioni x e y per gli

orbitali c_1 e c_2 sono equivalenti. Nelle porfirine non metallate la banda B non risulta sdoppiata nella transizione lungo x e lungo y tuttavia appare più ampia rispetto alla corrispondente delle porfirine metallate.

1.12 Porfirine sintetiche

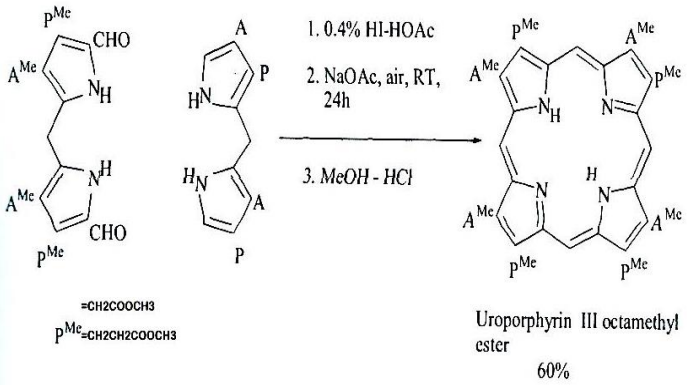
Esistono molteplici strategie di sintesi delle porfirine che differiscono per il modo con cui vengono assemblati i quattro anelli pirrolici. I sistemi porfirinici sostituiti non simmetricamente, come le porfirine naturali, richiedono vie di sintesi caratterizzate da più passaggi. Invece per porfirine simmetricamente sostituite la sintesi avviene generalmente in un singolo passaggio, anche se spesso con rese di reazione basse per la concomitante formazione di specie oligomeriche aperte. Di seguito sono riportate esempi di vie sintetiche dei sistemi porfirinici.

Condensazione "3+1"
(porfirine non simmetriche, β sostituite)



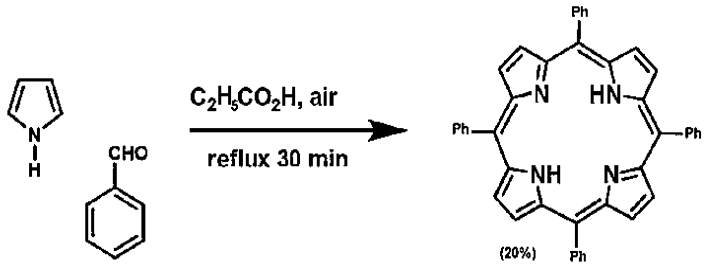
(L.T. Nguyen, M.O. Senge and K.M. Smith, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 998-1003).

Condensazione "2+2"
(porfirine non simmetriche, β sostituite)



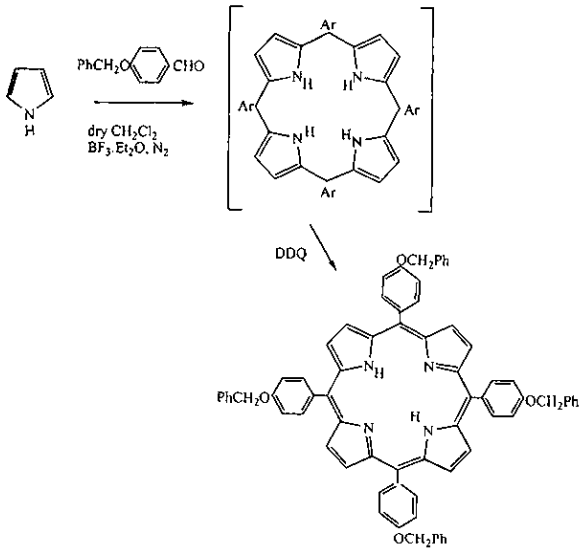
(E.I. Tarlton, S.F. MacDonald and E. Baltazzi, J. *Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 4389-4395).

Condensazione
“pirrolo-aldeide/metodo di Adler-Longo”
(porfirine simmetriche, meso sostituite)



(A.D. Adler *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1967, **32**, 476)

Condensazione
“pirrolo-aldeide/metodo di Lindsey”
(porfirine simmetriche, meso sostituite)



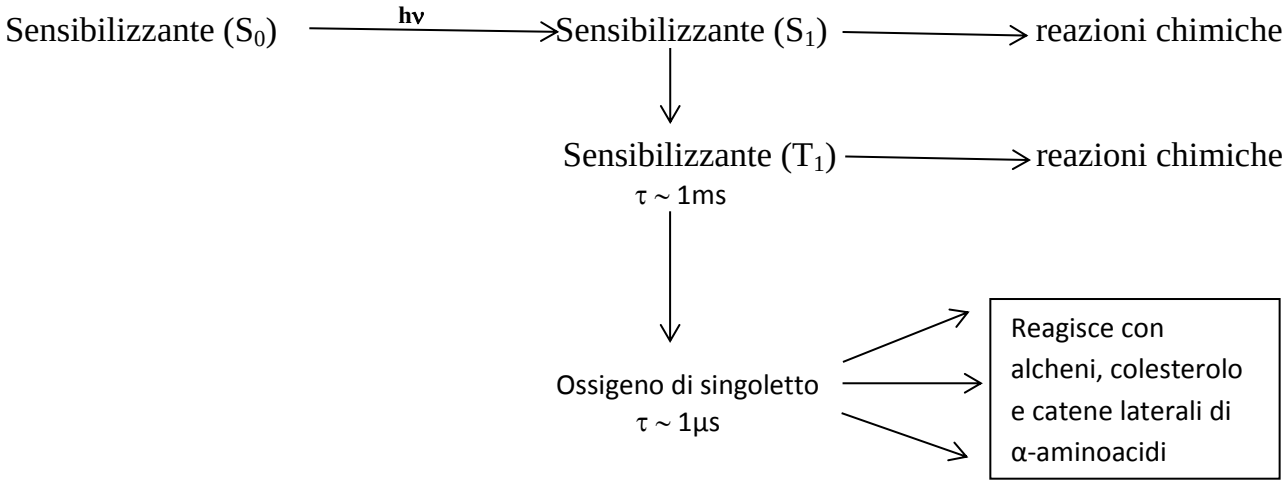
(J.S. Lindsey *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 827-836).

TERAPIA FOTODINAMICA [73]

1.13 Introduzione alla fototerapia

La **fototerapia** è una terapia che consiste nell’utilizzo della luce visibile o del vicino infrarosso per il trattamento di malattie di vario genere. Essa provoca transizioni elettroniche in molecole dette sensibilizzanti, seguite da reazioni chimiche fotoindotte all’interno di organismi viventi. La fototerapia può essere **diretta** o **indiretta**. Si parla fototerapia diretta quando non si somministra alcuna sostanza chimica all’organismo, per cui gli effetti delle terapia sono il risultato dell’assorbimento della radiazione da parte di molecole già presenti all’interno dell’organismo (es. sintesi della vitamina D_3). La fototerapia è indiretta quando viene addizionata una sostanza chimica all’organismo, detta sensibilizzante, che assorbe la radiazione (es. trattamento della psoriasi o malattie varie della pelle). Si distinguono due tipologie di fototerapia indiretta: la prima senza ossigeno molecolare (**fotochemioterapia**) e la seconda in presenza sia di ossigeno molecolare sia di un sensibilizzante (**terapia fotodinamica**-photodynamic therapy, PDT). Come verrà mostrato nei successivi paragrafi, l’ossigeno molecolare può interagire secondo vari meccanismi con substrati organici, a esempio con cellule maligne dell’organismo provocandone la loro distruzione (es. utilizzo di derivati di ematoporfirine per la cura del cancro alla vescica). Di seguito sono riportati i possibili processi in cui può essere coinvolto

un sensibilizzante posto in un organismo, a seguito dell'assorbimento della radiazione di un'opportuna lunghezza d'onda.



Come si vedrà nel presente lavoro di tesi la porfirina legata covalentemente alla cellulosa nanocristallina si comporta come un sensibilizzante, che irradiato si eccita e attiva l'ossigeno molecolare presente in soluzione ad ossigeno di singoletto. Si tratta per cui di un sistema potenzialmente impiegabile nella PDT.

1.14 Transizioni elettroniche

L'assorbimento della radiazione UV-Vis da parte del sensibilizzante produce transizioni elettroniche. In particolare, un fotone di energia hν interagisce con il sensibilizzante nel suo stato elettronico fondamentale (S_0) promuovendo un elettrone da un orbitale di legame o non legame ad uno di anti-legame a più alta energia. Si porta così la molecola in uno stato elettronico eccitato.

Le configurazioni elettroniche ottenibili dall'eccitazione sono formalmente due e differiscono per la molteplicità (la molteplicità è definita come 2S+1, dove S è lo spin totale della molecola): singoletto eccitato con S=0 (S_1) e tripletto eccitato con S=1 (T_1). Lo stato elettronico fondamentale ha S=0. Le regole di selezione delle transizioni elettroniche stabiliscono che non possono avvenire transizioni che comportano cambio di molteplicità, ad esempio S→T o T→S anche se a volte tali regole sono parzialmente non rispettate (a causa dell'accoppiamento spin-orbita). Ciò che si verifica nella pratica è la possibilità di compiere transizioni tra stati di singoletto e da uno stato di tripletto ad uno di singoletto.

Il sensibilizzante passa quindi da S_0 a S_1 mantenendo la molteplicità di singoletto. Dopo l'eccitazione possono intervenire i seguenti fenomeni:

a) il sensibilizzate riemette il fotone assorbito (**fluorescenza risonante**, tuttavia si osserva solo se il campione è gassoso e diluito);

b) attraverso un meccanismo di conversione interna il sensibilizzante perde energia in modo non radiativo fino ad arrivare al livello vibrazione più basso dello stato elettronico eccitato, emette poi il fotone e ritorna allo stato elettronico fondamentale (**fluorescenza**); il processo di emissione radiativa può avvenire tra stati di molteplicità differente a seguito del meccanismo di intersytem crossing (**fosforescenza**);

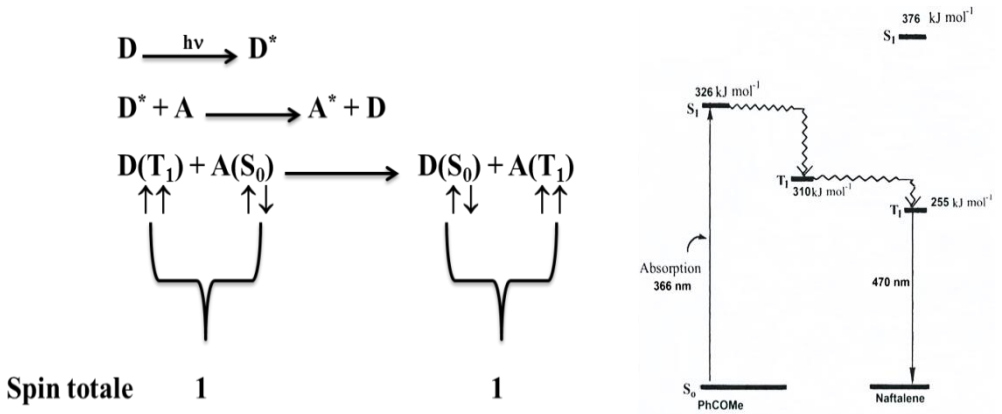
c) il sensibilizzante può partecipare a reazioni fotochimiche (fotoionizzazioni, fotociclizzazioni, fotoaddizioni, riarrangiamenti intramolecolari ecc.);

d) il sensibilizzante può passare il suo stato eccitato ad un'altra molecola che si trova allo stato fondamentale (**trasferimento intermolecolare dell'eccitazione elettronica**).

Nel campo della PDT il punto d è particolarmente importante in quanto la molecola che "riceve lo stato eccitato" del sensibilizzante è l'ossigeno molecolare che diventa così ossigeno di singoletto.

1.15 Trasferimento intermolecolare dell'eccitazione elettronica

Per spiegare il meccanismo di trasferimento intermolecolare dell'eccitazione elettronica è utile partire da un caso sperimentale in cui avviene tale fenomeno. Una soluzione di acetofenone 0.5M in etanolo-etere a 90 K, irradiata a 366 nm, produce fosforescenza a 388 nm. L'aggiunta di naftalene (0.5 M) sposta l'emissione da 388 nm a 470 nm che corrisponde alla tipica fosforescenza del naftalene. Poiché l'irraggiamento del solo naftalene a 366 nm non produce emissione, il fenomeno descritto sopra si spiega assumendo che il naftalene possa agire da accettore dell'energia dello stato di tripletto dell'acetofenone passando così al proprio stato di tripletto (senza essere stato eccitato direttamente). L'acetofenone funge da sensibilizzante ed è definito donatore (D) mentre il naftalene agisce da accettore (A).



Lo spin totale dell'intero sistema viene conservato. Affinché possa avvenire il fenomeno di trasferimento di eccitazione elettronica appena descritto, il livello energetico del tripletto del donatore deve essere più elevato del corrispondente dell'accettore. Nel caso in cui l'accettore sia l'ossigeno molecolare, il processo di trasferimento dell'eccitazione elettronica è rappresentabile nel modo seguente:

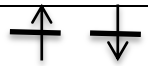
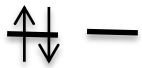
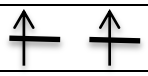
$$Sens(S_0) \xrightarrow{h\nu} Sens(S_1) \xrightarrow{isc} Sens(T_1) \quad \text{Sens=sensibilizzante isc=intersystem crossing}$$
$$Sens(T_1) + {}^3O_2 \xrightarrow{h\nu} Sens(S_0) + {}^1O_2$$

In questo caso il livello energetico dello stato di tripletto del sensibilizzante deve essere più grande di 94 KJ mol^{-1} cioè il livello energetico S_1 dell'ossigeno molecolare.

1.16 Ossigeno di singoletto

L'ossigeno molecolare, nel livello elettronico fondamentale, ha una configurazione di tripletto (T_0) indicata con la notazione ${}^1\Sigma_g^-$. Gli stati elettronici eccitati sono entrambi di singoletto. Quello a energia più elevata, il ${}^1\Sigma_g^+$, ha un tempo di vita in fase condensata che dipende dal solvente, generalmente più lungo in un solvente deuterato rispetto alla controparte non deuterata. Ciò è causato dalla presenza di intensi assorbimenti infrarosso a 1270 nm e 1070 nm da parte di solvente protonati che sono proprio in corrispondenza delle bande di emissione 0-0 e 1-0 dell'ossigeno di singoletto. E'quindi l'interazione tra i livelli vibrazionali delle molecole di solvente e i livelli vibro-elettronici dell'ossigeno di singoletto che determina la rapida disattivazione dello stato di singoletto. Lo stato ${}^1\Sigma_g^+$, decade in 10^{-12} -10^{-9} s al singoletto meno energetico, ${}^1\Delta_g$, il quale ha un tempo di vita dell'ordine dei 10^{-6} s.

Stati elettronici dell'ossigeno molecolare

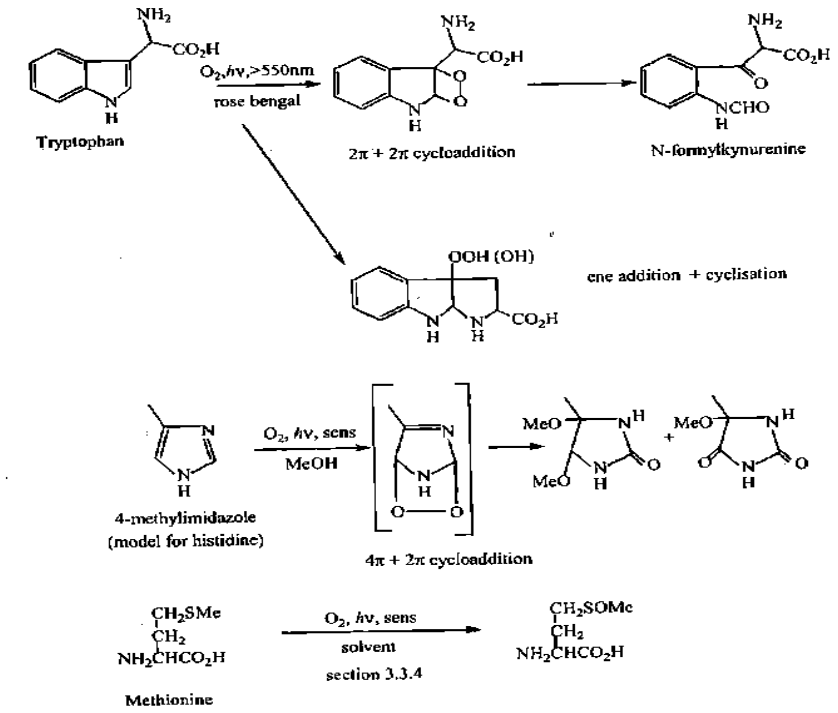
Denominazione	Nome comune	Energia (KJ mol^{-1})	Tempo di vita (fase condensata)	Configurazione elettronica degli HOMO
${}^1\Sigma_g^+$	-	155	$<10^{-9}$ s	
${}^1\Delta_g$	Ossigeno di singoletto, ${}^1O_2$	94	~ 10 µs	
${}^1\Sigma_g^-$	Ossigeno, ${}^3O_2$	0	∞	

Tempi di vita dell'ossigeno di singoletto (${}^1\Delta_g$) in vari solventi

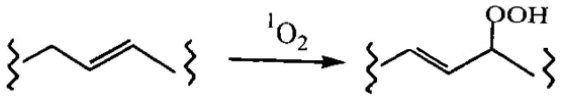
Solvente	H_2O	MeOH	C_6H_6	CS_2	CCl_4	C_6F_6	D_2O	Air, 1 atm
τ (µs)	2	**7**	**24**	**200**	**700**	**3900**	**20**	**~ 76000**

La reattività dell'ossigeno di singoletto nei confronti di biomolecole è mostrata con alcuni esempi:

1) α-amminoacidi: l'istidina reagisce molto rapidamente con l'ossigeno di singoletto mentre il triptofano in soluzione acquosa di metanolo agisce da quencher dell'ossigeno di singoletto e non permette la reazione.

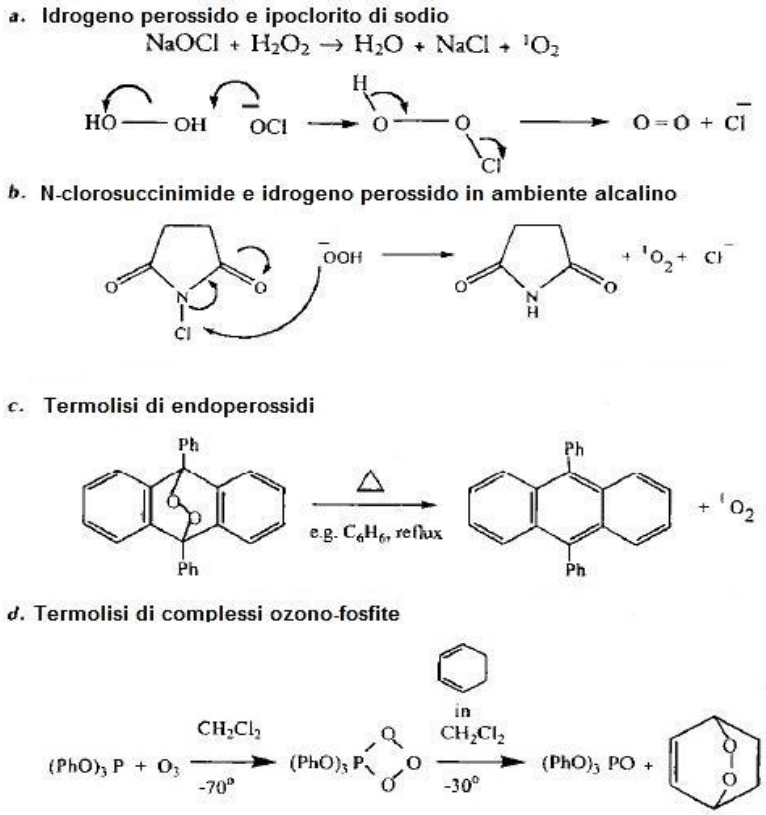


2) Lipidi insaturi: i lipidi insaturi, incluso il colesterolo, e le proteine sono i principali componenti delle membrane cellulari maligne per cui rappresentano il bersaglio dell'ossigeno di singoletto durante il processo di PDT.

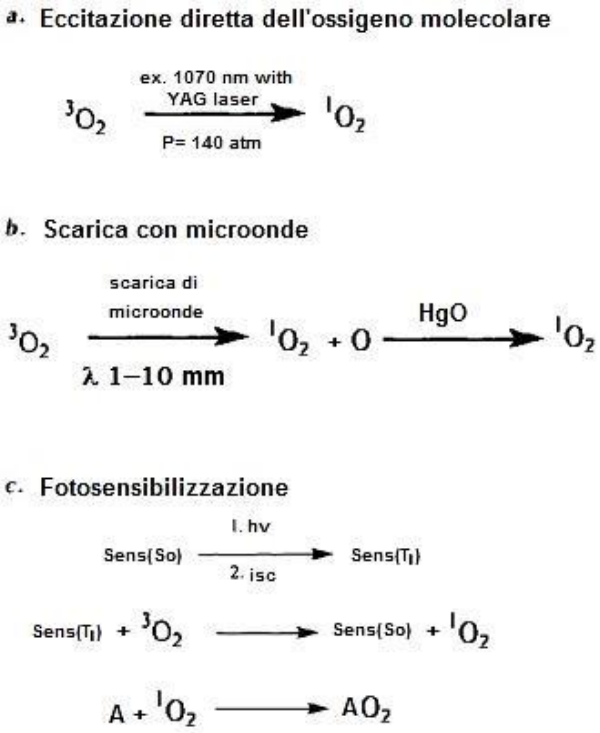


L'ossigeno di singoletto può essere generato attraverso metodi chimici o fisici. Nella PDT la generazione avviene per fotosensibilizzazione (metodo fisico).

Metodi chimici per la generazione dell'ossigeno di singoletto



Metodi fisici per la generazione dell'ossigeno di singoletto



L'ottenimento dell'ossigeno di singoletto per eccitazione diretta è proibito dalle regole di selezione pertanto richiede condizioni drastiche e risulta un processo poco efficiente.

1.17 Sensibilizzanti

Affinché una molecola organica possa essere utilizzata come sensibilizzante nella PDT devono sussistere alcune condizioni:

1) Deve essere presente un cromoforo nella molecola, che assorbe nella regione del visibile/ultravioletto.
2) La generazione dello stato di tripletto del sensibilizzante per intersytem crossing deve avere una efficienza elevata.
3) L'efficienza di generazione dello stato di singoletto dell'ossigeno attraverso il meccanismo di trasferimento dell'eccitazione elettronica deve essere elevata. Le condizioni ideali sono quelle in qui l'energia del tripletto (E_T) del sensibilizzante è leggermente superiore ai 94 KJ mol^{-1}, cioè all'energia dello stato di singoletto dell'ossigeno. In queste condizioni il trasferimento avviene efficacemente. Cromofori con assorbimento solo nel ultravioletto possono non essere adatti alla PDT in quanto l'E_T è in generale troppo alta. Un analogo problema si può verificare con cromofori che assorbono nell'infrarosso, dove l'E_T può essere troppo bassa.

Tipici sensibilizzanti sono i sistemi chinonici estesi (es. iperico), vari classi di coloranti come quelli acridinici (es. acriflavina), fenotiazinici (es. blu di metilene), xantenici (es. eosina Y e rosa bengala), cianinici (es. merocianina). Inoltre le clorine e batterioclorine (es. clorina e_6), le ftalocianine (es. ftalocinina) ed, infine, le porfirine (es. tetrafenilporfirina) che costituiscono il sensibilizzante scelto in questo lavoro di tesi. Le porfirine presentano vantaggi che le rendono interessanti nel campo della PDT:

1) intensi assorbimenti nel visibile per cui possono essere impiegate in piccola quantità;
2) stabilità aromatica che conferisce alla molecola una buona resistenza all'auto-distruzione indotta del processo di fotosensibilizzazione;
3) bassa tossicità nei confronti delle cellule (quando non vengono irradiate).

1.18 Meccanismi dell'azione fotodinamica

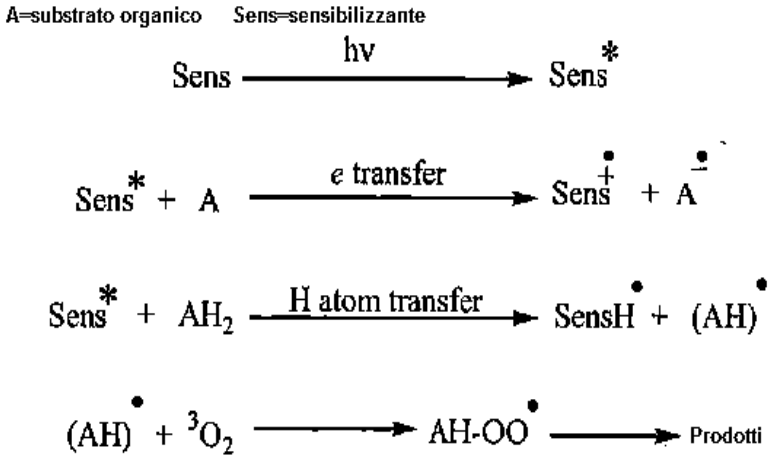
Esistono due tipologie di meccanismi con cui la luce, in presenza di un sensibilizzante e ossigeno, può promuovere reazioni chimiche in substrati organici. Questi meccanismi sono di seguito riportati.

a) **Meccanismo di tipo I - trasferimento di elettroni**

b) **Meccanismo di tipo II - trasferimento di energia**

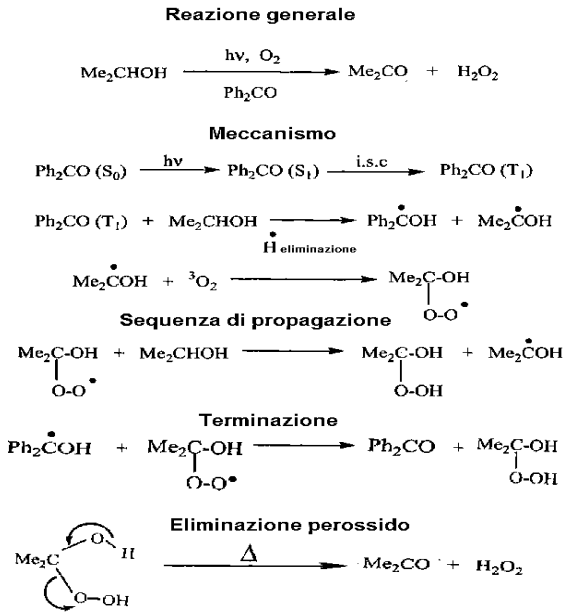
Meccanismo di tipo I - trasferimento di elettroni

Secondo tale meccanismo il sensibilizzante nel suo stato eccitato genera una specie radicalica per trasferimento di elettroni al substrato organico oppure per estrazione da quest'ultimo di atomi di idrogeno [schema 1]. La specie radicalica così formata reagisce con l'ossigeno molecolare nel suo stato fondamentale. Quindi la reazione è promossa fotochimicamente per poi proseguire senza la necessità di illuminare il sistema. La tipica reazione di terminazione è quella di accoppiamento tra due radicali.



Schema 1: Meccanismo di tipo I

Nello schema 2 è riportato un esempio di foto-ossidazione di un alcol secondario secondo il meccanismo di tipo I con benzofenone quale sensibilizzatore.



Schema 2: Foto-ossidazione di un alcol secondario

Un esempio particolare di meccanismo di tipo I si ha quando avviene un trasferimento di elettroni all'ossigeno molecolare. Si forma un superossido, che è facilmente ri-ossidabile a ossigeno molecolare, tuttavia la sua forma protonata, radicale idroperossido ($HOO^{\bullet}$), dismuta a perossido di idrogeno e ossigeno. Il perossido di idrogeno, in presenza di tracce di metalli di transizione, genera radicali idrossilici che promuovono processi di autoossidazione di biomolecole.

$$H_2O_2 + Fe(II) \longrightarrow HO^{\bullet} + OH^{-} + Fe(III)$$
$$\text{Biomolecola}\mathbf{H} + HO^{\bullet} \longrightarrow \text{Biomolecola}^{\bullet} + H_2O$$
$$\text{Biomolecola}^{\bullet} + {}^3O_2 \longrightarrow \text{Biomolecola-}OO^{\bullet} \longrightarrow \text{prodotti}$$

Meccanismo di tipo II - trasferimento di energia

In questo meccanismo l'energia dell'eccitazione elettronica del sensibilizzante viene trasferita dal suo stato di tripletto allo stato di tripletto fondamentale dell'ossigeno, per generare l'ossigeno di singoletto e riportare il sensibilizzante al suo stato fondamentale.

$$\text{Sens}(S_0) \xrightarrow[\text{2. isc}]{\text{1.}h\nu} \text{Sens}(T_1)$$
$$\text{Sens}(T_1) + {}^3O_2 \longrightarrow \text{Sens}(S_0) + {}^1O_2$$
$$A + {}^1O_2 \longrightarrow AO_2$$

A=substrato organico **Sens=sensibilizzante**

Schema 3: Meccanismo di tipo II

La differenza principale tra i due meccanismi risiede nella generazione di ossigeno di singoletto che è caratteristica del meccanismo II. Nell'applicazione della PDT è piuttosto difficile stabilire in modo univoco se la reazione chimica è frutto di un meccanismo I o II. Spesso è presente un contributo di entrambi i meccanismi.

2 SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Durante l'internato di tesi mi sono occupato della produzione di cellulosa nanocristallina a partire da materiale microcristallino e della funzionalizzazione di questa con porfirine. Lo scopo è stato quello di produrre un materiale ibrido in grado di agire da sensibilizzatore in reazioni di foto-ossidazione, in particolare per la produzione di ossigeno di singoletto, potenzialmente impiegabile nella PDT. Ho messo a punto una metodologia di funzionalizzazione della cellulosa nanocristallina che consente di raggiungere un valore di "loading" adeguato a garantire le proprietà spettroscopiche ricercate.

Il lavoro di tesi si è articolato nei seguenti punti:

1) Produzione e caratterizzazione di cellulosa nanocristallina.
2) Carbossilazione della cellulosa nanocristallina e sua caratterizzazione.
3) Sintesi e caratterizzazione di un amino trifenil porfirina trisolfonata ($TPPS_3$-NH_2).
4) Sintesi dell'ibrido cellulosa nanocristallina-$TPPS_3$ mediante coupling tra la funzionalità carbossilica della nanocellulosa e quella amminica della porfirina.
5) Caratterizzazione del materiale e verifica della generazione di ossigeno di singoletto.

Le caratterizzazioni sono state fatte utilizzando varie tecniche spettroscopiche (IR-Uv/Vis-Fluorescenza-MALDI) in congiunzione con l'analisi elementare e l'analisi termica (TGA). La caratterizzazione morfologica è stata realizzata mediante tecniche microscopiche (TEM) e analisi dimensionali (DLS). Le proprietà colloidali del materiale sono state studiate mediante misure di potenziale Zeta. La generazione di ossigeno di singoletto è stata fatta sfruttando reazioni di foto-ossidazione note in letteratura.

3 SINTESI E STRATEGIE DI FUNZIONALIZZAZIONE ADOTTATE

3.1 Cellulosa nanocristallina (NCC)

La NCC è stata prodotta partendo da cellulosa microcristallina fornita dalla Sigma-Aldrich. L'idrolisi acida della cellulosa nativa è stata realizzata con H_2SO_4 62% w/w sotto riscaldamento per 2 ore, secondo quanto descritto in letteratura.[74] L'acido idrolizza preferenzialmente i legami glicosidici tra le unità di glucosio della cellulosa nelle regioni amorfe. Infatti queste regioni non sono impaccate come quelle cristalline e risultano così più esposte all'attacco dell'acido. Il meccanismo d'idrolisi acida è riportato in figura 12.

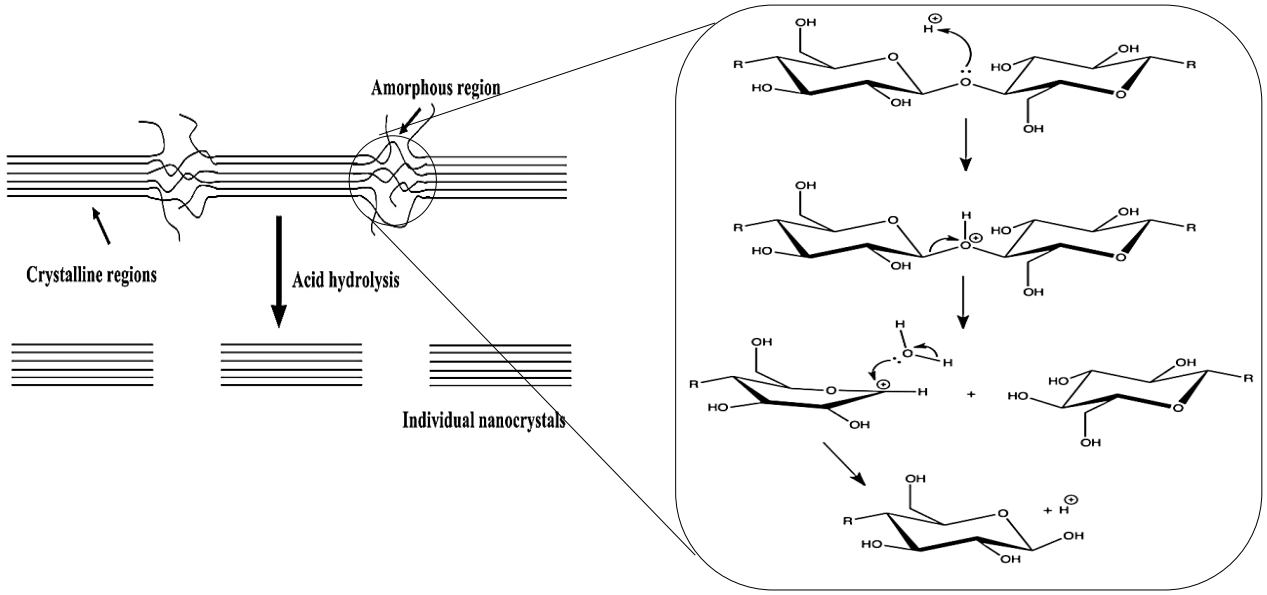


Figura 12: Meccanismo d'idrolisi acida della cellulosa

Durante l'idrolisi le zone amorfe si degradano e il grado di polimerizzazione diminuisce. L'acido, oltre a catalizzare l'idrolisi, è consumato nella reazione di formazione dell'estere solforico tra l'OH primario della cellulosa e l'acido stesso [figura 13]. I nanocristalli di cellulosa risultanti dalla sintesi sono così facilmente sospendibili in ambiente acquoso grazie alla repulsione elettrostatica degli anioni solfato.

La miscela di reazione è piuttosto densa e necessita di un'agitazione efficiente affinché ci

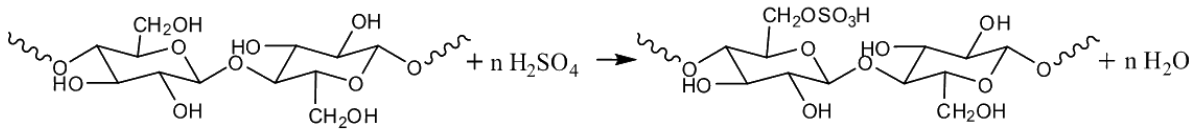
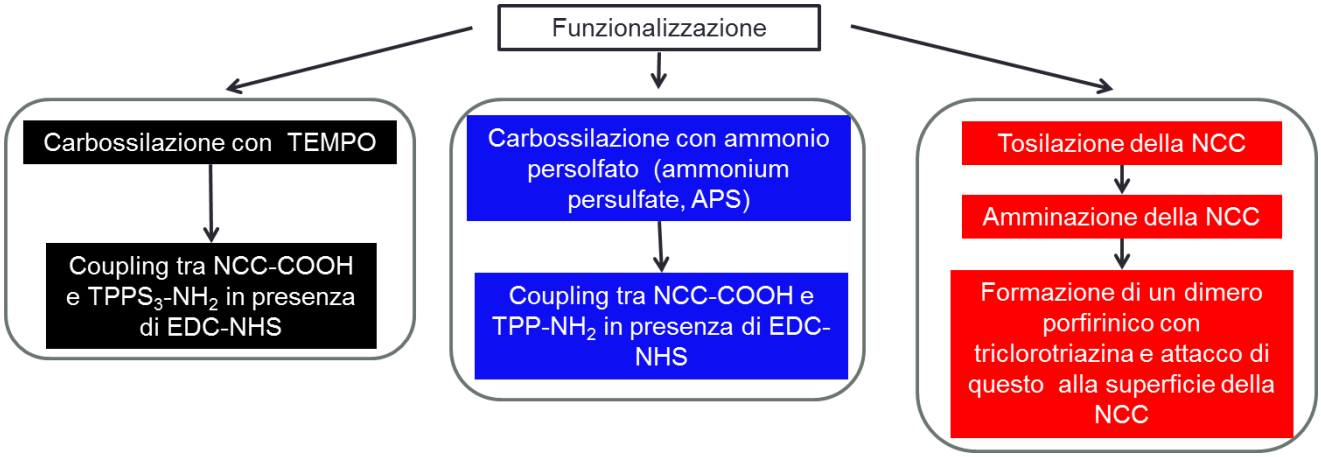


Figura 13: Formazione dell'estere solforico

sia un adeguata dispersione delle fibrille di cellulosa. La sospensione finale di NCC, di colore bianco opaco, è lavata per sospensione in acqua milliQ e ultracentrifugazione quindi

è dializzata per eliminare l'acido residuo, eventuali frammenti o oligomeri del glucosio. Complessivamente la sintesi della NCC presenta una resa del 60%.

Lo schema successivo riporta le strategie di funzionalizzazione della NCC adottate nel corso di questa Tesi.



Inizialmente la NCC è stata funzionalizzata, secondo la via evidenziata in rosso, per introdurre una funzionalità amminica primaria prendendo come riferimento una metodica di funzionalizzazione della cellulosa riportata in letteratura.[75] Attraverso l'NH_2 della NCC, è stato così possibile legare sulla superficie della nanocellulosa un dimero porfirinico costituito da triclorotriazina e 2 molecole di TPP. Purtroppo, questa strategia di funzionalizzazione si è rivelata lunga e laboriosa e non ha fornito un elevato valore di loading della porfirina. Probabilmente, l'uso di un solvente organico (in questo caso il tetraidrofurano) per condurre la reazione con il dimero porfirinico, rende la dispersione della NCC molto difficile limitando la superficie disponibile per la funzionalizzazione. Si è quindi deciso di abbandonare questa via. A questo punto la nostra attenzione è caduta su una pubblicazione recente di Edomond Land et. al.[76] che riporta come il trattamento della cellulosa con ammonio persolfato permetta di ottenere in un solo stadio sia la formazione dei nanocristalli di cellulosa sia l'ossidazione di alcuni gruppi ossidrilici primari a gruppi carbossilici. Poiché questa via sembrava molto convincente, abbiamo provato a riprodurla. Tuttavia, le sospensioni colloidali di NCC-COOH ottenuta in questo modo, si sono dimostrate poco stabili nel tempo, segno che le dimensioni del materiale non erano nanometriche. Inoltre la funzionalizzazione dei gruppi COOH con TPP-NH_2 sfruttando la chimica delle carbodimmidi (EDC-NHS) è risultata poco efficiente (basso loading di porfirina), quindi anche questa via è stata abbandonata. Perciò, si è optato per una funzionalizzazione della NCC con gruppi COOH usando il radicale nitrossido TEMPO,

come ampiamente descritto in letteratura.[63,77,78,79] In questo caso il gruppo COOH è stato fatto reagire con una porfirina solubile in acqua, $TPPS_3$-NH_2, sempre mediata dalla coppia di EDC-NHS, permettendo così di svolgere la reazione in ambiente acquoso.[80] Questa strategia di funzionalizzazione si è rivelata la più efficace e verrà meglio approfondita nei successivi paragrafi.

3.2 Cellulosa nanocristallina carbossilata (NCC-COOH)

La cellulosa nanocristallina è stata funzionalizzata superficialmente ossidando il gruppo alcolico primario OH a gruppo carbossilico COOH tramite il radicale nitrossido 2,2,6,6-tetrametilpiperdina-1-ossile (TEMPO). Il TEMPO, in presenza di NaBr e NaOCl, agisce selettivamente sugli OH primari, lasciando quelli secondari intatti. Si deve notare che la funzionalizzazione avviene solo sulla superficie dei nanocristalli. Inoltre, a causa della simmetria delle catene cellulosiche, solo il 50% degli OH primari superficiali è accessibile [figura 14]. Quindi il grado di ossidazione calcolato sul bulk della NCC non rende bene l'idea della densità di funzionalizzazione superficiale.

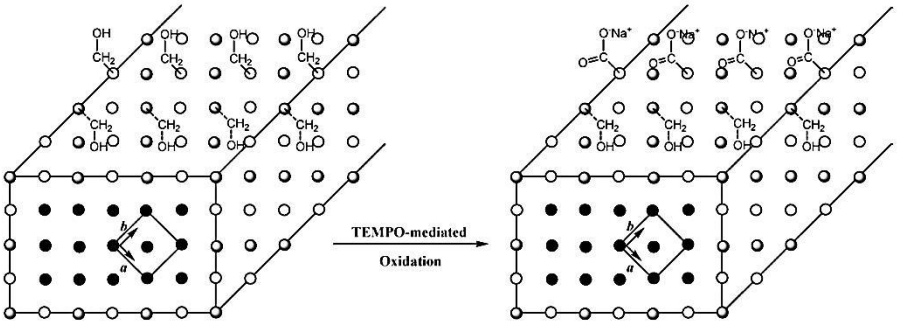
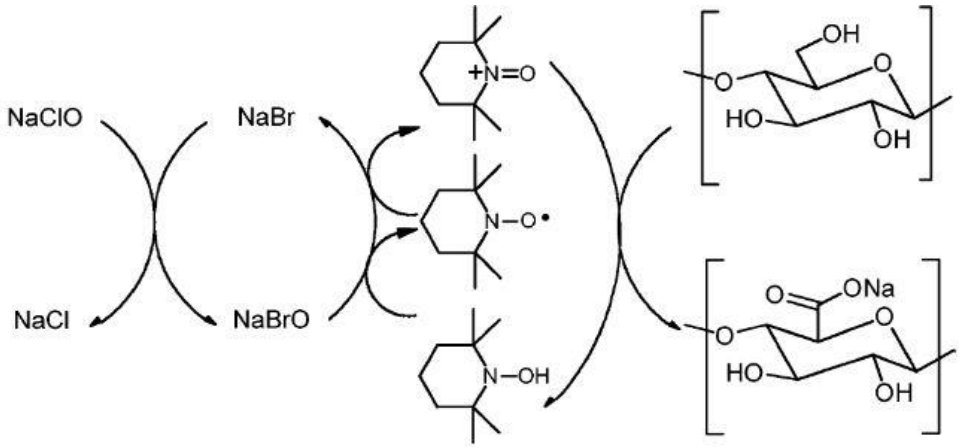


Figura 14: Fibrilla di NCC prima e dopo il trattamento con TEMPO, ○ = unità glucosidiche superficiali accessibili, ● = unità glucosidiche del core cristallino non accessibili, ◍ = unità glucosidiche superficiali non accessibili

La miscela di reazione è mantenuta a temperatura ambiente, sotto costante agitazione e in condizioni basiche (pH=10) per 3 ore, secondo quanto riportato in letteratura.[81] In queste condizioni, l'NaBr viene ossidato dall'NaOCl a NaOBr il quale, a sua volta, ossida il TEMPO con formazione di un radicale che è la specie pertinente a ossidare i gruppi ossidrilici primari a funzioni carbossiliche [schema 4]. La reazione è interrotta aggiungendo etanolo e riportando il pH alla neutralità. La resa della reazione è del 50%. La NCC-COOH sospesa in acqua mostra il dominio birifrangente tipico della NCC e non sedimenta per via della repulsione elettrostatica tra i gruppi carbossilici (che sono deprotonati a pH>6).

Variando il rapporto tra NaOCl e NCC si ottengono differenti gradi di ossidazione e di solubilità del prodotto finale. Tempi prolungati di reazione sono da evitare perché portano ad una diminuzione delle dimensioni dei cristalli dovuta ad un deterioramento della morfologia delle catene cellulosiche .



Schema 4: Ossidazione con TEMPO

3.3 Ammino-tetrafenilporfirina trisolfonata ($TPPS_3$-NH_2)

La porfirina coinvolta nelle reazioni di coupling con il gruppo COOH della NCC è una porfirina sostituita non simmetricamente in una posizione meso. In particolare, una delle quattro posizioni meso dell'anello porfirinico è sostituita con un gruppo acetammido benzenico. La sintesi è stata eseguita con la metodologia di Lindsey la cui stechiometria prevede la reazione del pirrolo con una miscela 3:1 di benzaldeide/para acetammido benzaldeide, in presenza di acido trifluoroacetico (TFA) [figura 15].[82] La reazione viene condotta in cloruro di metilene anidro, in atmosfera di azoto e a temperatura ambiente. L'andamento della reazione è monitorato mediante spettroscopia UV-Vis. A tal proposito, delle aliquote di miscela di reazione sono ossidate con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone (DDQ) per indurre l'aromatizzazione del porfirinogeno. Quando per tempi successivi l'intensità dello spettro porfirinico rimane pressoché costante, la reazione si considera completa e si aggiunge il DDQ alla miscela di reazione, mantenendo costante l'agitazione per 1 ora. La reazione viene arrestata aggiungendo trietilammina.

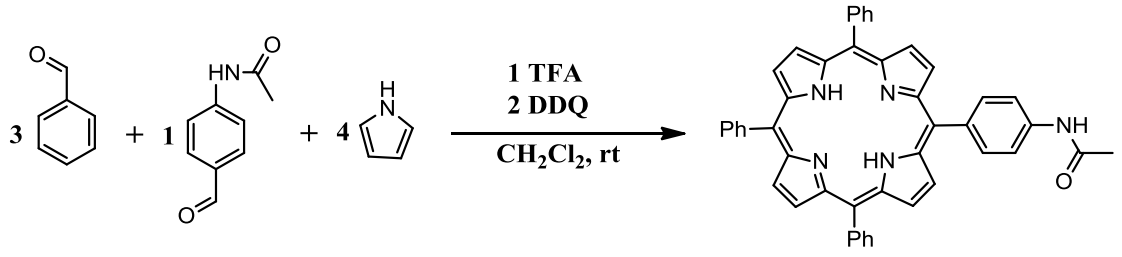
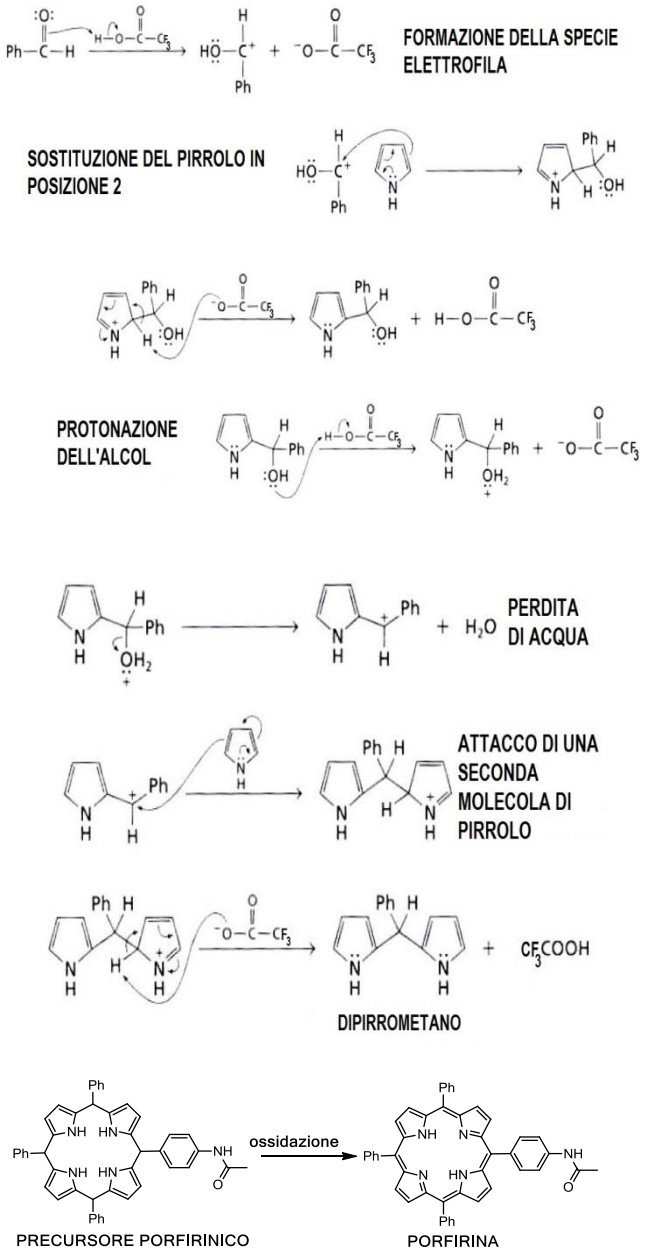


Figura 15: Condensazione pirrolo – aldeide

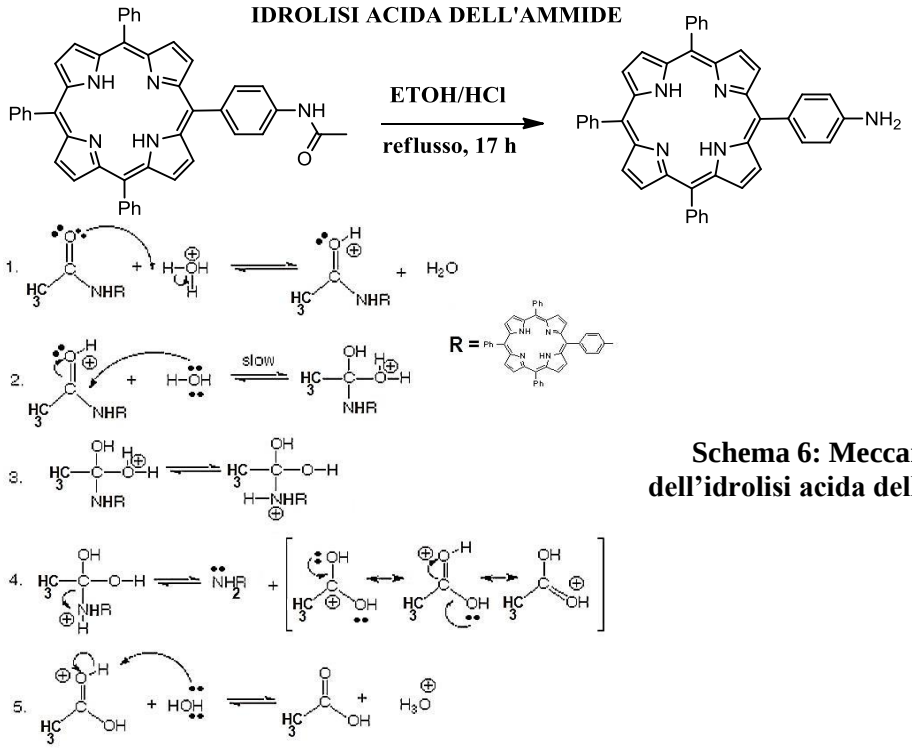
Il meccanismo con cui avviene la reazione è riportato nello schema 5. Il pirrolo subisce l'attacco elettrofilo da parte del TFA, avviene così una sostituzione elettrofila aromatica in posizione 2 sul pirrolo. Si forma un alcol che è protonato dal TFA e, a seguito della perdita di acqua, diventa il nuovo elettrofilo in grado di attaccare un'altra molecola di pirrolo. Si crea un dipirrometano.

Con lo stesso meccanismo due molecole di dipirrometano reagiscono con una molecola di benzaldeide e una di acetammido benzaldeide per formare il precursore porfirinico ciclico.



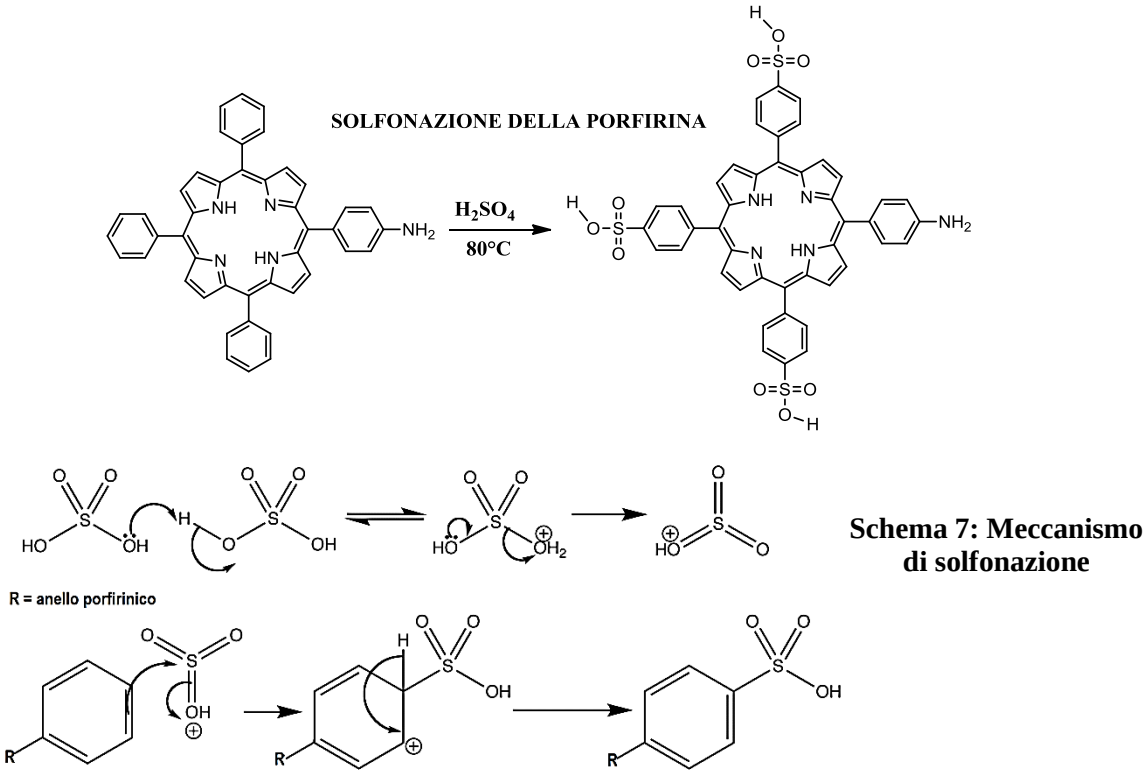
Schema 5: Meccanismo di formazione della porfirina

La reazione porta ad una miscela di prodotti isomerici attesi. Infatti, se indichiamo la benzaldeide con “A” e l’acetammido benzaladeide con “B”, le porfirine sostituite ottenibili sono: A_4, A_3B (molecola target della sintesi), trans-A_2B_2, cis-A_2B_2, AB_3 e B_4. La miscela di reazione è filtrata su imbuto Büchner per rimuovere degli oligomeri aperti insolubili; il filtrato viene purificato con due colonne cromatografiche. La prima colonna è eluita con cloruro di metilene e permette di separare la frazione tetrasostituita TPP (A_4), presente in maggiore quantità. La seconda colonna è eluita con una miscela di cloruro di metilene/etile acetato 80:20 e permette di separare il prodotto A_3B da tutte le altre specie. La natura del prodotto è verificata attraverso lo spettro di massa MALDI (vedi MALDI 1 in appendice), che mostra i picchi attesi a 672,3 [M+1], 673,3 [M+2], 674,3 [M+3]. Il gruppo ammidico dell’addotto porfirinico viene poi idrolizzato in ambiente acido con HCl 37%. La reazione richiede riscaldamento a riflusso per 2 giorni, secondo quanto riportato in letteratura.[82] Il meccanismo è rappresentato nello schema 6. La fase organica della miscela di reazione viene estratta con cloruro di metilene e sottoposta a lavaggi con acqua e $NaHCO_3$. Si elimina l’acqua residua con Na_2SO_4 e il prodotto viene ottenuto per separazione cromatografica della fase organica. L’eluente impiegato è cloruro di metilene. Lo spettro MALDI (vedi MALDI 2 in appendice) conferma la natura del prodotto attraverso i picchi 629,3 [M^+], 630,3 [M+1], 631,3 [M+2].



Schema 6: Meccanismo dell’idrolisi acida dell’ammide

Il passaggio finale della sintesi riguarda la solfonazione della porfirina. Essa è stata eseguita con H_2SO_4 95-98%, scaldando a 80 °C, sotto agitazione per 3 giorni.[83] Il meccanismo della reazione è riportato nello schema 7.

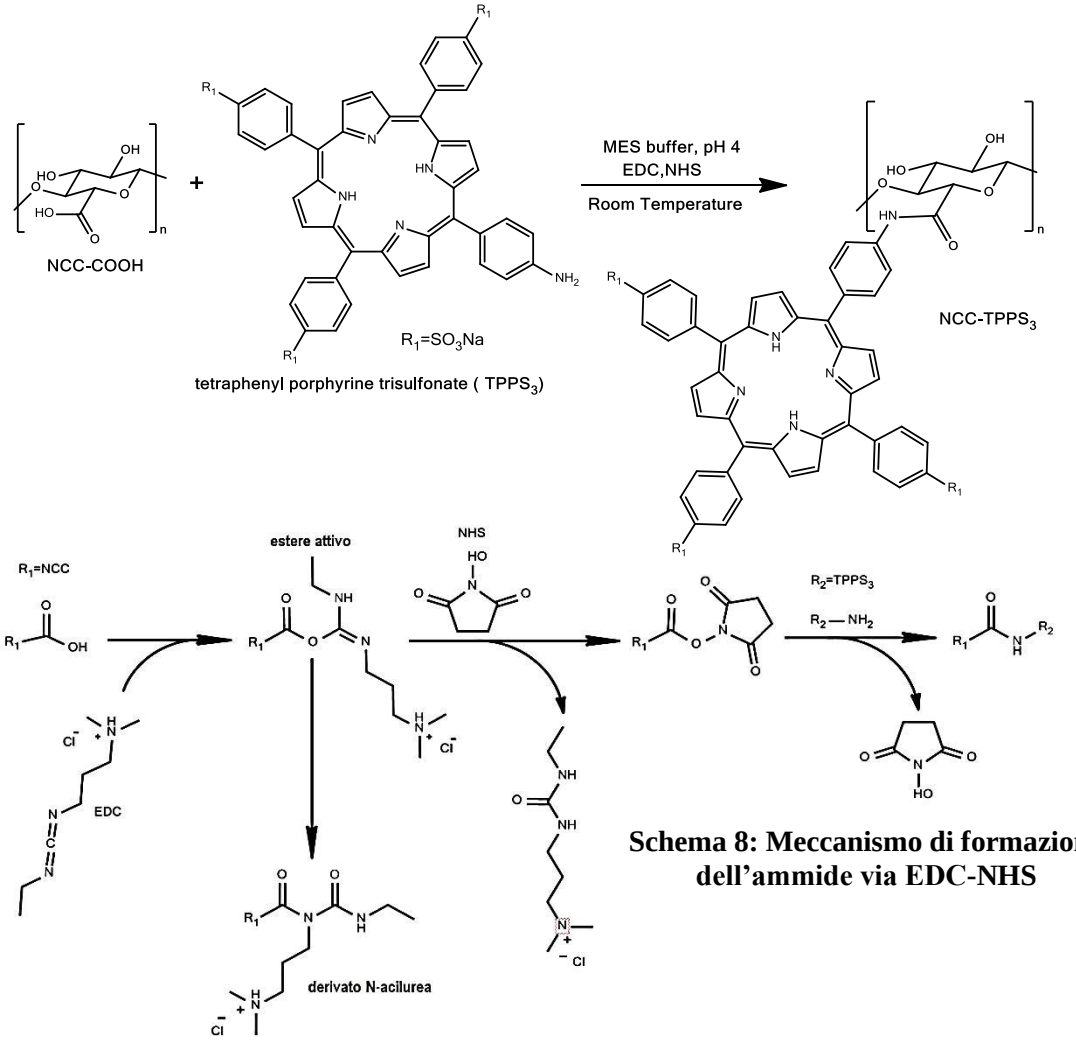


Schema 7: Meccanismo di solfonazione

La reazione è fermata per diluizione con acqua ed il prodotto viene lavato con acqua e centrifugato. L'acidità residua è eliminata aggiungendo NH_4OH 33%. Lo spettro di massa MALDI (vedi MALDI 3 in appendice) conferma la natura del prodotto attraverso il picco a 870,3 [M+1]. Per ottenere la forma sodica della porfirina è stata impiegata una resina a scambio ionico, Amberlist 15 fornita in forma acida dalla Sigma-Aldrich, precedentemente caricata con una soluzione satura di NaCl. Il prodotto, disciolto in acqua, è stato posto a contatto con la resina sotto agitazione per mezz'ora, quindi filtrato per eliminare la resina e seccato facendo evaporare il solvente con evaporatore rotante. Il solido è di colore rosso scuro con riflessi verdi. Complessivamente la sintesi della $TPPS_3$-NH_2 ha una resa del 4,6%.

3.4 Ibrido cellulosa nanocristallina-tetrafenilporfirina trisolfonata ($NCC-TPPS_3$)

Per legare covalentemente la $TPPS_3$-NH_2 alla superficie della NCC si è sfruttata la formazione dell'estere attivo mediante il gruppo COOH, alla presenza di EDC·HCl e NHS. L'EDC è una carbodimmide che reagisce con l'acido carbossilico per formare un estere attivo. Quest'ultimo possiede un buon gruppo uscente e reagisce con l'NHS per formare un derivato succinimmidico che è in grado di reagire con l'ammina della porfirina per generare l'ammide. L'NHS si comporta da catalizzatore della reazione ed evita che l'estere attivo evolva al derivato stabile N-acilurea. La reazione, il cui meccanismo è rappresentato nello schema 8, avviene a temperatura ambiente, in un tampone di acido 2-(N-morfolino) etansolfonico a pH 4 e sotto costante agitazione per 4 giorni.[80]



Schema 8: Meccanismo di formazione dell'ammide via EDC-NHS

Il prodotto, separato dalla miscela di reazione per centrifugazione, è poi lavato con acqua milliQ e posto in dialisi per eliminare eventuali impurezze. La reazione ha una resa del 45% e il prodotto solido ottenuto per liofilizzazione è di colore verde.

3.5 Metallazione con $Zn(OAc)_2$ dell'Ibrido cellulosa nanocristallina tetrafenilporfirina trisolfonata (NCC-TPP(Zn)S_3)

La reazione avviene miscelando una sospensione di NCC-TPPS_3 in metanolo con una soluzione satura di $Zn(OAc)_2$ [figura 16]. E' richiesto un leggero riscaldamento (30°C) e un' agitazione continua fino a quando lo spettro di assorbimento UV-Vis del composto metallato non varia più (shift della Soret Band e comparsa di due Q bands). Si tratta di una reazione che avviene con relativa facilità ed impiega solitamente un paio d'ore. Il prodotto della reazione è separato dalla miscela per centrifugazione e lavato varie volte con metanolo e acqua milliQ per poi essere liofilizzato. La reazione ha una resa del 85.8% e il prodotto solido è di colore verde.

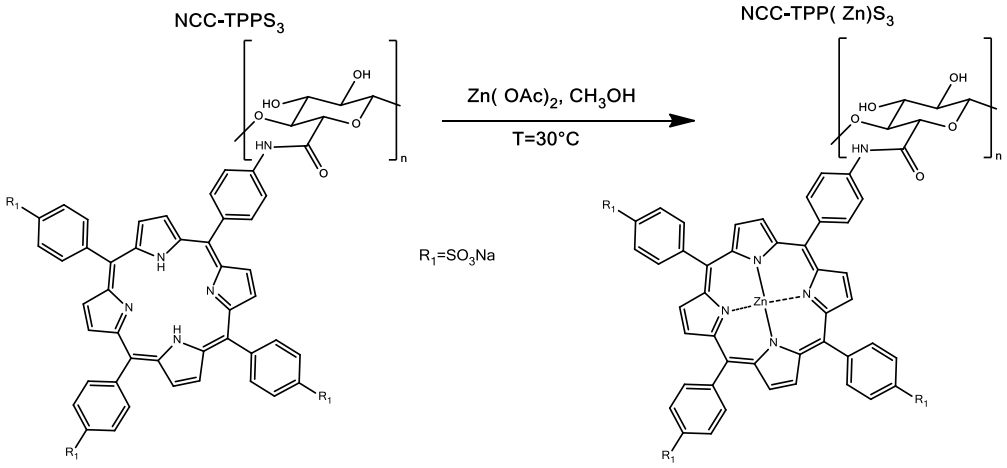
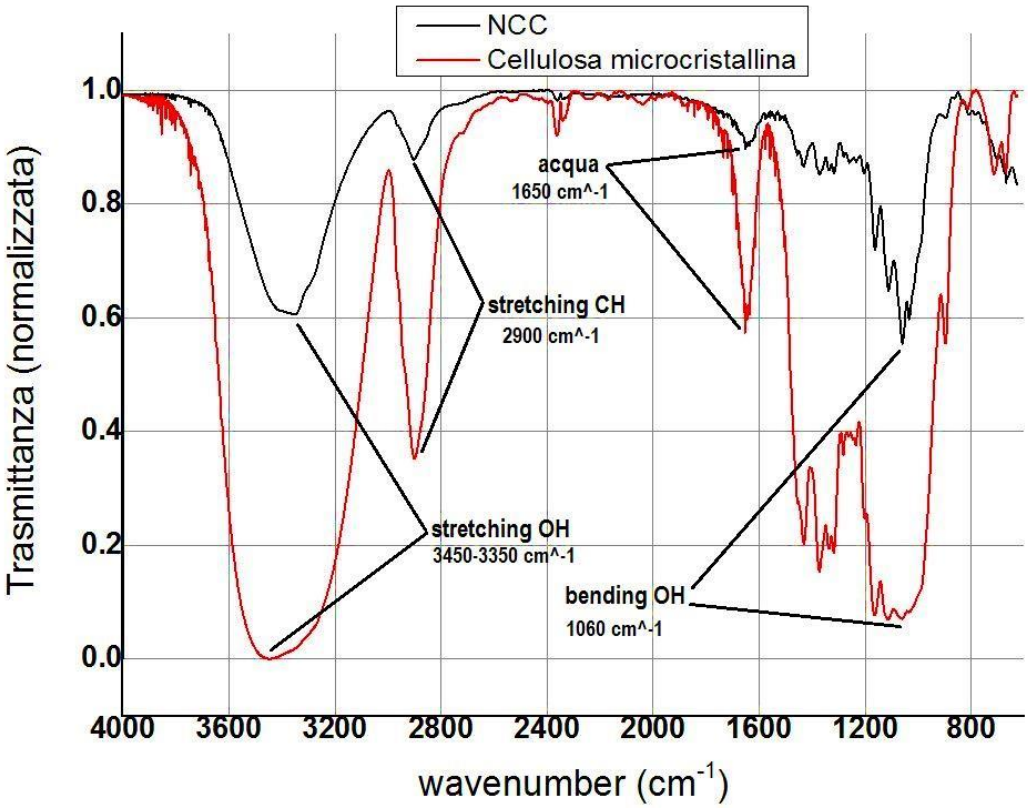


Figura 16: Reazione di metallazione con $Zn(OAc)_2$ della NCC-TPPS_3

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratterizzazione della NCC

La sospensione acquosa di NCC, ottenuta dall'idrolisi, è stata centrifugata per ridurne il volume e lavata con acqua milliQ per diminuirne l'acidità. Infine la sospensione è stata posta in dialisi in acqua corrente per 6 giorni e in acqua milliQ per 2 giorni. La NCC solida di colore bianco, ottenuta dopo liofilizzazione, ha uno spettro IR molto simile a quello della cellulosa microcristallina di partenza [IR-1].



IR-1: Spettri IR della NCC e della cellulosa microcristallina (entrambi registrati con pastiglia di KBr)

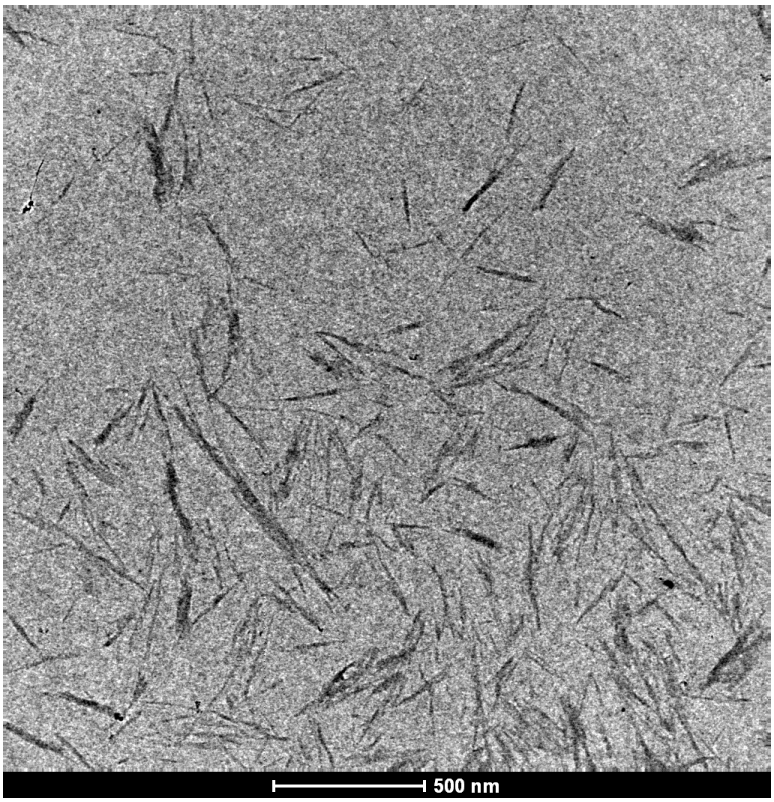
In particolare, il campione NCC non mostra i segnali riguardanti lo stretching del gruppo solfonico $-SO_2-$. Probabilmente ciò è dovuto a una formazione limitata dell'estere solforico sulla superficie della NCC. Questa osservazione è confermata anche dall'analisi elementare della NCC che fornisce un contenuto di zolfo molto basso.

ANALISI ELEMENTARE	
Campione: cellulosa microcristallina Sigma-Aldrich	
C (%)	42,89
H (%)	6,62
N (%)	/
S (%)	/
Campione: NCC	
C (%)	39,75
H (%)	6,47
N (%)	/
S (%)	0,54

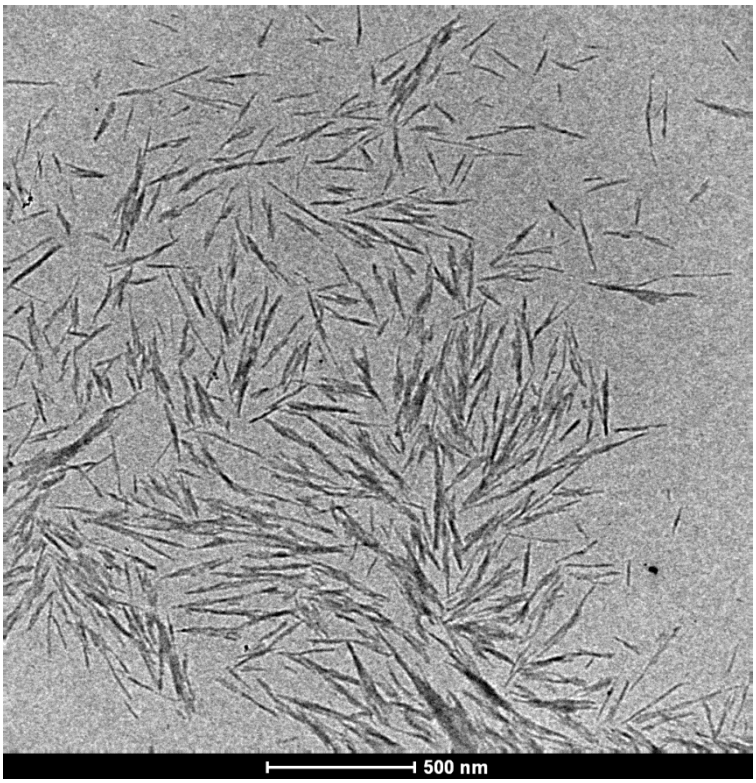
La misura del potenziale Z delle sospensioni acquose di NCC (0.53 mg/mL) ha fornito un valore medio di (-14.1±0.8) mV, indice della presenza di una carica negativa dovuta all'anione solfato sulle particelle di NCC. Lo studio morfologico delle dimensioni delle particelle di NCC è stato compiuto mediante TEM e DLS. Le misure di DLS sono state fatte con lo strumento Malvern Zetasizer Nanoseries. Poiché questa tecnologia si presta per eseguire misure su campioni costituiti da particelle sferiche, i valori ottenuti per i nanocristalli sono da intendere come raggi idrodinamici i quali, tra l'altro, tengono anche conto della sfera di idratazione. Le misure di DLS hanno fornito un diametro medio di (103.9 ± 9.0) nm.

Per l'analisi TEM è stata utilizzata una sospensione di NCC in acqua (0.34 mg/mL); le immagini ricavate mostrano la morfologia filiforme caratteristica delle fibrille di NCC inoltre si nota che esse sono relativamente poco aggregate [NCC-TEM 1-4].

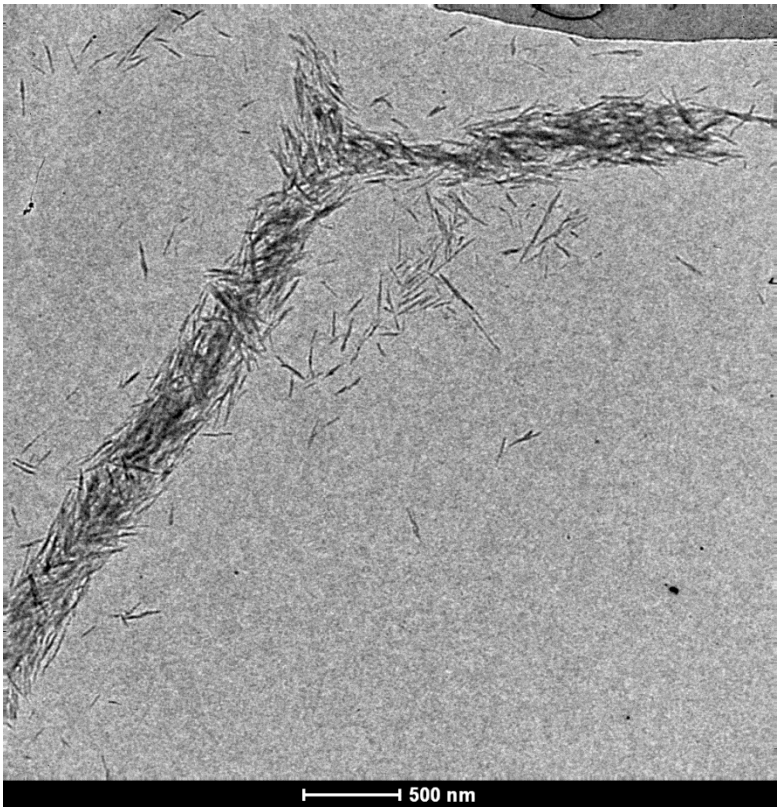
NCC-TEM 1



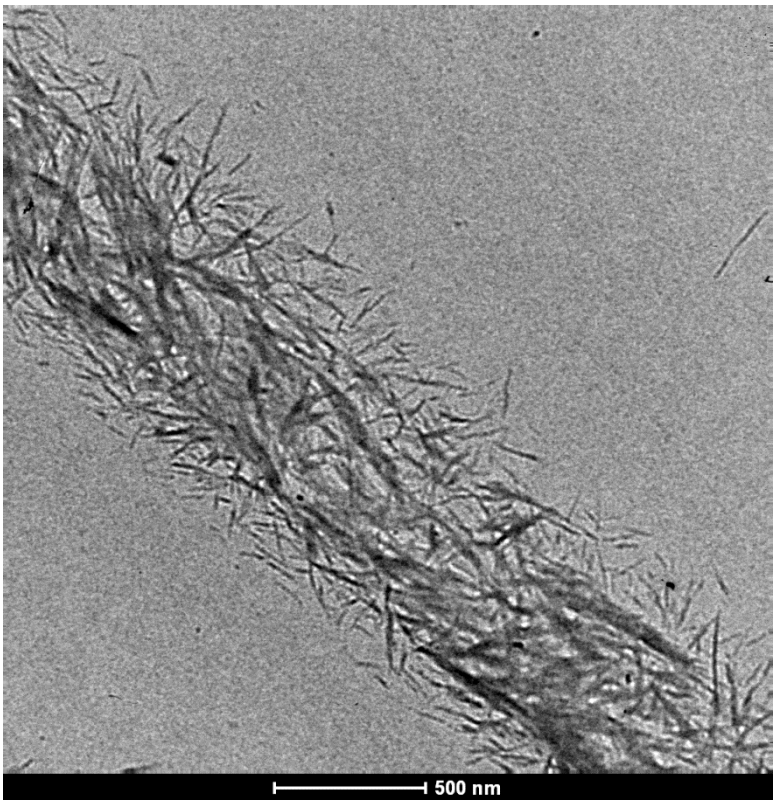
NCC-TEM 2



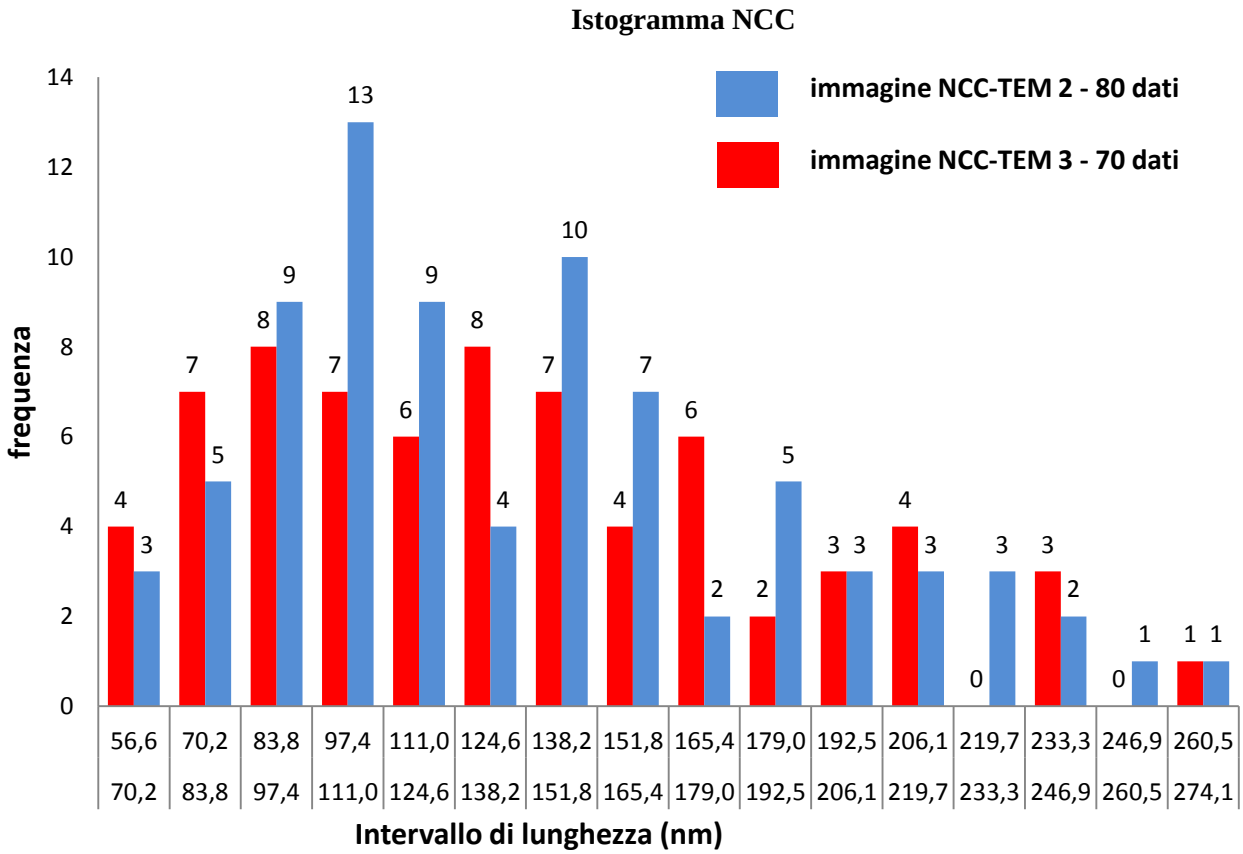
NCC-TEM 3



NCC-TEM 4

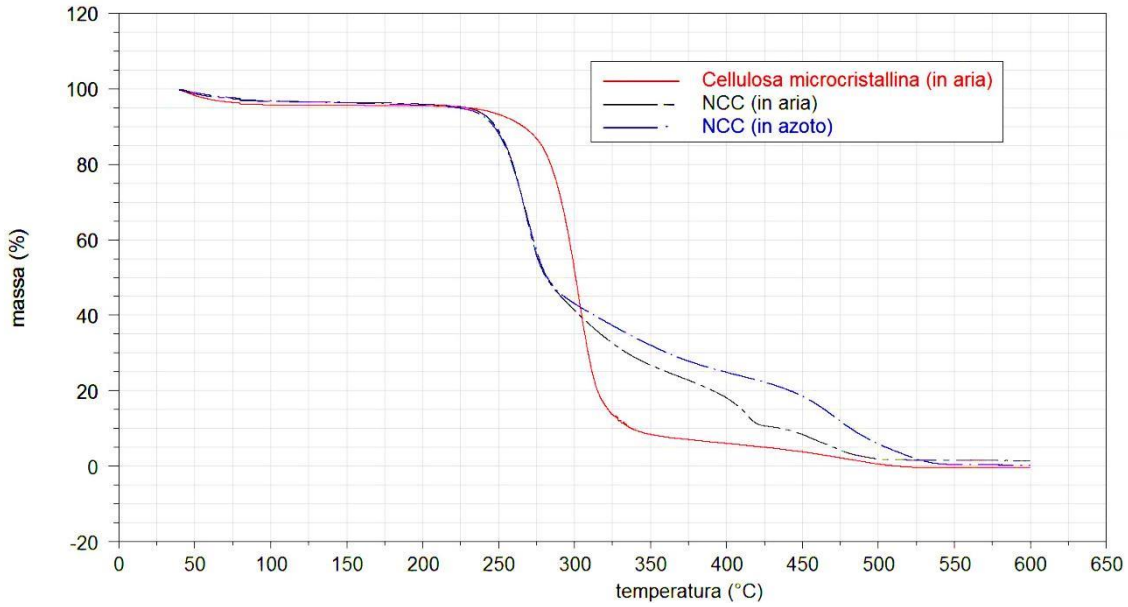


Le immagini NCC-TEM 2 e NCC-TEM 3 sono state utilizzate per fare un'analisi dimensionale mediante il programma ImageJ. Il programma ha consentito di misurare le lunghezze delle fibrille e creare così un istogramma di distribuzione delle lunghezze dei nanocristalli [Istogramma NCC].



La media aritmetica delle misure dell'istogramma rosso (immagine NCC-TEM 3) e dell'istogramma blu fornisce rispettivamente i valori (137±46) nm e (139±39) nm. Il numero di dati non è sufficientemente elevato per condurre un'analisi statistica tuttavia conferma il range nanometrico delle fibrille di NCC, inoltre i dati sono conformi ai valori di letteratura.[84]

L'analisi termogravimetrica della NCC mostra una diminuzione della stabilità termica di questa rispetto al materiale cellulosico microcristallino di partenza. La cellulosa ha una temperatura di decomposizione termica di circa 275 °C mentre la NCC ha un valore di circa 250 °C e la decomposizione di quest'ultima avviene in più stadi. Di seguito è riportato il termogramma [TGA-1] relativo alla cellulosa microcristallina e alla NCC in azoto e in aria.



TGA-1: Termogramma della NCC e della cellulosa microcristallina

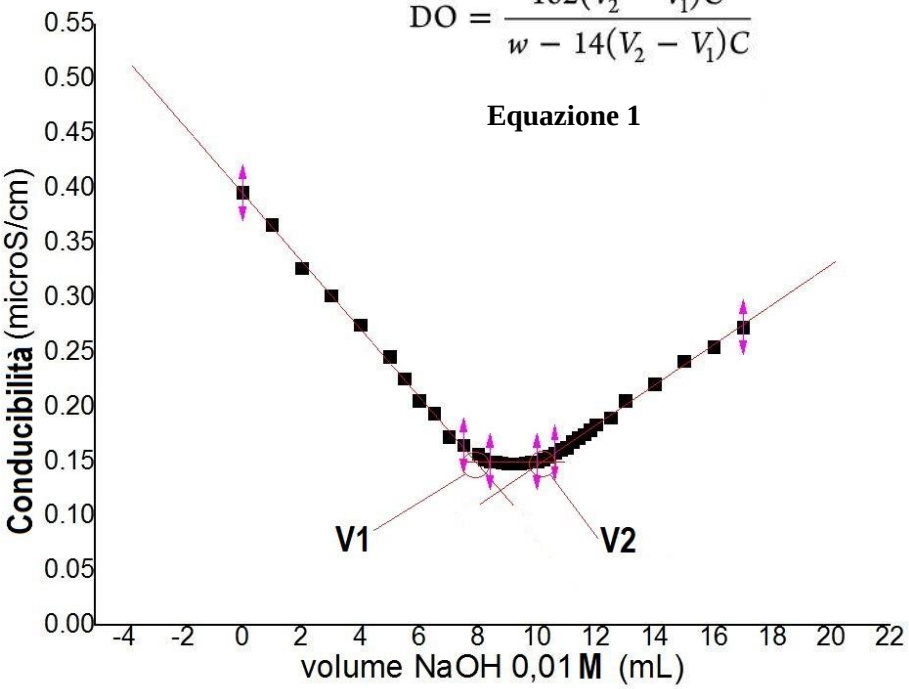
4.2 Caratterizzazione della NCC-COOH

La prima sintesi della NCC-COOH è stata realizzata in triplicato (pallone 1, pallone 2 e pallone 3) in contemporanea, con le stesse condizioni di reazione. La sospensione di NCC-COOH di ogni pallone, dopo essere stata separata dalla miscela di reazione per centrifugazione, è stata sottoposta a 3 lavaggi con acqua milliQ e relative centrifugazioni. Durante la fase dei lavaggi, buona parte del prodotto è rimasta sospesa nel surnatante anche dopo la centrifugazione per cui si è deciso di liofilizzare le acque di lavaggio assieme al prodotto puro (nelle sintesi successive della NCC-COOH, si è deciso di utilizzare miscele etanolo:acqua 1:1 per lavare la sospensione in modo da ridurre le perdite di prodotto). Al termine della liofilizzazione di ogni pallone, è stato calcolato il grado di ossidazione (degree of oxidation, D.O.), espresso come mmol di COOH/g di NCC, mediante titolazione conduttimetrica. A tale proposito, la NCC-COOH è stata miscelata con un volume noto di HCl 0.01 M e titolata con NaOH 0.01 M. La variazione della conducibilità della soluzione, registrata attraverso un conduttimetro, ha portato alla curva di titolazione [TIT 1]. La curva mostra 3 tratti di diversa pendenza. Nel primo tratto, con pendenza negativa, la conducibilità diminuisce a causa della titolazione da parte dell'NaOH dell'acido forte (HCl) in eccesso. Nel secondo tratto, la conducibilità cambia poco in quanto avviene la titolazione dell'acido

debole (COOH). Nell'ultimo tratto, con pendenza positiva, la conducibilità aumenta a causa dell'eccesso di NaOH che è aggiunto.

$$DO = \frac{162(V_2 - V_1)C}{w - 14(V_2 - V_1)C}$$

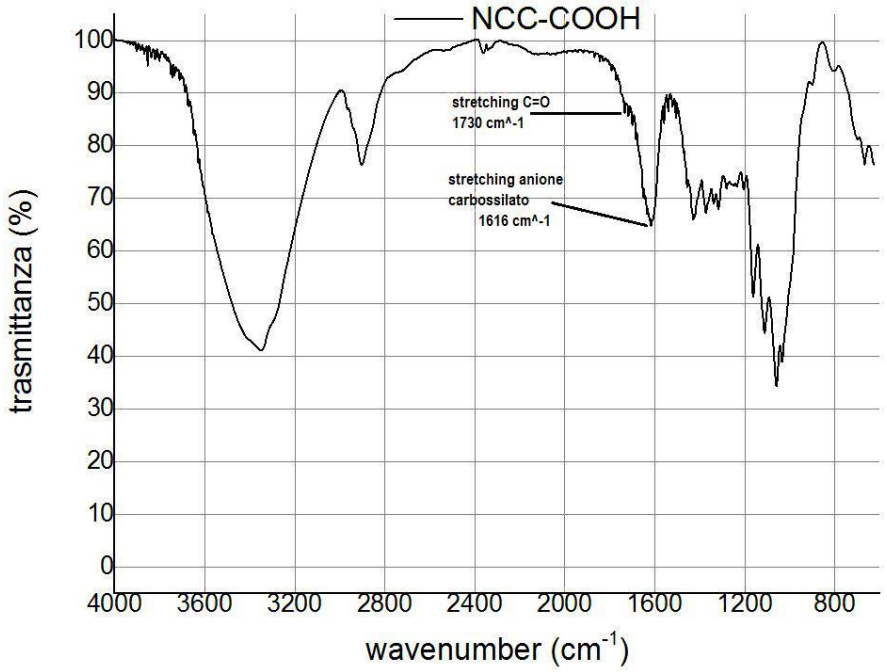
Equazione 1



TIT 1: Curva di titolazione della NCC-COOH

Il valore del D.O. si ottiene attraverso l'equazione 1 nella quale 162 è il PM dell'unità glucosidica, C è la concentrazione della base utilizzata (0.01 M), w è la massa in grammi di campione analizzato e 14 è la differenza tra il PM dell'unità glucosidica e il PM dell'unità glucosidica con l'OH primario ossidato a COOH. V_1 e V_2 sono i volumi (L) corrispondenti all'inizio e fine del tratto orizzontale. La titolazione eseguita su campioni di NCC-COOH ha fornito un valore medio di D.O. pari a 0.82 mmol COOH/g NCC.

Lo spettro IR della NCC-COOH [IR-2] ha confermato la presenza del gruppo carbossilico. Nello spettro sono visibili i picchi riguardanti il gruppo COOH: stretching C=O 1730 cm^{-1} e stretching anione carbossilato 1616 cm^{-1}. La NCC-COOH solida, ottenuta dal processo di sintesi, possiede gruppi carbossilici che in parte sono nella loro forma satura e in parte deprotonati. La deprotonazione può avvenire in fase di preparazione della pastiglia di KBr: probabilmente l'umidità del campione, unita all'elevata pressione della pastigliatrice e alla presenza del sale KBr, porta alla formazione del composto NCC-COOK. Inoltre potrebbe essere presente una frazione di NCC-COONa, dovuta a ioni Na^+ residui dei reagenti di sintesi.

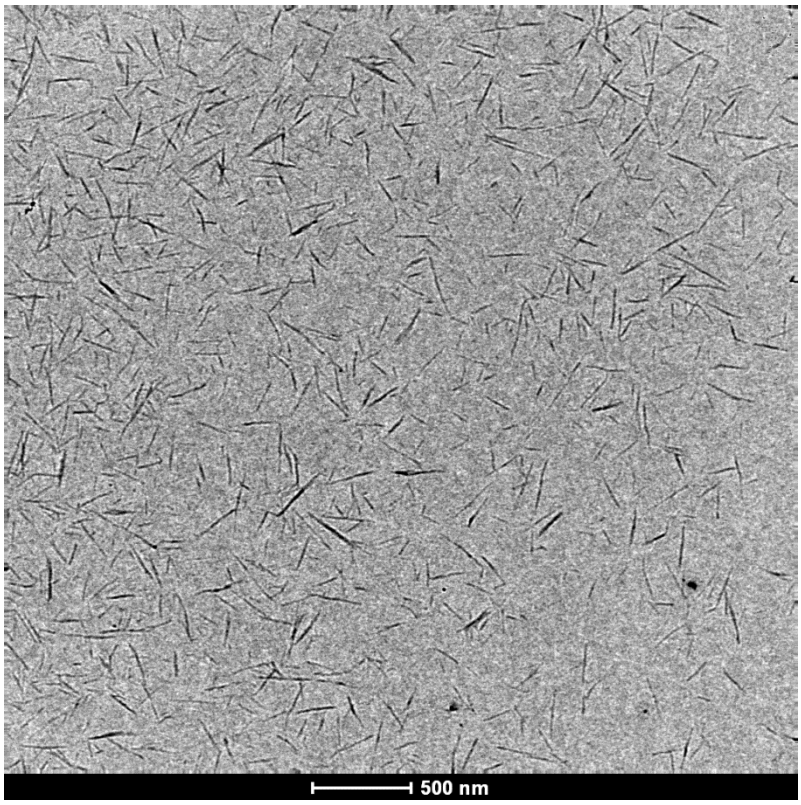


IR-2: Spettro IR della NCC-COOH (registrato con pastiglia di KBr)

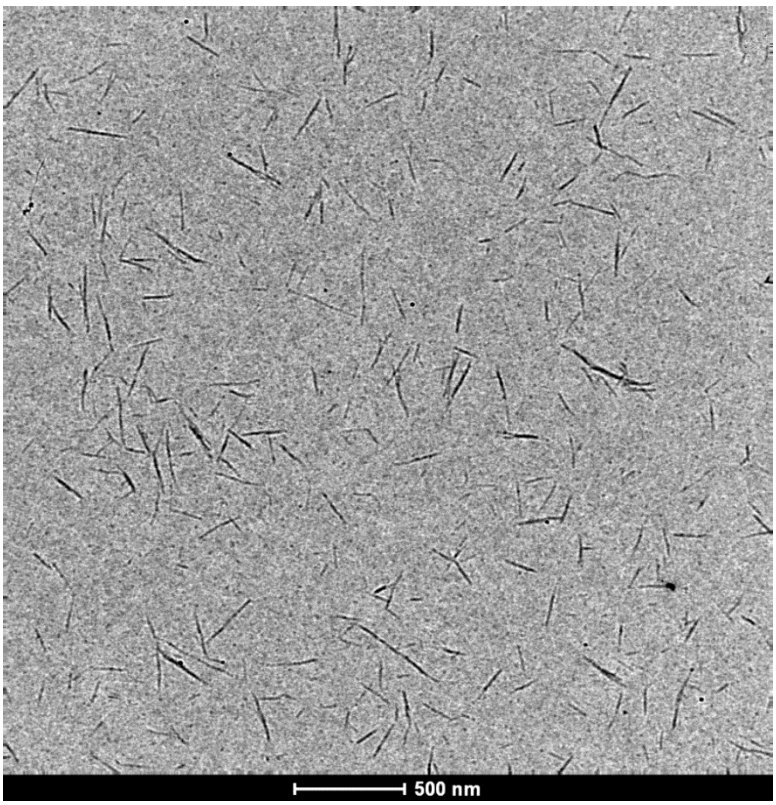
I gruppi carbossilici conferiscono un'elevata stabilità alla sospensione in ambiente acquoso, in particolare le misure del potenziale Z per un campione di NCC-COOH (0.54 mg/mL in acqua) forniscono un valore medio assoluto elevato (-33±1) mV, condizione ideale per aver sospensioni stabili nel tempo. La carica riscontrata è ascrivibile ai soli gruppi carbossilici in quanto le condizioni basiche di sintesi della NCC-COOH portano all'idrolisi degli esteri solforici. Le misure di DLS forniscono un diametro medio di (125.3 ± 8.0) nm, più grande rispetto al corrispondente del campione di NCC.

Per l'analisi TEM è stata utilizzata una sospensione acquosa di NCC-COOH (0.53 mg/mL). Le immagini mostrano come i nanocristalli siano ben dispersi [NCC-COOH 1-2]. Questo fatto rende più agevole la misurazione delle lunghezze di ogni fibrilla, e dimostra che la modificazione chimica della NCC non ne modifica la morfologia.

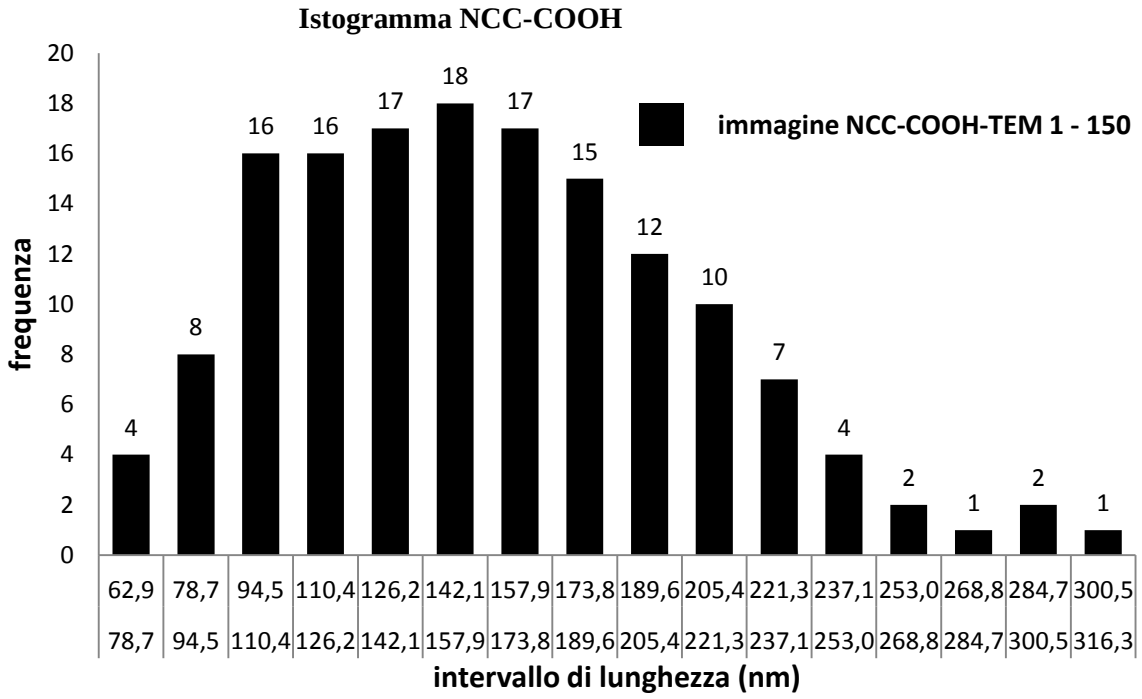
NCC-COOH-TEM 1



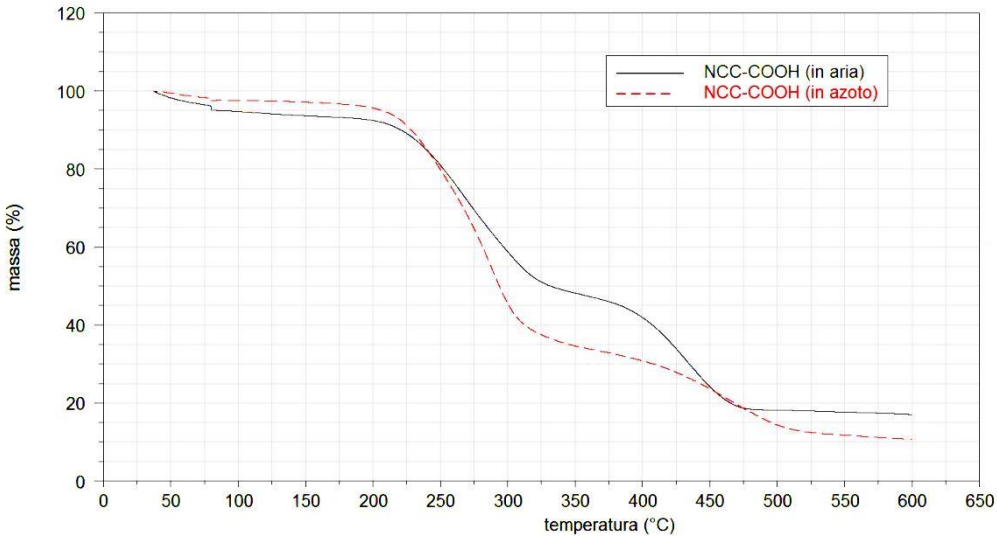
NCC-COOH-TEM 2



L'immagine NCC-COOH-TEM 1 è stata utilizzata per creare l'istogramma delle lunghezze [istogramma NCC-COOH].



La media aritmetica delle misure del campione fornisce un valore di (159±50) nm, simile al valore medio ottenuto per il campione NCC. Si può quindi affermare che le dimensioni medie del prodotto NCC e NCC-COOH siano equivalenti. Il numero sufficientemente grande di dati analizzati (150) consente di intravedere nel grafico di distribuzione una forma gaussiana piuttosto ampia (deviazione standard elevata). Il termogramma del campione di NCC-COOH [TGA-2] mostra una diminuzione della stabilità termica di questa rispetto alla NCC poiché la temperatura di decomposizione termica passa dai 250 °C della NCC ai circa 225 °C. La curva registrata in aria risulta nel tratto finale più alta rispetto alla stessa registrata in azoto. Ciò potrebbe essere indice della formazione di ossidi (es. NaO dal sale sodico del gruppo carbossilico) a partire da impurezze del campione.



TGA-2 Termogramma della NCC-COOH (registrato in aria e in azoto)

4.3 Caratterizzazione della NCC-$TPPS_3$

La sintesi di NCC-$TPPS_3$ è avvenuta utilizzando una quantità in moli di EDC·HCl e di NHS 10 volte maggiore rispetto alle moli di gruppi COOH della NCC per favorire la reazione di coupling. Inoltre, essendo limitata la quantità di porfirina a nostra disposizione (a causa della bassa resa di sintesi) abbiamo preferito usare una quantità di $TPPS_3$ inferiore rispetto a quella stechiometrica richiesta. Malgrado ciò, a fine reazione si constata la presenza di porfirina non reagita. Per verificare la natura del prodotto abbiamo registrato lo spettro di assorbimento UV-Vis e quello di fluorescenza. Tali analisi sono state fatte anche in presenza della (2,3,6-tri-o-metil)-β-ciclodestrina (TMβCD), noto complessante delle porfirine. L'utilizzo di quest'ultima è servito non solo a verificare l'effettiva presenza della porfirina sulla superficie nanocellulosica ma anche a mettere in risalto alcune proprietà del prodotto, utili ai fini di una sua potenziale applicazione nella PDT.

La β-ciclodestrina è un oligosaccaride ciclico, formato da 7 unità glucopiranosiche legate fra loro mediante legame glicosidico α-1,4 [figura 17]. In generale le ciclodestrine hanno una struttura la cui forma è tronco-conica, con una cavità interna idrofobica e la superficie esterna idrofilica. Ciò le rende adatte a creare complessi di inclusione con varie molecole che abbiano porzioni idrofobiche di dimensioni compatibili con la cavità della ciclodestrina. Anche le porfirine, in particolare sostituite in posizione meso con gruppi arilici, possono formare complessi di inclusione con varie stechiometrie. Questi complessi, oltre ad avere proprietà fotofisiche e fotochimiche differenti, evitano il fenomeno dell'aggregazione π-π tra porfirine che generalmente causa un quenching delle proprietà di luminescenza.

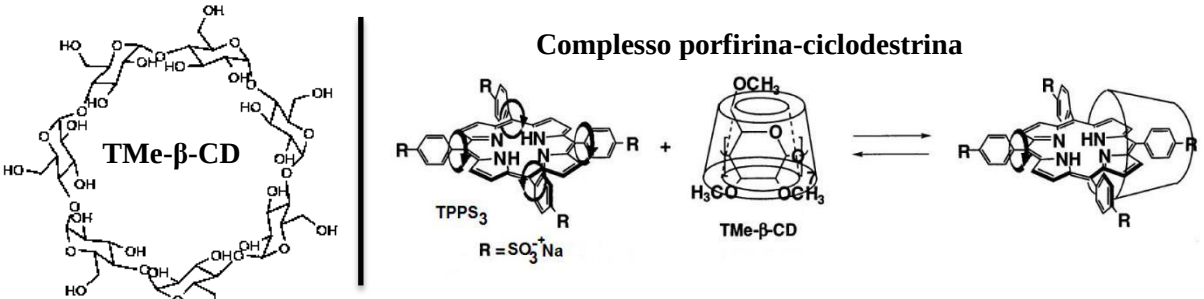
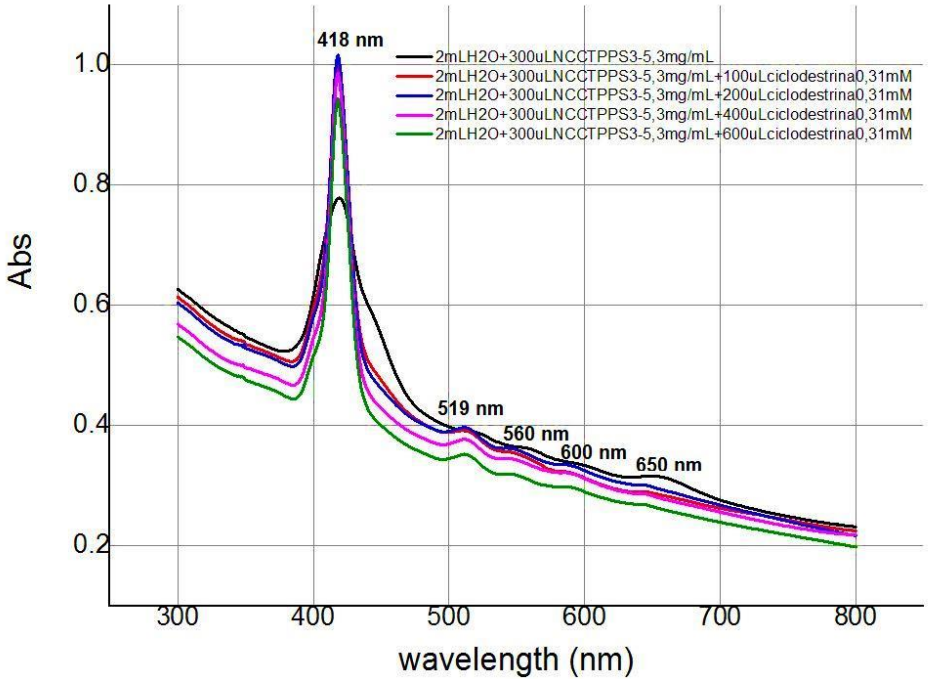


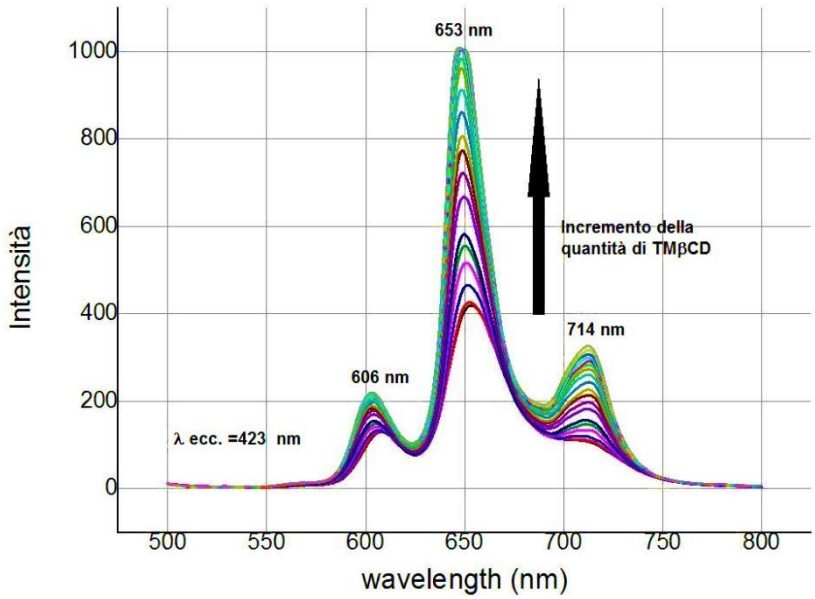
Figura 17: Struttura ciclodestrina e formazione del complesso con la porfirina

Lo spettro UV-Vis della NCC-$TPPS_3$ [UV-Vis 1] è stato ottenuto utilizzando una sospensione acquosa (0.25 mg/mL). Durante l'analisi sono state aggiunte quantità crescenti di TMβCD 0.31 mM. Per lo spettro di fluorescenza [fluorescenza-1] è stata impiegata una sospensione acquosa di NCC-$TPPS_3$ (0.052 mg/mL).



UV-Vis 1: Spettro di assorbimento UV-Vis della NCC-TPPS$_3$

Nello spettro UV-Vis 1 sono visibili i due assorbimenti caratteristici del macrociclo porfirinico: la Soret band a 418 nm e le 4 Q-bands a 519 nm, 560 nm, 600 nm e 650 nm. La formazione del complesso d'inclusione con la TMβCD porta ad un incremento dell'intensità della Soret band, anche se la presenza del fenomeno di scattering della radiazione luminosa, dovuto al fatto che si tratta di una sospensione colloidale piuttosto che di una soluzione omogenea, non permette di visualizzare bene tale interazione. Invece, nello spettro di fluorescenza, che risulta essere immune allo scattering, l'incremento regolare della fluorescenza per effetto dell'aggiunta di ciclodestrina è inequivocabile



Fluorescenza-1: Spettro di fluorescenza della NCC-TPPS$_3$

Nello spettro di fluorescenza-1 le bande a 653 nm e 714 nm rappresentano rispettivamente le transizioni elettroniche Q(0-0) e Q(0-1), entrambe transizioni allo stato elettronico fondamentale ($S_1 \rightarrow S_0$).[85] Non è chiara l'attribuzione della banda a 606 nm, tipica della forma metallata con Zn. Probabilmente la sua presenza è attribuibile al pH della soluzione che non è stato tamponato e che secondo alcuni lavori di letteratura influenza la forma delle bande dello spettro fluorescenza della porfirina.[86] L'intensità massima di fluorescenza, registrata a 653 nm, si ottiene in presenza di 150 µL di TMβCD, corrispondenti ad una concentrazione di TMβCD pari a 0,021 mM [Grafico 1].

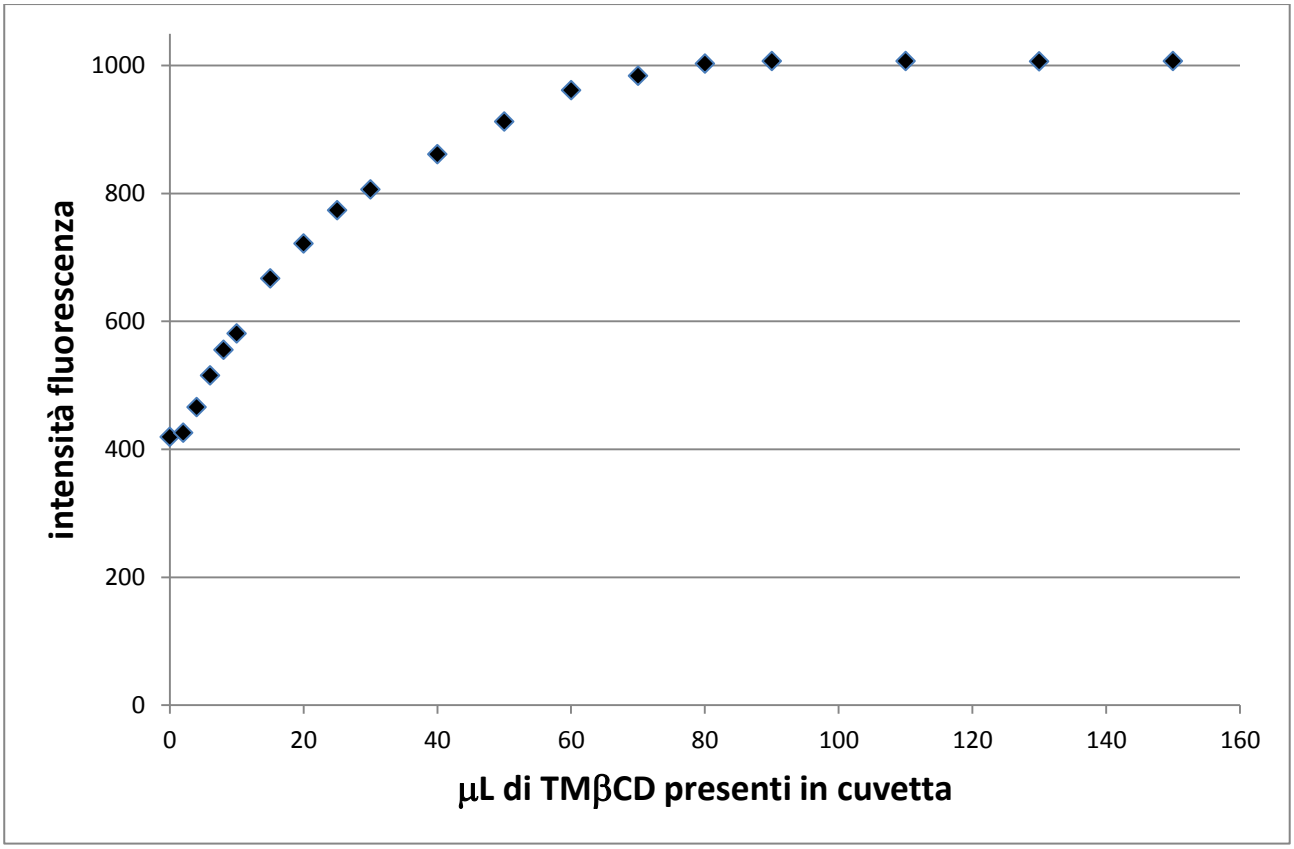


Grafico 1: Intensità di fluorescenza contro volume di TMβCD

Attraverso i dati di fluorescenza è stato possibile costruire il grafico del grado di binding θ in funzione della concentrazione libera in soluzione di TMβCD [Grafico-2].

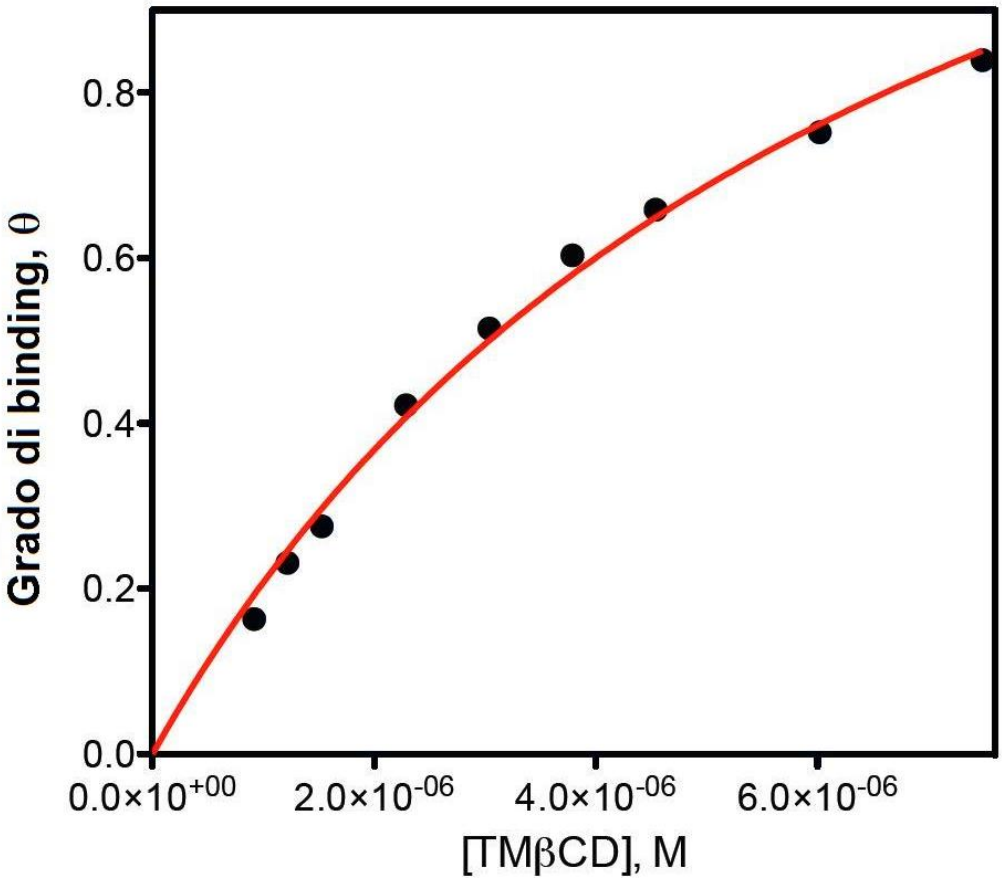


Grafico 2: Grado di binding in funzione della concentrazione libera di TMβCD

Il grado di binding rappresenta la frazione di legando TMβCD che si è legata alla NCC-$TPPS_3$ ed è così definito:

$$\theta = \frac{F - F_0}{F_\infty - F_0}$$

dove F_0 rappresenta il valore dell'intensità di fluorescenza iniziale a 653 nm, F rappresenta l'intensità di fluorescenza dopo ogni aggiunta di TMβCD ed infine F_∞ è il valore massimo asintotico dell'intensità di fluorescenza. Valori di θ compresi nel range 0.2÷0.8 sono stati posti in grafico contro la concentrazione di TMβCD. Il fitting dei dati è stato fatto con un modello di binding 1:1, secondo l'equazione:

$$\theta = \frac{B_{max} \cdot [TM\beta CD]}{K_d + [TM\beta CD]}$$

dove B_{max} è il parametro di binding massimo specifico e K_d è la costante di equilibrio di dissociazione, così definita:

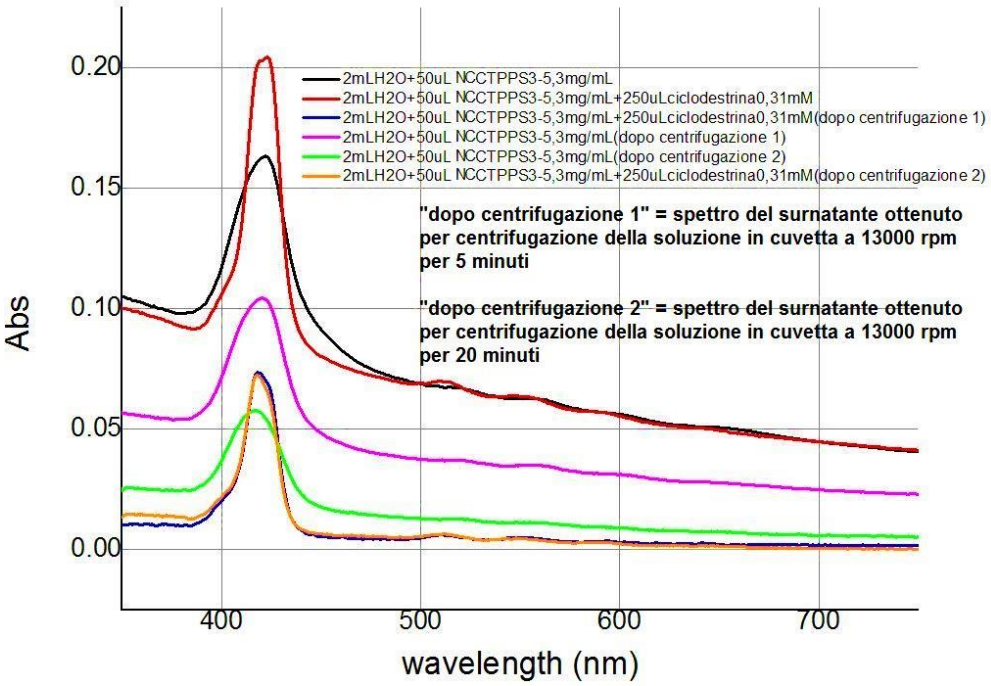
$$K_d = \frac{[TM\beta CD] \cdot [NCCTPPS_3]}{[TM\beta CD - NCCTPPS_3]}$$

Si è assunto che la concentrazione della TMβCD libera in soluzione fosse pari a quella totale in quanto la frazione di ciclodestrina che complessa la porfirina è piccola rispetto al totale. Conoscendo K_d è stato possibile calcolare K_a, costante di equilibrio di associazione/binding:

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

Il valore di K_a ottenuto è $(1.4\pm0.2)*10^5$ M^{-1}, in accordo con i valori riportati in letteratura per complessi d'inclusione analoghi.[87] Inoltre la validità del modello assunto e quindi della formazione di un complesso 1:1 è stata confermata dalla bontà del fitting dei dati che ha fornito un coefficiente di correlazione (R) pari a 0.997.

Per verificare che gli spettri di assorbimento e di fluorescenza della NCC-$TPPS_3$ siano ascrivibili solo alla frazione di porfirina legata covalentemente alla NCC e non a contributi derivanti da porfirina adsorbita fisicamente sulla superficie della NCC o inglobata in essa, sono stati messi a confronto gli spettri di assorbimento della sospensione di NCC-$TPPS_3$ e del surnatante ottenuto per centrifugazione della sospensione in cuvetta [UV-Vis 2].



UV-Vis 2: Spettro di assorbimento UV-Vis della soluzione di NCC-$TPPS_3$ e del surnatante

Nello spettro UV-Vis 2 si può osservare come per tempi di centrifugazione crescenti l'intensità degli spettri diminuisca gradualmente ma non scompaia del tutto. Stesso comportamento è visibile nello spettro di fluorescenza. Ciò può voler dire che l'ultracentrifugazione non sia sufficiente a decantare le fibrille più piccole del prodotto. Questa eventualità è confutata dal fatto che la filtrazione della soluzione con un filtro Millipore adeguato, produce una soluzione dove gli assorbimenti tipici del prodotto sono assenti.

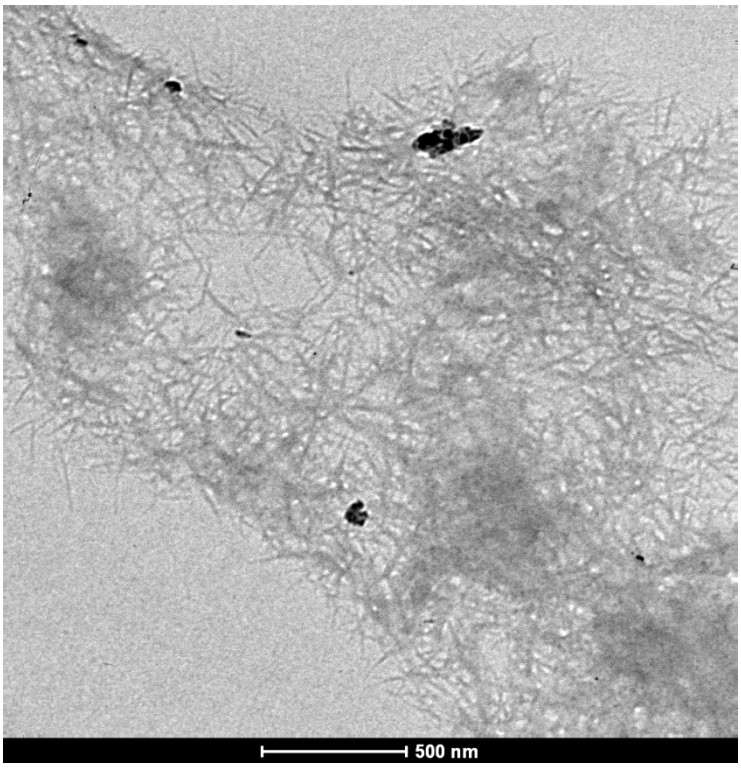
Le misure del potenziale Z sono state fatte con una sospensione acquosa di NCC-$TPPS_3$ a concentrazione 0.48 mg/mL e hanno fornito un valore medio di (-28.3±1.3) mV.

La stessa misura, realizzata in presenza di TMβCD (100 µL, 0.31 mM) ha fornito un valore medio molto simile (-27.9±1.4) mV. Si noti che il potenziale Z non è incrementato rispetto alla NCC-COOH, anche se ci si aspetterebbe un aumento visto che per effetto della coniugazione con la porfirina scompare un gruppo carbossilico ma si aggiungono le tre cariche dei gruppi solfonici.

Le misure delle dimensioni con DLS hanno presentato qualche difficoltà dovuta ad un assorbimento non trascurabile della porfirina alla lunghezza d'onda della sorgente laser a He-Ne a λ=633 nm dello strumento. Questo fenomeno è noto interferire nelle misure DLS. A questo si aggiunge il fatto che il loading di porfirina è molto basso, come si vedrà in seguito. Le misure di DLS, effettuate con una sospensione acquosa di NCC-$TPPS_3$ 0.12 mg/mL, hanno fornito un diametro medio di (117±17) nm.

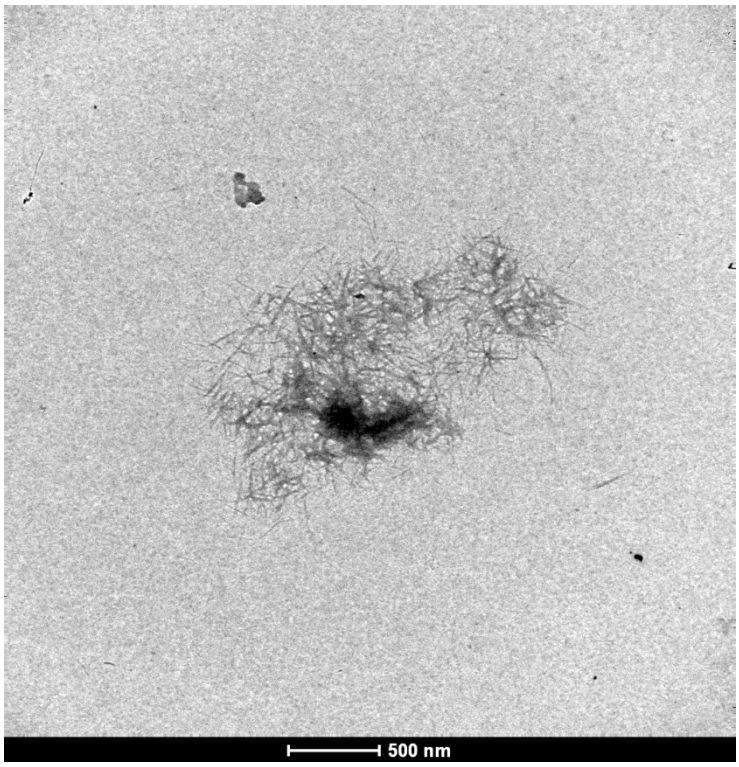
I campioni per le immagini TEM, preparati a partire da una sospensione acquosa di NCC-$TPPS_3$ (0.1 mg/mL), evidenziano un certa tendenza alla formazione di aggregati di nanocristalli, che non è mitigata nemmeno dalla presenza di ciclodestrina (150 µL, 0.31 mM). Questo fatto ha reso complicata l'individuazione di un numero sufficiente di nanocristalli isolati per la costruzione di un istogramma delle lunghezze.

NCC-$TPPS_3$ – TEM 1

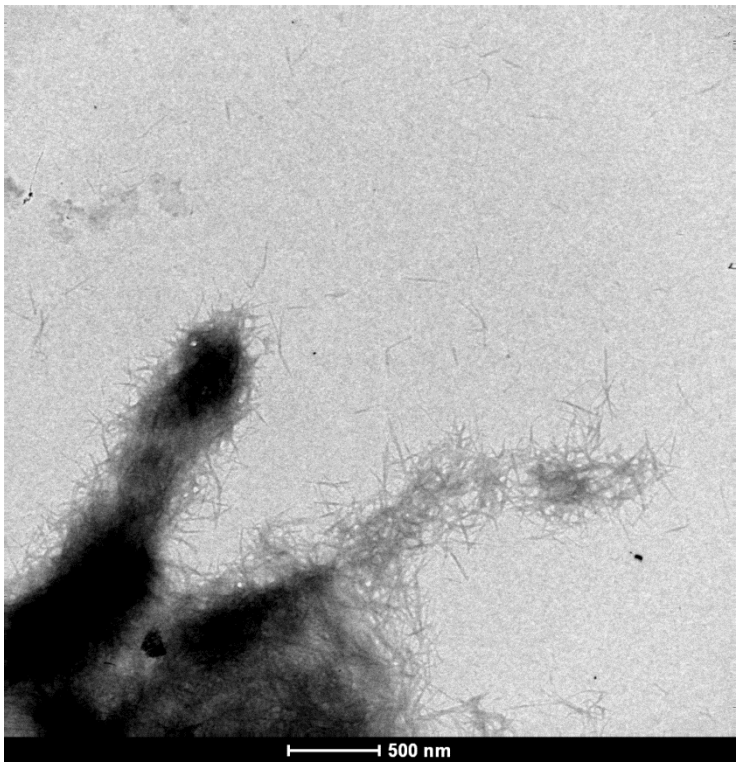


NCC-TPPS$_3$ – TEM 2

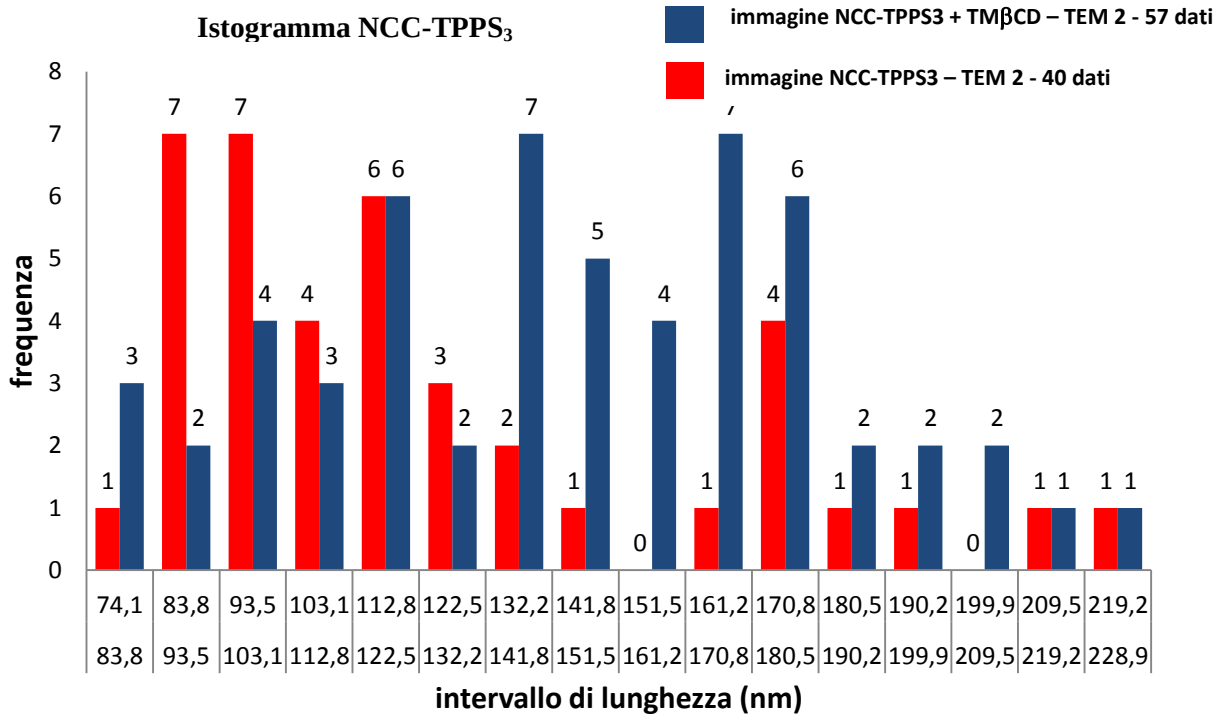
NCC-TPPS$_3$ + TMβCD – TEM 1



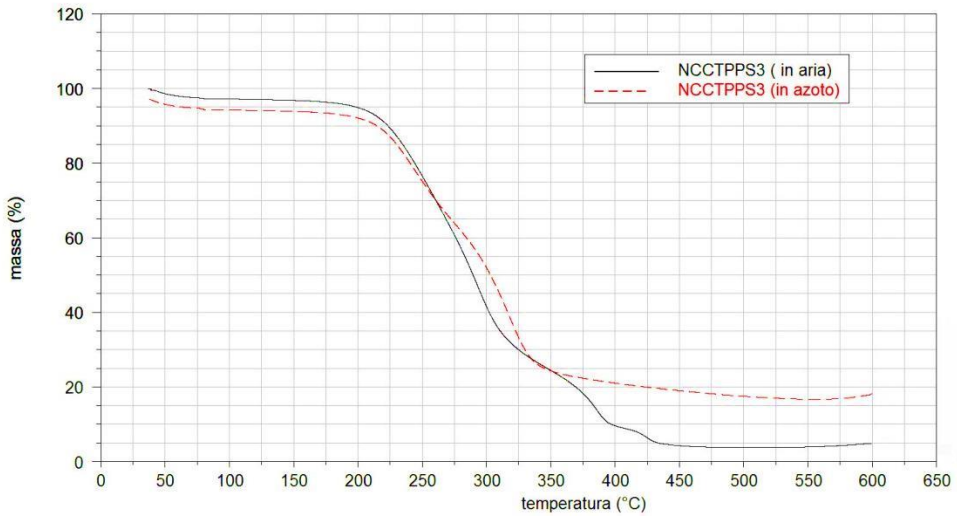
NCC-TPPS$_3$ + TMβCD – TEM 2



L'istogramma delle lunghezze ricavato dalle immagini NCC-TPPS$_3$–TEM 2 e NCC-TPPS$_3$+TMβCD – TEM 2 è di seguito rappresentato.

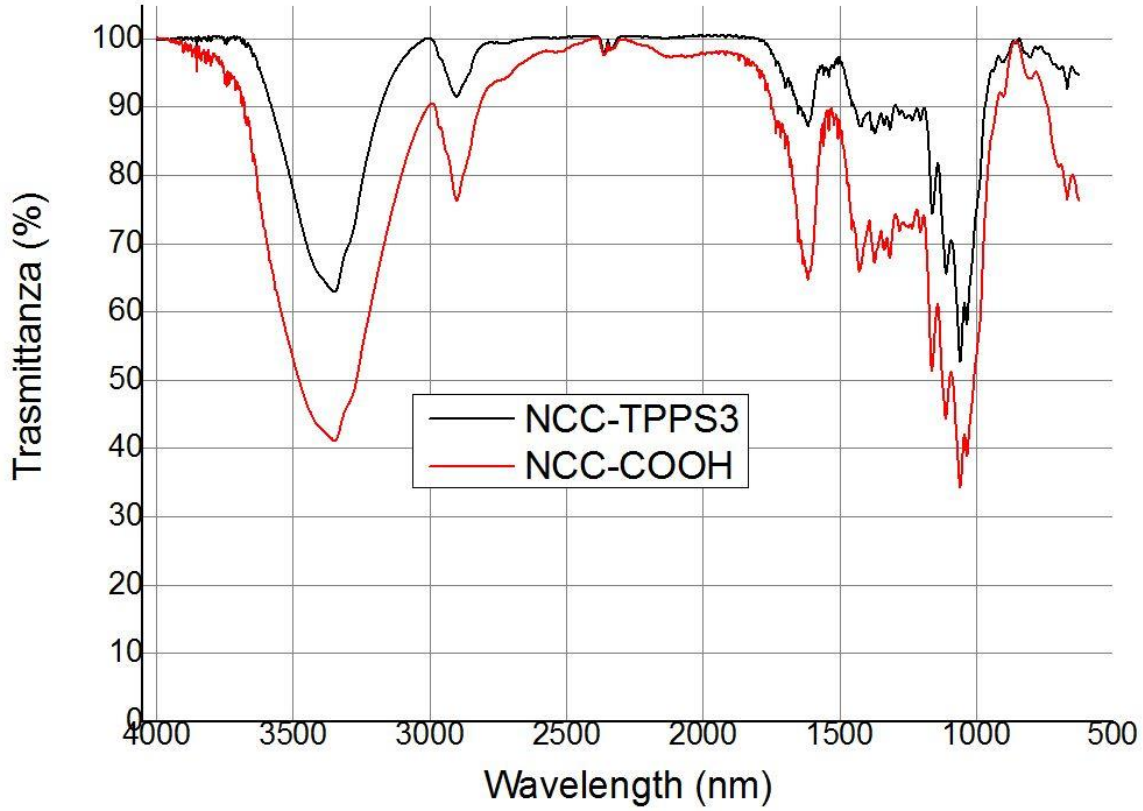


I valori medi delle lunghezze per i campioni NCC-TPPS$_3$ e NCC-TPPS$_3$+TMβCD sono rispettivamente (144±37) nm e (132±53) nm. Il basso numero di dati a disposizione negli istogrammi non consente di ottenere una distribuzione gaussiana e le medie aritmetiche così calcolate sono poco rappresentative dell'intera popolazione. Ciò che si può dire è che l'intervallo delle dimensioni si mantiene attorno al centinaio di nanometri. Il termogramma del campione di NCC-TPPS$_3$ [TGA-3] mostra un'ulteriore diminuzione della temperatura di degradazione termica (210°C circa) rispetto alla NCC-COOH.



TGA-3: Termogramma della NCC-TPPS$_3$ (registrato in aria e in azoto)

Lo spettro IR del composto NCC-$TPPS_3$ [IR-3] non fornisce informazioni utili poiché è molto simile al composto NCC-COOH. Sono ancora ben visibili le bande del gruppo COOH, mentre non si vedono le bande del gruppo ammidico. Ciò si spiega con una bassa percentuale di conversione dei gruppi carbossilici a derivati ammidici.



IR-3: Spettri IR della NCC-$TPPS_3$ e NCC-COOH posti a confronto (registrati con pastiglia di KBr)

Per quantificare il loading di $TPPS_3$ presente sulla NCC è stata utilizzata la spettroscopia di assorbimento Uv-Vis. Questa procedura prevede la disponibilità di un riferimento che abbia un coefficiente di estinzione molare simile a quello della porfirina legata alla NCC. Abbiamo inizialmente preso in considerazione due porfirine modello: la $TPPS_3$-NH_2, che è la porfirina usata per la preparazione della NCC-$TPPS_3$, e la $TPPS_4$, una porfirina idrosolubile disponibile commercialmente. Nel grafico 3 sono riportate due rette di calibrazione, ricavate riportando l'assorbanza in corrispondenza della banda di Soret per soluzioni di porfirina a concentrazione crescente in tampone di sodio fosfato bibasico (pH 7). Si può notare come variazioni anche minime nella struttura porfirinica portino a sensibili differenze di coefficiente di estinzione molare, come testimoniato dalla differenza di pendenza delle due rette di calibrazione. Abbiamo quindi deciso di usare un composto

ancora più simile alla NCC-$TPPS_3$. A tale proposito, abbiamo utilizzato un composto preparato precedentemente nel laboratorio in cui è stata svolta questa tesi che è costituito da una $TPPS_3$-NH_2 legata covalentemente ad una ciclodestrina[87] che possiamo considerare come un frammento di cellulosa. Il composto preso come riferimento presenta un coefficiente di estinzione molare pari a 190400 (calcolato con λ pari alla Soret Band). Abbiamo quindi osservato che la retta di calibrazione ottenuta con la $TPPS_3$-NH_2 fornisce un coefficiente di estinzione molare molto prossimo al valore di riferimento per cui si è deciso di utilizzare tale retta nella determinazione del loading porfirinico. Dalla misura dell'assorbanza di una sospensione contenente un ammontare noto di NCC-$TPPS_3$ (0.13 mg/mL), abbiamo potuto calcolare un loading di porfirina pari a (3.100±0.015)*10-3 mmol di $TPPS_3$/g di NCC.

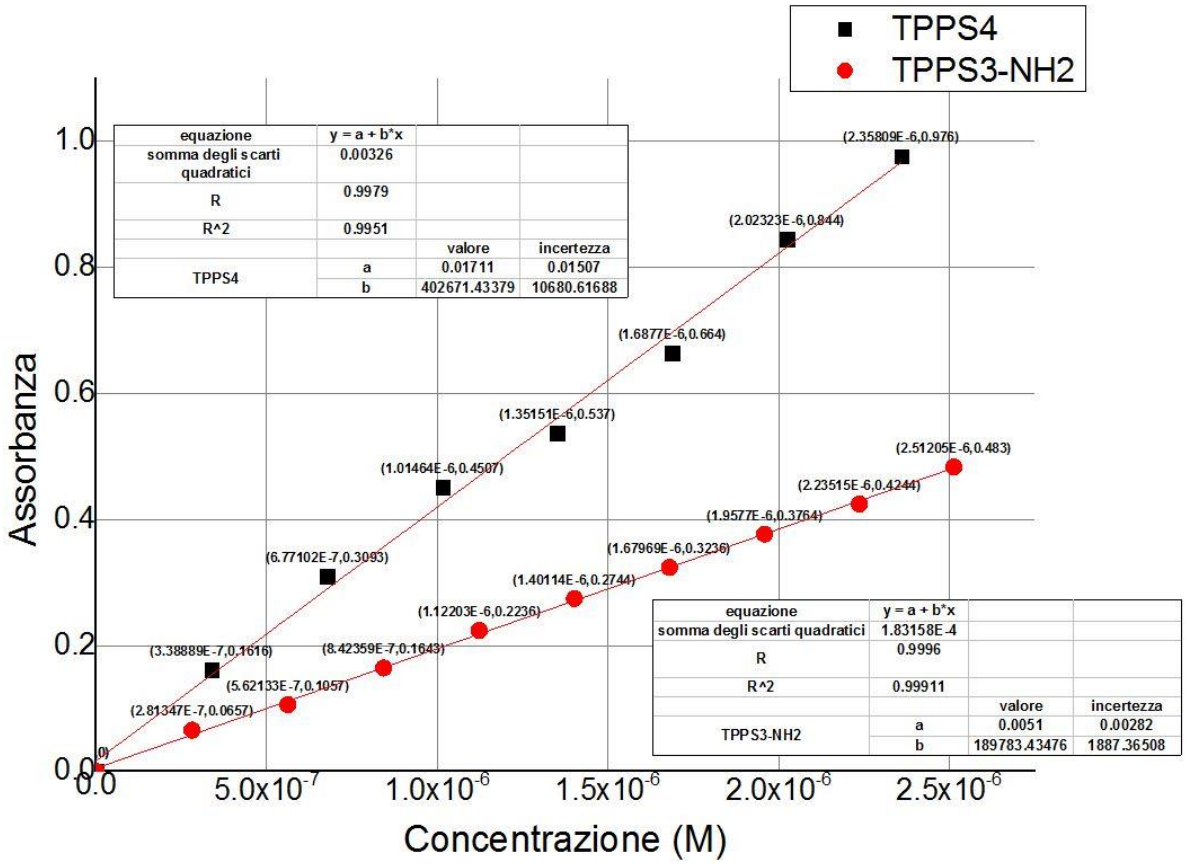


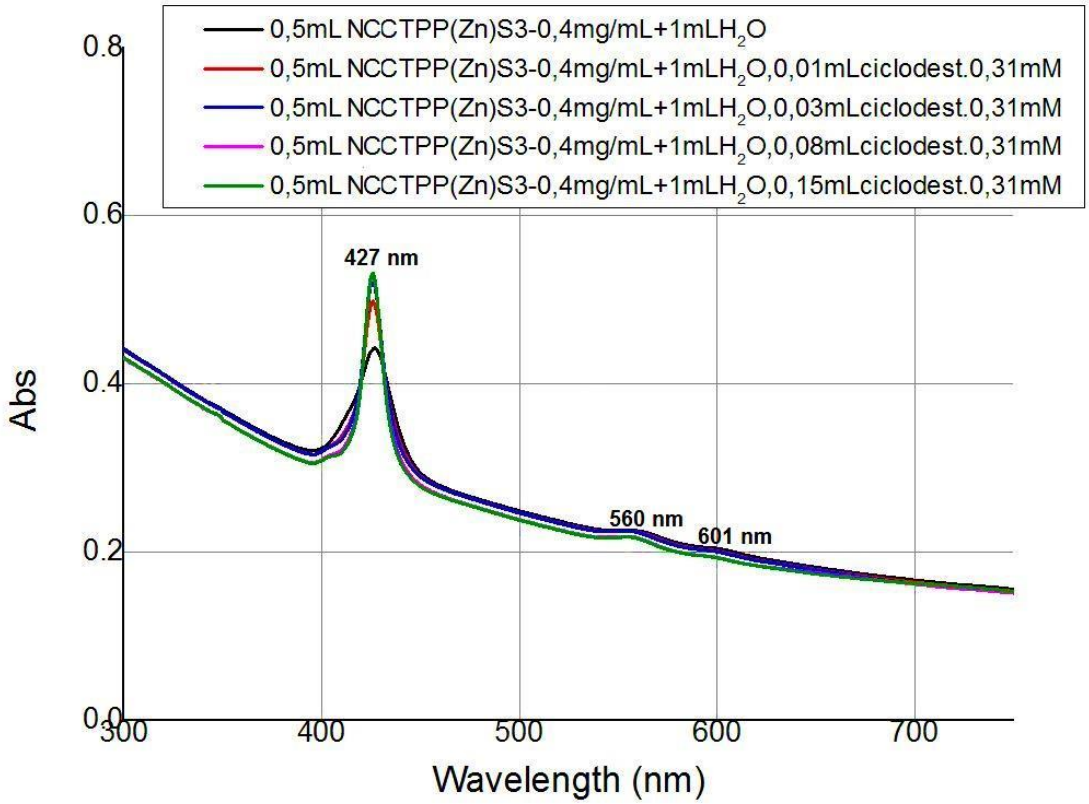
Grafico 3: Rette di calibrazione ottenute con $TPPS_4$ e $TPPS_3$-NH_2

Il loading di porfirina, se rapportato al D.O. della NCC-COOH, rappresenta lo O,38%, ovvero solo 1 ogni 263 gruppi carbossilici ha reagito con la porfirina per formare un legame ammidico. La causa potrebbe risiedere nella formazione di esteri intramolecolari formati dai gruppi carbossilici e gli OH della NCC durante la reazione, favorita anche dalla bassa nucleofilicità del gruppo amminico aromatico della porfirina. Va tuttavia detto che anche un

loading così basso, grazie al coefficiente di estinzione molecolare così elevato del macrociclo porfirinico, è comunque sufficiente a produrre materiali intensamente colorati e con proprietà spettroscopiche adeguate e, come si vedrà tra breve, per la produzione di ossigeno di singoletto. Inoltre, i cromofori legati alla NCC si comportano come se fossero isolati e si possono quindi escludere fenomeni di aggregazione porfirina-porfirina.

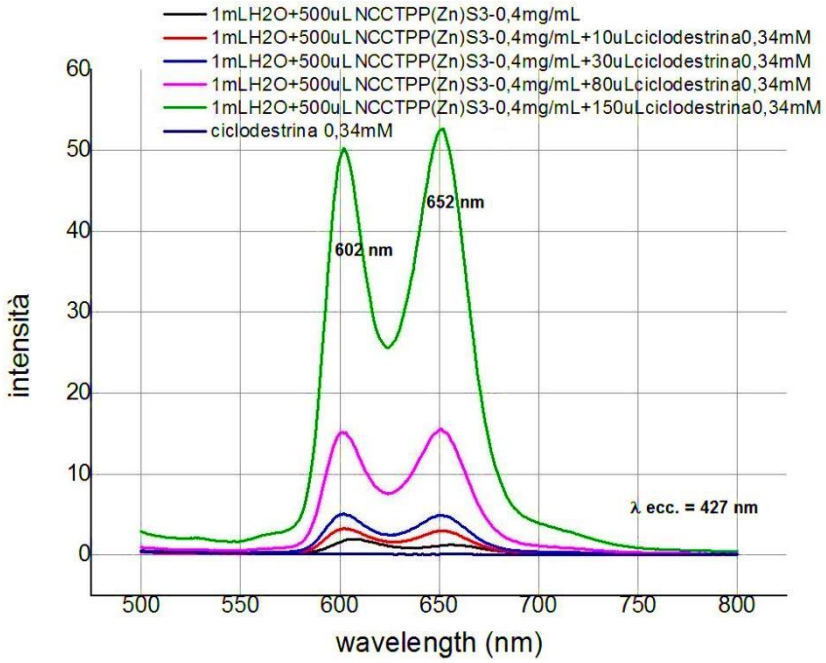
4.4 Caratterizzazione della NCC-TPP(Zn)S_3

Il derivato NCC-TPPS_3 è stato metallato usando la procedura standard con $Zn(Ac)_2$. Il successo della reazione di inserzione del metallo nel nucleo porfirinico è stato confermato dagli spettri di assorbimento [UV-Vis 3] e di fluorescenza [fluorescenza-2] registrati a partire da una sospensione acquosa di NCC-TPP(Zn)S_3 (0.13 mg/mL). Tale sospensione colloidale presenta un colore verde più intenso rispetto alla corrispondente soluzione del composto non metallato. Lo spettro UV-Vis 3 mostra la Soret band a 427 nm e le due Q bands a 560 nm e 601 nm. L'aggiunta di TMβCD produce gli stessi effetti descritti precedentemente nel caso della controparte non metallata.



UV-Vis 3: Spettro di assorbimento UV-Vis della NCC-TPP(Zn)S_3

Lo spettro di fluorescenza-2 presenta due bande, una a 602 nm e l'altra a 652 nm, quest'ultima corrispondente alla banda Q(0-0). Non è chiara l'attribuzione della banda a 602 nm. Inoltre facendo il rapporto tra l'integrale dell'intensità di fluorescenza dell'ibrido NCC-$TPPS_3$ e il corrispondente integrale per l'ibrido NCC-TPP(Zn)S_3, nel range 550-800 nm e a parità di concentrazione, si trova che la fluorescenza del composto non metallato in acqua è 6.7 volte maggiore rispetto a quella del composto libero.

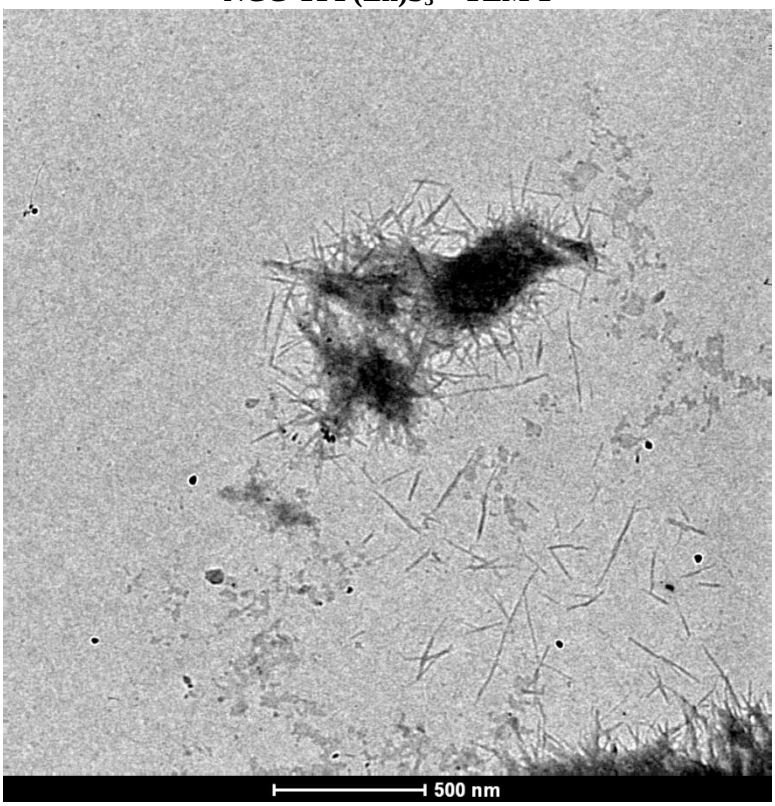


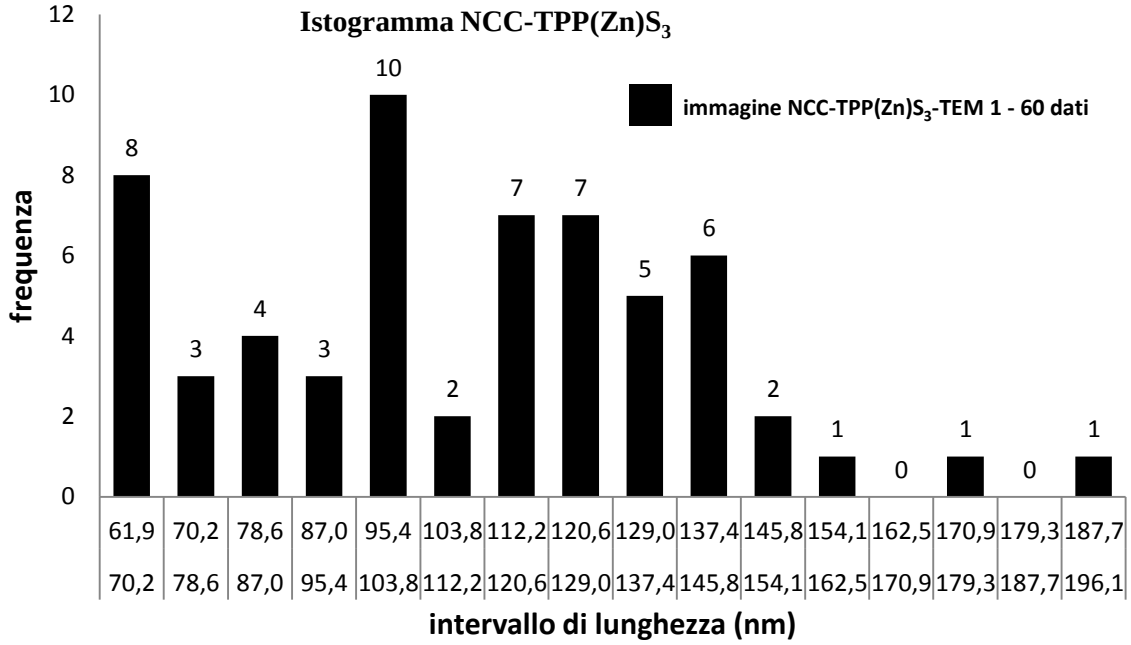
Fluorescenza-2: Spettro di fluorescenza della NCC-TPP(Zn)S_3

Anche lo spettro IR del composto metallato è molto simile a quello della NCC-$TPPS_3$. La misura del potenziale Z della sospensione acquosa (0.13 mg/mL) ha fornito un valore medio di (-31.5±0.8) mV, e (-24.4±1.1) mV in presenza di TMβCD (150 µL, 0.34 mM). Le misure di DLS, fatte tenendo conto dell'assorbimento del materiale alla λ operativa dello strumento, non hanno permesso di ricavare un valore medio in quanto la sospensione tendeva facilmente a depositarsi nel tempo.

I campioni per le analisi TEM della NCC-TPP(Zn)S_3 sono stati registrati con una sospensione acquosa 0.1 mg/mL. In generale tutte le immagini mostravano un'elevata aggregazione ed è stato difficile raccogliere un numero consistente di dati per l'istogramma delle lunghezze [istogramma NCC-TPP(Zn)S_3].

NCC-TPP(Zn)S_3 – TEM 1



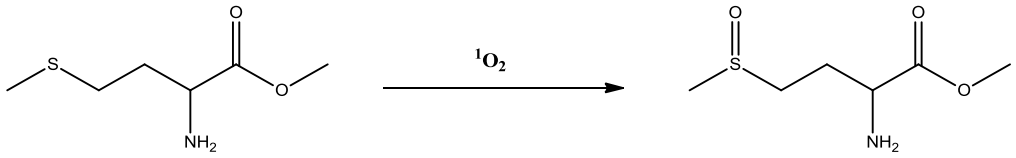


La media aritmetica dei dati fornisce un valore di (110±30) nm. Purtroppo a causa di problemi nella preparazione del campione con TMβCD, non è stato possibile registrarne le immagini.

4.5 Determinazione dell'ossigeno di singoletto

La capacità di generazione dell'ossigeno di singoletto da parte dell'addotto NCC-$TPPS_3$ è stata verificata attraverso due metodi chimici:

- Foto-ossidazione della L-metionina metil estere.



- Foto-ossidazione del 9,10-antracene-di(metilene) acido dimalonico (ABDA).

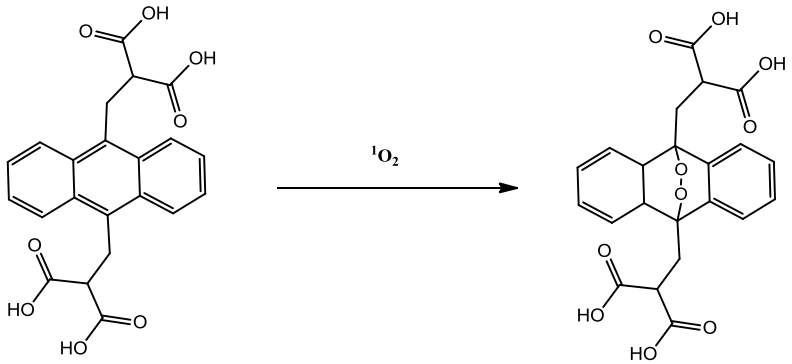


Foto-ossidazione della L-metionina metil estere

L'estere metilico dell'amminoacido L-metionina è stato ossidato al corrispondente solfossido mediante l'ossigeno di singoletto generato dalla foto-eccitazione di NCC-$TPPS_3$. L'esperimento è stato condotto utilizzando una sospensione in acqua deuterata di NCC-$TPPS_3$ (1 mg/mL) alla quale si è aggiunta L-metionina metil estere (53.9 mg). La sospensione ottenuta è stata poi suddivisa in due celle di quarzo a volume ridotto. In una cella (cella 1) si è aggiunta TMβCD (153 μL, $5.8*10^{-2}$ mM) e nell'altra (cella 2) un' uguale volume di acqua deuterata. In questo modo si è potuto anche mettere in evidenza un eventuale effetto della TMβCD nel processo di foto-ossidazione. Per l'illuminazione delle celle si è utilizzata una lampada UV Xe/Hg a 500 W, con filtro passa alto (λ > 375 nm). La comparsa del prodotto ossidato è stata verificata attraverso spettroscopia di massa MALDI e spettroscopia NMR. L'apparato sperimentale impiegato è rappresentato in figura 18.

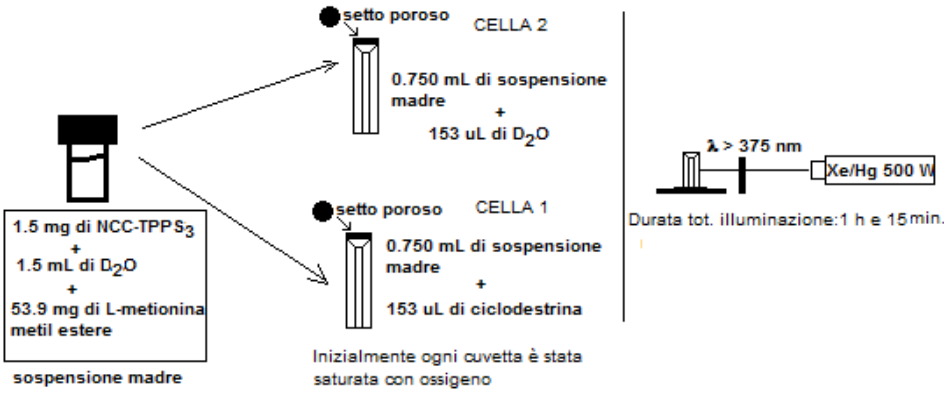


Figura 18: Apparato sperimentale "foto-ossidazione L-metionina"

La cella 1 è stata illuminata per 15 min., 45 min. e 75 min., mentre la cella 2 è stata illuminata per 15 min. e 75 min. . Dopo ogni intervallo di illuminazione la sospensione presente nelle celle è stata centrifugata e il surnatante è stato analizzato mediante spettrometria di massa MALDI. Gli spettri riportati nell'appendice mostrano che all'aumentare del tempo d'illuminazione si ha un incremento del segnale del prodotto ossidato (179=[M^+]). La presenza di ciclodestrina non sembra favorire la foto-ossidazione, anzi sembra inibirla in quanto il segnale del prodotto ossidato dopo 75 min. di illuminazione risulta meno intenso rispetto al corrispondente in assenza di ciclodestrina. D'altra parte, misure di fotostabilità dell'addotto fatte illuminando una sospensione di NCC-$TPPS_3$, mostrano che la ciclodestrina inibisce il fotobleaching della porfirina [grafico 4].

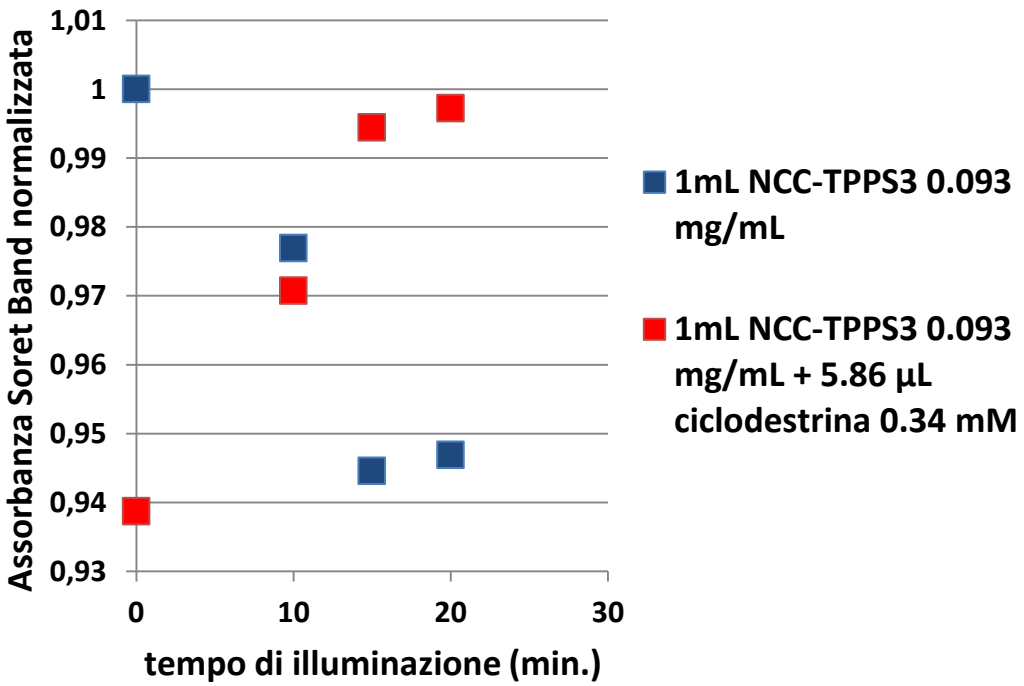
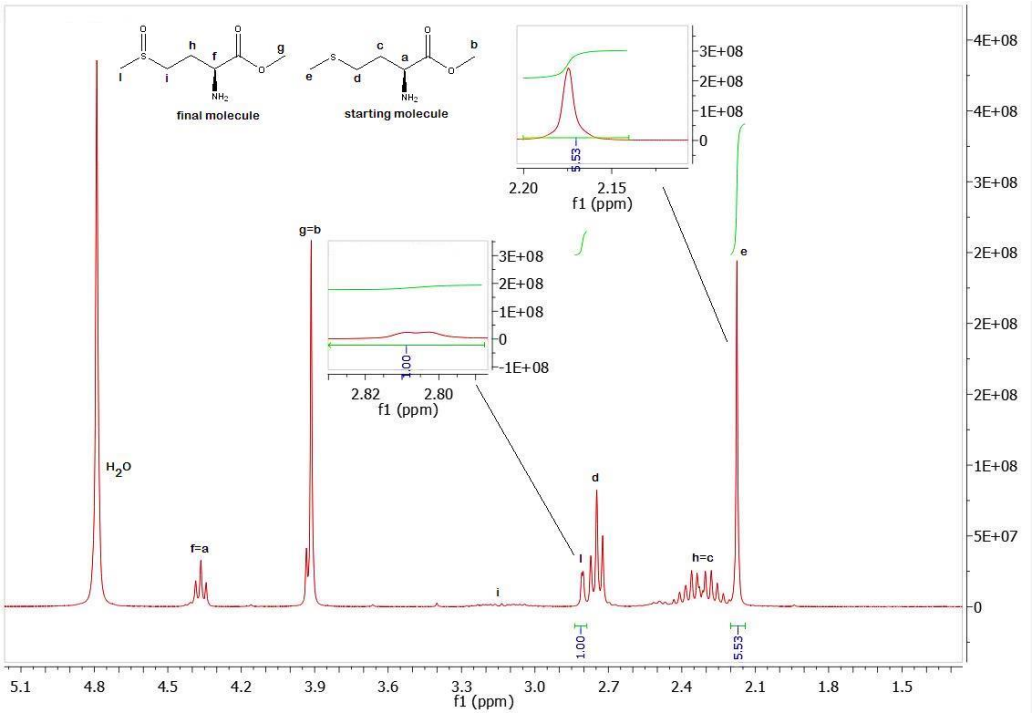
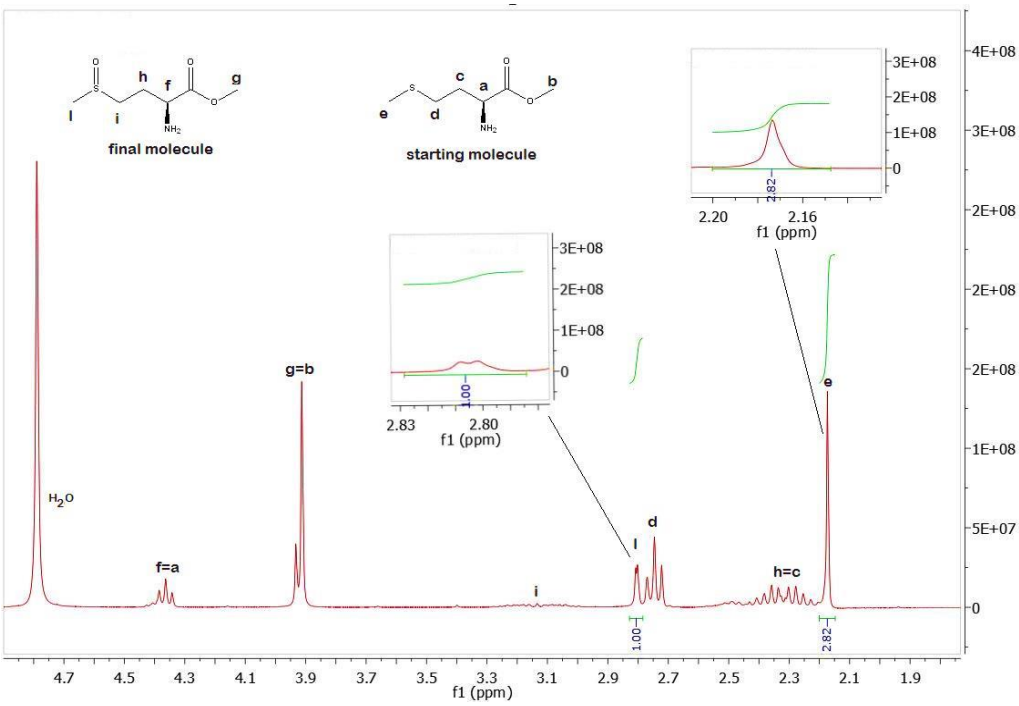


Grafico 4: Intensità della Soret band normalizzata a tempi di illuminazione crescenti

Per quantificare il numero di mmol di L-metionina metil estere che sono foto-ossidate nell'unità di tempo, detto turnover frequency (TOF), è stato registrato lo spettro NMR protonico dei surnatanti ottenuti dalle centrifugazioni dopo 75 minuti di illuminazione [NMR-1 e NMR-2]. L'attribuzione dei segnali è stata fatta secondo quanto riportato in letteratura.[88]



NMR-1: spettro 1H-NMR (300MHz) in D_2O – surnatante cella 1, con TMβCD (tempo di illuminazione 75 min.)

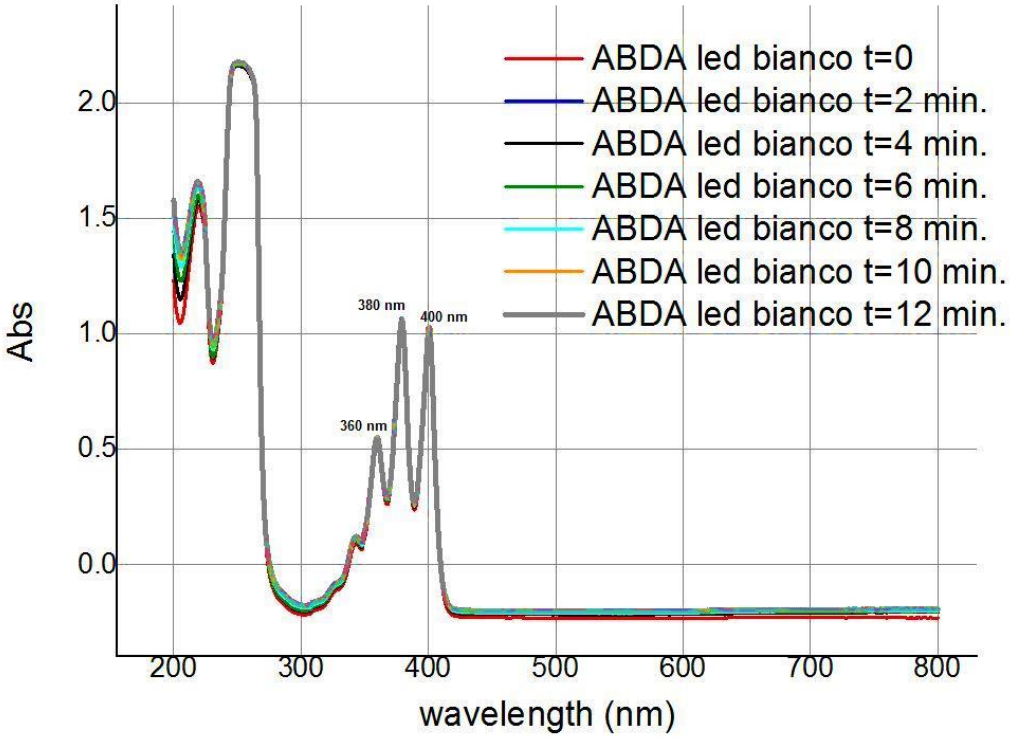


NMR-2: spettro 1H-NMR (300MHz) in D_2O – surnatante cella 2, senza TMβCD (tempo di illuminazione 75 min.)

I valori del TOF calcolati mediante lo spettro NMR-1 e lo spettro NMR-2 sono rispettivamente 171 min^{-1} e 335 min^{-1}. In assenza della ciclodestrina il TOF ha un valore più alto ovvero si ha una maggiore conversione dell'estere della L-metionina a solfossido. Questo risultato conferma quanto osservato negli spettri di massa MALDI.

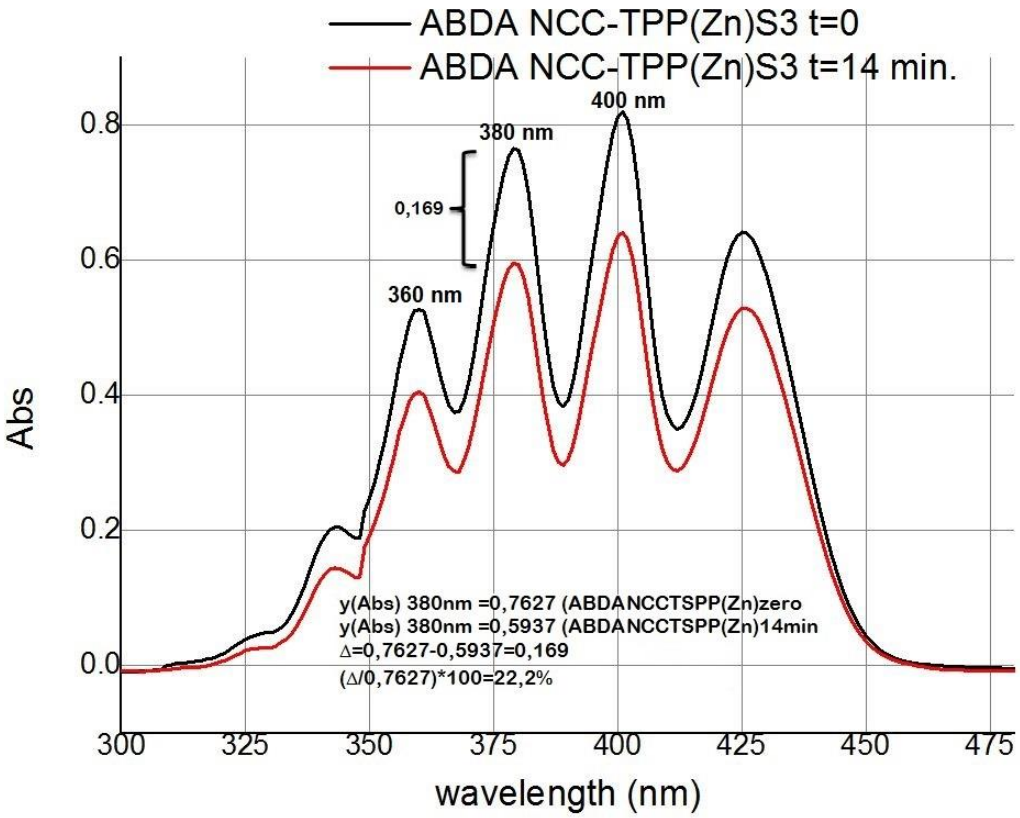
Foto-ossidazione del 9,10-antracene-di(metilene) acido dimalonico (ABDA)

L'ABDA è un derivato antracenilico che può essere usato come probe spettroscopico per la misura quantitativa della produzione di ossigeno di singoletto di una fotoreazione.[89] Si basa sul principio che l'ossigeno di singoletto reagisce con l'ABDA formando il corrispondente endoperossido, con una corrispondente diminuzione dell'assorbanza a 380 nm nello spettro UV-Vis. L'esperimento è stato condotto in due fasi: durante la prima fase è stata verificata la stabilità al foto-bleaching dell'ABDA mentre nella seconda fase è avvenuta la sua foto-ossidazione in presenza di NCC-TPP(Zn)S_3. Durante la prima fase è stata utilizzata una soluzione acquosa di ABDA 4.65 mM (in forma sodica) miscelata con D_2O e una soluzione tampone di sodio fosfato bibasico 0.1 M a pH 7. La cella a volume ridotto contenente solo ABDA (cella 1) è stata saturata di ossigeno e poi illuminata con un sistema di LED bianchi (1.5 W) per intervalli di tempo 2 min. fino ad arrivare ad un tempo totale di illuminazione di 12 min. Dopo ogni illuminazione è stato registrato lo spettro UV-Vis [UV-Vis 4].



UV-Vis 4: Resistenza di ABDA al foto-bleaching

Lo spettro di assorbimento mostra che non c'è un'apprezzabile decrescita dell'assorbanza del campione di ABDA nella zona delle tre bande caratteristiche (360 nm, 380 nm, 400 nm) e questo dimostra che nelle condizioni di illuminazione scelte il probe è stabile. Per l'ossidazione con NCC-TPP(Zn)S_3 è stata utilizzata una cella a volume ridotto (cella 2) contenente le stesse sostanze della cella 1 e 0.50 mg di addotto. La cella è stata saturata di ossigeno e illuminata nelle stesse condizioni della cella 1. Di seguito è mostrato lo spettro ottenuto [UV-Vis 5]. Per una maggiore chiarezza si è deciso di riportare solo lo spettro a tempo zero e tempo totale di illuminazione 14 min.



UV-Vis 5: Variazione dello spettro di assorbimento di ABDA in presenza della NCC-TPP(Zn)S3

La diminuzione di assorbanza a 380 nm è stata pari al 22 %, a conferma della formazione dell'endoperossido ad opera dell'ossigeno di singoletto.

5 CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi è consistito nella produzione di cellulosa nanocristallina a partire da materiale microcristallino e nella sua funzionalizzazione con tetrafenil porfirina trisolfonata, per produrre un materiale ibrido in grado di agire da sensibilizzatore in reazioni di foto-ossidazione. In particolare si è testata la capacità dell'ibrido di produrre ossigeno di singoletto e quindi il suo potenziale impiego nella PDT. Il lavoro di tesi ha portato alle seguenti conclusioni:

- E' possibile sintetizzare con relativa semplicità la cellulosa nanocristallina, attraverso l'idrolisi acida della cellulosa seguita da una serie di cicli di lavaggi e centrifugazioni in acqua.

- La cellulosa nanocristallina è modificabile chimicamente sfruttando i gruppi OH sulla superficie. Ciò consente l'utilizzo di un ampia gamma di reazioni chimiche per la sua funzionalizzazione, con una conseguente maggiore speranza di successo.

- Tra i vari metodi presi in considerazione, l'ossidazione della NCC a NCC-COOH attraverso l'utilizzo del TEMPO si è rivelata una procedura di funzionalizzazione robusta e riproducibile, con rese relativamente elevate e buona efficacia di funzionalizzazione (0.82 mmol di COOH/g di NCC, valore in linea con quelli riportati in letteratura).

- Le varie fasi di funzionalizzazione della NCC hanno rese di reazione attorno al 50% mentre la sintesi della porfirina ha una resa di oltre il 4% (trattasi di un valore comune nelle sintesi delle porfirine). La bassa resa limita la quantità di porfirina a disposizione per la funzionalizzazione della nanocellulosa. Inoltre a ciò si aggiunge la necessità di rendere idrofila la porfirina attraverso la solfonazione affinché si possa funzionalizzare la cellulosa nanocristallina in ambiente acquoso, dove essa è più facilmente disperdibile.

- E' stato ottenuto un addotto NCC-$TPPS_3$ attraverso l'ossidazione a gruppi carbossilici delle funzioni alcoliche primarie sulla superficie dei nanocristalli di cellulosa e la loro conversione a gruppi ammidici attraverso la reazione di coupling con una ammino porfirina.

- Il valore di loading della porfirina sulla NCC è $(3.100\pm0.015)*10^{-3}$ mmol di $TPPS_3$/g di NCC. Tale valore, se rapportato al D.O. della NCC-COOH impiegata (0.82 mmol di COOH/g di NCC), rappresenta lo O,38%, ovvero solo 1 ogni 263 gruppi carbossilici ha reagito con la porfirina per formare un legame ammidico. L'efficacia delle

funzionalizzazione non è molto elevata, probabilmente la causa risiede nella formazione di esteri intramolecolari formati dai gruppi carbossilici e gli OH della NCC durante la reazione, favorita anche dalla bassa nucleofilicità del gruppo amminico aromatico della porfirina.

-Nonostante il basso valore di loading porfirinico, l'addotto NCC-$TPPS_3$ è intensamente colorato e le analisi strumentali confermano la presenza della porfirina. Le reazioni di foto-ossidazione eseguite in laboratorio dimostrano che l'addotto, sia nella sua forma libera che in quella metallata, produce ossigeno di singoletto quando irradiato con una sorgente luminosa nell'intervallo visibile. Crediamo che l'attività foto-ossidativa dell'addotto possa essere incrementata aumentando il loading di porfirina, anche se valori molto più alti potrebbero portare ad un quenching delle proprietà spettroscopiche.

- La TMβCD forma un complesso di inclusione 1:1 con la porfirina della NCC. Dalle prove di foto-ossidazione si nota che il complesso di inclusione limita la capacità di foto-ossidazione dell'addotto ma allo stesso tempo inibisce il foto-bleaching della porfirina, permettendone quindi un utilizzo nel tempo più lungo.

5.1 Sviluppi futuri

Lo scopo principale della tesi è stato raggiunto. Tuttavia sarebbe necessaria una serie di esperimenti per completare il progetto che però non è stato possibile realizzare per motivi di tempo. Innanzitutto, serve un metodo più accurato per determinare il loading di porfirina. A questo proposito si suggerisce l'utilizzo delle tecniche di assorbimento atomico e di emissione atomica per quantificare il contenuto di Zn nel composto NCC-TPP(Zn)S_3 e quindi risalire al contenuto di porfirina.

Inoltre, è necessario incrementare ulteriormente il loading di porfirina. Questo può essere realizzato utilizzando una porfirina con un gruppo amminico più reattivo, per esempio usando un opportuno linker con la porfirina.

Infine, sarebbe preferibile determinare l'ossigeno di singoletto non solo per vie indirette di tipo chimico, ma anche per via spettroscopica per esempio attraverso l'EPR (misurando l'intensità del segnale EPR associato al radicale nitrossido TEMPO)[90] oppure direttamente attraverso l'emissione caratteristica a 1270 nm.

Sarebbe anche auspicabile, ai fini dell'applicazione dell'ibrido in PDT, realizzare una serie di studi di carattere biologico per verificare:

-La sua attività anti-batterica/ anti-tumorale.

-La sua localizzazione all'interno dell'organismo umano e la sua selettività nel legarsi alle cellule malate piuttosto che a quelle sane.

-Il meccanismo di escrezione dall'organismo.

5.2 Pubblicazione

Il presente lavoro di tesi è stato pubblicato sulla rivista Chemical Communications (DOI: 10.1039/C3CC44852E). Di seguito è riportato il testo della pubblicazione.

Nanocrystalline Cellulose - Porphyrin Hybrids: Synthesis, Supramolecular Properties, and Singlet-Oxygen Production

Prashant Chauhan,[a] Caroline Hadad,[b] Andrea Sartorelli,[a] Marco Zarattini,[a] Ana Herreros López,[b] Miriam Mba,[a] Michele Maggini,[a] Maurizio Prato,[b] and Tommaso Carofiglio[a]*

Receipt/Acceptance Data **[DO NOT ALTER/DELETE THIS TEXT]**
Publication data **[DO NOT ALTER/DELETE THIS TEXT]**
DOI: 10.1039/b000000x [DO NOT ALTER/DELETE THIS TEXT]

Amino-trisulfonate tetraphenylporphyrin was conjugated to carboxylate cellulose nanocrystals giving rise to a new nanomaterial with interesting binding properties.

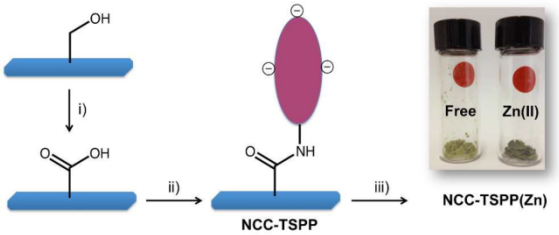
Cellulose, the most ubiquitous and renewable biomass on Earth, is biosynthesized in the form of fibrils with alternating crystalline and amorphous domains. This unique structure permits the top-down production of a valuable nanomaterial generally known as nanocrystalline cellulose (**NCC**).[1a] In fact, treatment of cellulosic materials with warm, concentrated mineral acid results in the preferential hydrolytic disruption of the amorphous domains converting native cellulose fibers into a colloidal dispersion of individual crystallites having a typical whisker-like morphology with lengths of 100–1000 nm and cross-sectional dimensions of 5–50 nm.[1b] Owing to outstanding mechanical performances, large surface area, as well as availability, renewability, and biodegradability, **NCC** is currently evaluated as a sustainable and cost-effective reinforcement additive in composite materials, transparent and flexible films. Moreover, **NCC** bears many hydroxyl groups that can be used to tailor its surface properties through the attachment of a variety of organic functionalities, according to the well-consolidated polysaccharide chemistry. Although surface functionalization has the main purpose of enhancing **NCC** dispersibility in organic solvents and polymer matrices, reports that focus on the creation of advanced, cellulose based, functional nanomaterials have been recently flourishing in the literature. Some notable examples are in the field of catalysis,[2] electronic and magnetic materials,[3] drug delivery,[4] photodynamic therapy,[5] and regenerative medicine.[6]

Porphyrins and metalloporphyrins have been frequently attached to nanoparticle matrices with the aim to impart their striking photo-, electro-, and catalytic properties to the nanocomposites.[7] Surprisingly, while there are several reports dealing with the immobilization of porphyrins onto cellulosic materials (cotton fabrics,[8] microcrystalline cellulose[9]) or cellulose strands,[10] to date there are only two studies that describe the covalent linking of a porphyrin derivative onto a **NCC** scaffold and its use for light-promoted inactivation of bacteria.[11]

[a]*Università di Padova, Dipartimento di Scienze Chimiche, V. Marzolo 1, 35131 Padova, Italy. Phone: ++39(0)49 827 5287; E-mail: tommaso.carofiglio@unipd.it.* [b]*Università di Trieste, Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, P.le Europa 1, 34127 Trieste, Italy.*
† Electronic Supplementary Information (ESI) available: experimental details for the synthesis of cellulose nanowhiskers and porphyrin grafting. See http://www.rsc.org/suppdata/xx/b0/b000000x/

Herein, we report the successful attachment of the water-soluble, anionic amino-trisulfonated tetraphenyl porphyrin (**TSPP-NH$_2$**) onto **NCC**. We prove that the **NCC**-porphyrin hybrid retains two valuable molecular properties of sulfonated porphyrins, which we have exploited in the past to carry out efficient photooxygenation reactions in aqueous solution, namely 1) the tendency to form strong host-guest complexes with cyclodextrins,[12] and 2) the ability to act as sensitizers for the production of singlet oxygen.[13]

The **NCC** employed in this study was produced by hydrolysis of commercial microcrystalline cellulose (66% of crystallinity) with 63% sulfuric acid for 2 hours at 45°C.[14] Upon oxidation with 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radical (TEMPO) in the presence of NaOCl/NaBr some primary hydroxy groups of **NCC** surface were selectively converted to carboxylic acid (**NCC-COOH**).[15] The success of the oxidation was confirmed by FT-IR (KBr) where the carboxylic group signature stretches appeared at 1720 cm^{-1} (free-acid form) and 1620 cm^{-1} (salt form). Determination of the degree of oxidation (DO) carried out by acid-base conductometric titration gave a DO=0.12±0.01 corresponding to a carboxylic group loading of 0.82±0.04 mmol COOH/g of **NCC**.



Scheme 1: Synthesis of nanocrystalline carboxylic cellulose-porphyrin conjugate: i) TEMPO, NaOCl/KBr; ii) **TSPP-NH$_2$**, EDC/NHS, MES buffer, pH=4; iii) Zn(OAc)$_2$ in methanol. *Inset*: Digital pictures of **NCC-TSPP** (free) and **NCC-TSPP(Zn)** complex (Zn(II)) solids.

The conjugation of **TSPP-NH$_2$** to **NCC-COOH** via amidic linkage (Scheme 1) was performed using carbodiimide chemistry in aqueus solution of 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES, 50 mM, pH = 4) in the presence of *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC-HCl) and *N*-hydroxy succinimide, NHS.[16] After stirring for 3 days at room temperature, the **NCC-TSPP** adduct was recovered by ultracentrifugation at 13000 rpm, washed extensively with water, then subjected to dialysis first against a saturated solution of NaCl (1 day) then against milli-Q water (6 days). An intensely coloured green solid

(Inset Scheme 1) was obtained after lyophilization. A portion of this material was converted to the corresponding Zn(II) complex, **NCC-TSPP(Zn)**, by treating a suspension of **NCC-TSPP** with a saturated solution of $Zn(OAc)_2$ in MeOH. Both **NCC-TSPP** and **NCC-TSPP(Zn)** formed stable suspensions in water upon mild sonication. Figure 1a shows the UV-Vis spectra of 0.13 mg/ml aqueous suspensions of **NCC-TSPP** (black line) and **NCC-TSPP(Zn)** (red line) at neutral pH. The typical UV-Vis spectroscopic signatures for porphyrinic compounds were observed. In particular, for **NCC-TSPP** a Soret band at 421 nm and four Q-bands at 519, 560, 598, and 653 nm were detected. Upon metallation with Zn(II) the corresponding **NCC-TSPP(Zn)** was formed as confirmed by the expected red shift of the Soret band (427 nm) and the reduction of the Q-bands from four to two (561, 602 nm).

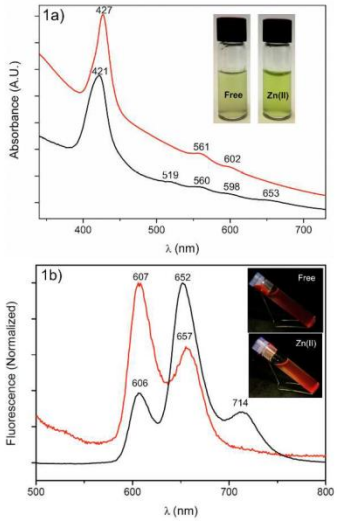


Figure 1a: Uv-vis spectra of 0.13 mg/mL suspensions of **NCC-TSPP** (black line) and **NCC-TSPP(Zn)** (red line). *Inset*: digital pictures of the two suspensions (0.9 mg/mL) in neutral water. **Figure 1b**: Normalized fluorescence spectra of 0.13 mg/mL aqueous suspensions of **NCC-TSPP** (black line, excitation at 421 nm) and **NCC-TSPP(Zn)** (red line, excitation at 427 nm). *Inset*: digital pictures of the two suspensions (0.9 mg/mL) in methanol upon exposure to a 365 nm UV-lamp.

We have previously reported[17] on the covalent attachment of **TSPP-NH$_2$** to a β-cyclodextrin macrocycle. The molar extinction coefficient of this adduct was 189000 $M^{-1}cm^{-1}$ in neutral solution. We used this value as a reasonable estimate for the molar absorption of the porphyrin unit in **NCC-TSPP**. On the basis of this assumption, we established a porphyrin loading of **NCC-TSPP** of 3.1×10^{-3} mmol/g **NCC**. Since the covalent attachment takes place on the carboxylic groups appended to **NCC**, the ratio porphyrin/carboxylic groups is 0.0038, corresponding to the functionalization 1 out of every 263 carboxylic groups with a porphyrin moiety. This limited loading is likely due to the scarce nucleophilicity of the aromatic amino groups and/or to a low accessibility of carboxy groups on **NCC**. Were a higher loading needed, this drawback can in principle be mitigated through the functionalization of the porphyrin with an amino-terminated linker that would address both the low nucleophilicity and the steric hindrance issues. On the other hand, a low porphyrin loading is preferred when exploiting their photophysical functions in order to prevent porphyrin-porphyrin self-quenching phenomena. Indeed, **NCC-TSPP** and **NCC-TSPP(Zn)**, are both highly fluorescent materials. The static fluorescence spectra of **NCC-TSPP** and **NCC-TSPP (Zn)** aqueous suspensions (0.13 mg/mL) are reported in Figure 1b. By excitation at 421 nm, the fluorescence spectrum of **NCC-TSPP** (black line) shows three bands centered at 606, 652 and 714 nm. On the other hand, excitation at 427 nm, produces the fluorescence spectrum of **NCC-TSPP(Zn)** (red line) with two emission bands at 607 and 657 nm. It should be pointed out that the fluorescence spectra reported in Figure 1b are normalized for an easier comparison. However, the spectrum of the free porphyrin is much more intense than the one of Zn(II) derivative. By integration in the range 550-800 nm of the spectra (before normalization) the fluorescence of **NCC-TSPP** can be estimated to be about 6.7 times higher than the fluorescence of **NCC-TSPP(Zn)**. Yet, the opposite behavior is observed in MeOH (cfr. digital pictures of Figure 1b inset in which the **NCC-TSPP** fluorescence in the upper picture is less intense) but the fluorescence relative ratio could not be determined since the alcoholic suspension of cellulose-porphyrin adducts settles down too quickly, thus preventing the spectrum collection.

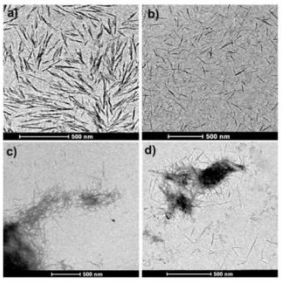


Figure 2. TEM images of cellulose products: a) **NCC**, b) **NCC-COOH**, c) **NCC-TSPP**, d) **NCC-TSPP(Zn)**.

The nanocrystalline structure of **NCC** was verified by Transmission Electron Microscopy (TEM), showing the typical whisker morphology (Figure 2a). Size analysis (70 measurements) gave an average length of 137±46 nm, whereas Z-potential (determined by dynamic light scattering) was -14±1 mV, as expected for the presence of sulfate groups on the **NCC** surface. **NCC-COOH** showed a similar morphology (Figure 2b) with an average length of 159±50 nm (150 samples) and an increasing of Z-potential to –33±1 mV. TEM analysis of both **NCC-TSPP** (Figure 2c) and **NCC-TSPP(Zn)** (Figure 2d) confirmed the whisker-like structure of **NCC** with and average size of 132±52 nm (sample of 40 measurements) and 110±30 nm (sample of 60 measurements), respectively. In addition, in both **NCC**-porphyrin conjugates, an increasing tendency to aggregation with respect to **NCC** and **NCC-COOH** was observed. This phenomenon could be likely ascribed to the intervention of porphyrin-porphyrin interactions.

We[12] and others[18] have reported about the strong affinity of

This journal © Royal Society of Chemistry

water soluble anionic porphyrins with cyclodextrins. In particular, (2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-cyclodextrin (**TMβCD**) forms an exceptionally stable complex with 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin ($TPPS_4$) having a 2:1 cyclodextrin:porphyrin stoichiometry in aqueous solution. This adduct has been used as a supramolecular sensitizer for singlet oxygen oxidation of model biomolecules (i.e. L-methionine and uracile) and for degradation of water pollutants such as phenol.[13] Therefore, we decided to study the interactions of **NCC-TSPP** with **TMβCD** by fluorescence spectroscopy (Figure 3) to verify if the host-guest complex formation is not hindered when the porphyrin is grafted to **NCC**.

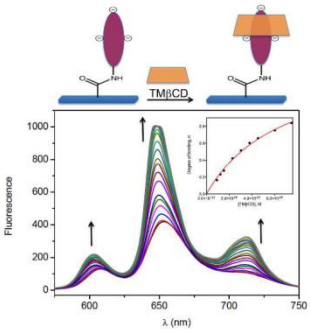


Figure 3: Fluorescence tiration of **NCC-TSPP** with **TMβCD** in neutral solution. *Inset*: Graph of degree of binding $\theta=(F-F_0)/(F_\infty-F_0)$ (where F= actual fluorescence value, F_0=starting fluorescence value, F_∞=final fluorescence value) versus [**TMβCD**], and the corresponding fitting curve for a 1:1 binding model.

Addition of increasing amounts of **TMβCD** to a suspension of **NCC-TSPP** in neutral water leads to a marked increase of fluorescence, consistent with the inclusion of the porphyrin in the cyclodextrin cavity. α-cyclodextrin, that does not interact with porphyrin, gave only a negligible effect on fluorescence, thus allowing to rule-out non-specific interactions. Titration data (inset Figure 3) were analyzed according to a simple 1:1 binding model in order to calculate the corresponding association constant. The non-linear fitting gave a constant value of $(1.4\pm0.2)\times10^5$ M^{-1} in agreement with the values reported in literature for similar host:guest adducts.[17] In addition, the fair fitting parameter (R^2=0.994) tells that the 1:1 model describes adequately the binding. As a consequence, the porphyrin units can be considered sufficiently far from each others to act indipendently, in agreement with the low degree of functionalization observed.

To verify the potential of this material as sensitizer for singlet oxygen production, a suspension containing **NCC-TSPP** (0.75 mg, 2.3×10^{-6} mmol of porphyrin) and L-methionine-methylester (27 mg, 0.165 mmol, 70815 equivalents with respect to the porphyrin) in an oxygen-saturated solution of D_2O (0.75 mL) was irradiated with a 500 watt Hg-Xe lamp (filter >375 nm) for 75 mins. The corresponding sulfoxide was formed in 36% amount corresponding to 25139 turnovers, with a turnover frequency of 335 TO/min. The same experiment carried out in the presence of **TMβCD** (0.012 mg, 8.0×10^{-6} mmol, 3.5 equivalents with respect to the porphyrin) gave a lower conversion (18%, 12818 TO, 171 TO/min). Singlet oxygen production was also confirmed in the case of **NCC-TSPP(Zn)** using 9,10-anthracenediyl-bis(methylene) dimalonic acid (ABDA), which is known[19] to react with singlet oxygen to yield an endoperoxide with a concomitant 22% decreasing of absorption at 380 nm.

In conclusion, we have demonstrated than **NCC** can be used as a scaffold to covalently append porphyrin units without impairing their photophysical and inclusion properties, while maintaining their promises for therapeutic and supramolecular applications.

This work was supported by MIUR (FIRB Nanosolar Project, RBAP11C58Y, and Cofin. Prot. 2010N3T9M4), U. of Padova (HELIOS STPD08RCX5), Regione del Veneto (SMUPR n. 4148 "Polo di ricerca nel settore Fotovoltaico"), and U. of Trieste. We thank dr. Riccardo Marega and Prof. Davide Bonifazi (FUNDP Namur) for the hi-resolution XPS analysis.

Notes and references

1 a) A. Dufresne, *Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials*, De Gruyter Editor, Berlin, **2012**. b) Y, Habibi, L.A. Lucia, and O.J. Rojos, *Chem. Rev*. 2010, **110**, 3479.
2 C.M. Cirtiu, A.F Dunlop-Breière, and A. Moores, *Green Chem*., 2011, **13**, 288.
3 a) H. Yano, J. Sugiyama, A.N. Nakagaito, M. Nogi, T. Matsuura, and K. Handa, *Adv. Mat.*, 2005, **17**, 153. b) K.A. Mahmoud, E. Lam, S. Hrapovic, and J.H.T. Luong, *ACS Appl. Mater. Interfaces*., 2013, **5**, 4978.
4 R. Dash, and A.J. Ragauskas, *RSC Advances*, 2012, **2**, 3403.
5 N. Drogat, R. Granet, C. Le Morvan, G. Bégaud-Grimaud, P. Krausz, and V. Sol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, **22**, 3648.
6 See S. Kalia, A. Dufresne, B.M. Cherian, B.S. Kaith, L. Avérous, J. Njuguna, and E. Nassiopoulos, Int. J. Pol. Sci., 2011, 2011, 1 and references therein.
7 K. M. Kadish, K. M. Smith, and R. Guilard, *Porphyrin Science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*, vol. **14-16**. WSPC Ed., 2010.
8 C. Ringot, V. Sol, M. Barriere, N. Saa, P. Bressollier, R. Granet, P. Couleaud, C. Frochot, and P. Krausz, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1716.
9 C. Ringot, V. Sol, R. Granet, and P. Krausz, *Mat. Lett.*, 2009, **63**, 1889.
10 F. X. Redl, M. Lutz, and J. Daub, *Chem. Eur. J.,* 2001, **7**, 5350.
11 a) E. Feese, H. Sadeghifar, A. S. Gracz, D. S. Argyropoulos, and R. A. Ghiladi, *Biomacromolecules,* 2011, **12**, 3528. b) B. L. Carpenter, E. Feese, H. Sadeghifar, D. S. Argyropoulos, and R. A. Ghiladi, *Photochem. Photobiol.,* 2012, **88**, 527.
12 T. Carofiglio, R. Fornasier, V. Lucchini, C. Rosso, and U. Tonellato, *Tetrahedron. Lett.,* 1996, **37**, 8019.
13 M. Bonchio, T. Carofiglio, M. Carraro, R. Fornasier, and U. Tonellato, *Org. Lett.,* 2002, **4**, 4635.
14 C. Danumah, and H. Fenniri, *Mater. Res. Symp. Proc*., 2011, **1312**, 467.
15 N. Lin, C. Bruzzese, and A. Dufresne, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2012, **4**, 4948.
16 I. Filipponen, D.S. Argyropoulos, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1060.
17 a) T. Carofiglio, R. Fornasier, G. Gennari, V. Lucchini, L. Simonato, and U. Tonellato, *Tetrahedron. Lett.,* 1997, **38**, 7919. b) T. Carofiglio, R. Fornasier, V. Lucchini, L. Simonato, and U. Tonellato, *J. Org. Chem*., 2000, **65**, 9013.
18 See for example: a) A. Mezzaglia, N. Micali, L. M. Scolaro, M. T. Sciortino, S. Sortino, and V. Villari, *J. Porph. Phthalocyanins*, 2010, **14**, 661. b) K. Kano, R. Nishiyabu, and R. Doi, *J. Org. Chem.* 2005, **70**, 3667. c) Y. Tsuchiya, T. Shiraki, T. Matsumoto, K. Sugikawa, K. Sada, A. Yamano, and S. Shinkai, *Chem. Eur. J*., 2012, **18**, 456.
19 D. B. Tada, L.L.R. Vono, E.L. Duarte, R. Itri, P.K. Kiyohara, M.S. Baptista, and L.M. Rossi, *Langmuir*, 2007, **23**, 81.

6 PARTE SPERIMENTALE

6.1 Solventi e reagenti

I solventi e i reagenti commerciali impiegati durante il lavoro di tesi, elencati in tabella, sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Il pirrolo è stato filtrato su allumina per eliminare la frazione polimerizzata. L'acqua milliQ è stata prodotta mediante purificazione dell'acqua deionizzata con apparecchiature MILLIPORE.

Solventi	**PM (g/mol)**	**Densità (g/mL)**	**p.e. (°C)**	**Numero CAS**	**Ditta produttrice**
Etanolo	46.07	0.789	78	64-17-5	Fluka
Metanolo	32.04	0.791	64.7	67-56-1	Sigma-Aldrich
Cloruro di metilene	84.93	1.325	39.8-40	75-09-2	Sigma-Aldrich
Acqua deuterata	20.03	1.107	101.4	7789-20-0	Aldrich
Trietil ammina	101.19	0.726	88.8	121-44-8	Sigma-Aldrich
Etile acetato	88.11	0.905	76.5-77.5	141-78-6	Sigma-Aldrich

Reagenti	**PM (g/mol)**	**Densità (g/mL)**	**p.e. (°C)**	**Numero CAS**	**Ditta produttrice**
Acido solforico 95-98%	98.08	1.840	290	7664-93-9	Sigma-Aldrich
TEMPO	156.25	/	/	2564-83-2	Sigma-Aldrich
Sodio ipoclorito, 6-14% cloro attivo	74.44	1.206	111	7681-52-9	Sigma-Aldrich

Reagenti	PM (g/mol)	Densità (g/mL)	p.e. (°C)	Numero CAS	Ditta produttrice
TFA	114.02	1.489	72.4	76-05-1	Sigma-Aldrich
DDQ	227	/	/	84-58-2	Sigma-Aldrich
Benzaldeide	106.12	1.044	178-179	100-52-7	Sigma-Aldrich
Acetammido benzaldeide	163.17	/	/	122-85-0	Sigma-Aldrich
Cellulosa microcrist.	/	0.5	/	9004-34-6	Sigma Aldrich
TMβCD	1429.54	/	/	55216-11-0	Fluka
Potassio Bromuro	119.01	/	/	7758-02-3	Merck Millipore
$TPPS_4$	934.99	/	/	35218-75-8	Sigma-Aldrich
ABDA	410.37	/	/	307554-62-7	Sigma-Aldrich
Sodio fosfato bibasico biidrato	177.99	/	/	10028-24-7	Carlo Erba
L-metionina metil estere cloroidrata	199.70	/	/	2491-18-1	Fluka
Potassio ioduro	166	/	/	7681-11-0	Aldrich
Sodio tiosolfato 0.1N (normex)	248.18	1.2	>100	10102-17-7	Carlo Erba

Reagenti	PM (g/mol)	Densità (g/mL)	p.e. (°C)	Numero CAS	Ditta produttrice
Sodio idrossido (pastiglie)	40.00	/	/	1310-73-2	Analar Normapur
Sodio idrossido 0.01 N (normex)	40.00	1.011	100	1310-73-2	Carlo Erba
Acido cloridrico 37%	36.46	1.2	>100	7647-01-0	Sigma-Aldrich
Acido cloridrico 0.01 N (normex)	36.46	1.15	>100	7647-01-0	Sigma-Aldrich
Sodio bromuro	102.89	/	/	7647-15-6	Riedel-De Haen
MES	195.24	/	/	4432-31-9	Sigma-Aldrich
EDC*HCl	191.70	/	/	25952-53-8	Fluka
NHS	115.09	/	/	6066-82-6	Aldrich
Sodio cloruro	58.44	/	/	7647-14-5	Analar Normapur
Zinco acetato	183.48	/	/	557-34-6	Sigma-Aldrich
Ammoniaca 30-33%	35.05	0.9	38	1336-21-6	Sigma-Aldrich
Sodio acetato	82.03	/	/	127-09-3	Carlo Erba
Sodio idrogeno carbonato	84.01	/	/	144-55-8	Analar Normapur
Sodio solfato	142.04	/	/	7757-82-6	Merck Millipore
Pirrolo	67.09	0.967	131	109-97-7	Sigma-Aldrich

Resina	Capacità di scambio (meq/g)	Numero CAS	Ditta produttrice
Amberlyst 15	4.7	39389-20-3	Sigma-Aldrich

Silice	Dimensione particelle	Ditta produttrice
Silice 60, 0.063-0.2 mm	70-230 mesh	Marcherey-Hagel

6.2 Strumentazione utilizzata

La caratterizzazione dei composti è stata eseguita mediante varie tecniche strumentali (UV-Vis, fluorescenza, FT-IR, termogravimetrica, TEM, DLS, potenziale-Z). Le fasi di centrifugazione e liofilizzazione sono state effettuate rispettivamente mediante centrifuga Thermo scientific SL16 e liofilizzatore LIO 5P.

Le analisi elementari della NCC sono state eseguite presso il laboratorio di microanalisi del Dipartimento di Scienze Chimiche.

Le titolazioni conduttimetriche della NCC-COOH sono state eseguite con conduttimetro Metrohm 660 e cella conduttimetrica Metrohm CH-9100HERISAU.

Gli spettri di assorbimento UV-Vis sono stati ottenuti mediante spettrometro Cary 100 Scan Varian. Gli spettri di assorbimento IR sono stati ottenuti con campioni in pastiglia di KBr mediante spettrometro Nicolet 5700 FT-IR. Gli spettri di fluorescenza sono stati ottenuti con i fluorimetri Cary Eclipse Varian e Perkin Elmer LS55.

Le analisi termiche sono state effettuate mediante TGAQ5000 TA instrument con lo stesso metodo in aria e in azoto (rampa di 10°C/min fino a 80°C, isoterma per 10 min., rampa di 5°C/min fino a 600°C, isoterma per 2 min.).

Le immagini TEM sono state registrate mediante microscopio Tecnai G^2 Fei – 100kV e analizzate con l'aiuto di ImageJ. Gli istogrammi sono stati costruiti con Excel.

Le misure di DLS e di potenziale Z sono state effettuate mediante Malvern Instrument Zetasizer Nanoseries.

Durante la sintesi della porfirina le separazioni cromatografiche su strato sottile sono state effettuate con lastrine di gel di silice 60 F_{254} Merck Millipore. Le separazioni cromatografiche in colonna sono state fatte impiegando Silice 60, 0.063-0.2 mm, Marcherey-Hagel.

Gli spettri di massa dei composti porfirinici sono stati ottenuti con uno spettrometro di massa AB-SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF. Tutti i campioni sono stati deposti su due diverse matrici, l'acido cinnamico e una miscela di ACN-H_2O 1:1 + TFA 0.1% + 2,5 diidrossiacetofenone.

Gli spettri ^{1}H-NMR sono stati registrati mediante spettrometro Bruker Advance a 300 MHz utilizzando come solvente acqua deuterata.

6.3 Procedure di sintesi

a) Sintesi della cellulosa nanocristallina

Si scalda in un becker una soluzione di H_2SO_4 62% w/w (22.5 mL di H_2O milliQ + 21.5 mL H_2SO_4 95-98%) a 45°C tramite un bagno d'acqua calda. Si aggiunge cellulosa microcristallina (5.00 g) e si mantiene la sospensione sotto costante agitazione e riscaldamento. Dopo 2 ore si interrompe la reazione per diluizione con 900 mL di acqua milliQ, quindi si concentra la sospensione tramite 4 centrifugazioni (4000 rpm per 5 minuti). Si esegue un lavaggio con acqua milliQ seguito da centrifugazione (8000 rpm per 5 minuti). La sospensione, di colore bianco opaco, viene posta in un tubo da dialisi immerso in acqua corrente per 6 giorni e successivamente per 2 giorni in acqua milliQ. Si liofilizza il prodotto.

Resa: 58,8% (2,94 g di cellulosa nanocristallina).

IR (pastiglia con KBr) [IR-1]: 3417-3343, 2902, 1653, 1163, 1112, 1060, 1033 cm^{-1}.

b) Sintesi della cellulosa nanocristallina carbossilata

In un pallone di vetro da 250 mL si sospendono 0.500 g di nanocellulosa in 50 mL di acqua milliQ e si sonica per 15 minuti. In un becker si disciolgono 14.83 mg di TEMPO e 162.9 mg di NaBr in 50 mL di acqua milliQ. Si addiziona la soluzione nel pallone di vetro assieme a NaClO 2.73 M (1.780 mL). Si aggiunge NaOH 1 M fino al raggiungimento del pH 10. La miscela di reazione è lasciata sotto costante agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. Si aggiunge 1 mL di etanolo per interrompere la reazione, quindi HCl 0.5 M fino ad ottenere pH 7. Si centrifuga la soluzione (1 centrifugazione, 13000 rpm per 10 minuti) e sul corpo di fondo vengono fatti tre lavaggi con una miscela etanolo:acqua 1:1 seguiti da relative centrifugazioni (13000 rpm per 10 minuti). Il prodotto viene liofilizzato.

Resa: 50% (0.250 g di NCCOOH).

IR (pastiglia con KBr) [IR-2]: 3403-3342, 2903, 1733, 1616, 1163, 1112, 1059, 1035 cm^{-1}.

c) Sintesi della ammino tetrafenilporfirina

In un pallone da 2 L a tre colli munito di ancoretta magnetica, si aggiunge sotto flusso di azoto nell'ordine 1.5 L di cloruro di metilene, 1.44 g di benzaldeide (0.0136 mol), 0.806 g di para ammido benzaldeide (0.00494 mol) e 1.21 g di pirrolo (0.0180 mol) precedentemente filtrato su allumina. Si mantiene il pallone, coperto con carta stagnola, sotto costante flusso di azoto e agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti. Si aggiungono nel pallone 2.768 mL di TFA (0.0361 mol), quindi si lascia attiva l'agitazione ma senza flusso di azoto. La formazione del precursore porfirinico viene monitorata attraverso prove di spettroscopia UV-Vis eseguite su aliquote delle miscela di reazione (0.5 mL) prelevate a tempi diversi. All'aliquota si somministra 1.0 mg di 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone (DDQ) per indurre l'aromatizzazione del porfirinogeno e 2 μL di trietil ammina per interrompere la reazione complessiva. Quando per tempi successivi l'intensità dello spettro porfirinico rimane pressoché costante, la reazione si considera completa e si aggiungono 3.08 g DDQ (0.0136 mol) alla miscela di reazione, mantenendo costante l'agitazione per 1 ora. Quindi si aggiungono 5.030 mL di trietil ammina per bloccare la reazione.

Si esegue una TLC preparativa della miscela di reazione: con eluente cloruro di metilene compaiono due macchie, quella a R_f maggiore corrisponde alla TPP (A_4), l'altra macchia identifica la miscela di tutte le altre possibili porfirine sostituite (A_3B, trans-A_2B_2, cis-A_2B_2, AB_3, B_4 con A=benzaldeide e B para ammido benzaldeide). In eluente cloruro di metilene:etile acetato 80:20 la macchia corrispondente alla miscela delle porfirine "corre" maggiormente e si scinde in più macchie di cui quella a R_f maggiore è la porfirina target della sintesi (A_3B). L'attribuzione delle macchie a vari composti avviene tramite spettroscopia di massa MALDI (per A_3B m/z osservato 672.30, m/z calcolato 672.27 [M+1], per A_4 m/z osservato 615.34, m/z calcolato 615.25 [M+1]).

Si filtra la miscela di reazione su imbuto Büchner quindi si evapora il solvente di reazione tramite evaporatore rotante. Il precipitato ottenuto presenta un colore verde scuro. La separazione della TPP dalla miscela di prodotti avviene impiegando una colonna cromatografica con silice 60, 0.063-0.2 mm ed eluente cloruro di metilene. Le frazioni

raccolte sono monitorate mediante TLC. Le ultime frazioni, teoricamente prive di TPP, presentano ancora il relativo picco nello spettro di massa; molto probabilmente nella prima fase di eluizione la TPP si è trascinata con se parte della miscela rendendo così difficile una separazione efficace del composto. Si decide quindi di eluire il resto della miscela in colonna con etile acetato:cloruro di metilene 50:50 ed effettuare su quest'ultima frazione una nuova colonna cromatografica con eluente cloruro di metilene:etile acetato 80:20.

La frazione A_3B così ottenuta viene impiegata nella reazione di idrolisi del gruppo ammidico. In un pallone di vetro da 250 mL si discioglie il prodotto in 60 mL di etanolo. Vi si aggiungono 40 mL di HCl 37% (0.467 mol) quindi si mantiene a riflusso, con riscaldamento attivo, per 17 ore. Si interrompe la reazione per diluizione con acqua e si estrae la fase organica con cloruro di metilene (5 volte). La fase viene lavata con acqua (3 volte) e con una soluzione satura di $NaHCO_3$ (2 volte). Si anidrifica con Na_2SO_4 e si filtra la fase organica. Si evapora il solvente dalla fase organica ed il precipitato è quindi ri-disciolto in cloruro di metilene ed eluito in colonna cromatografica con silice 60, 0.063-0.2 mm. La natura del prodotto è confermata dallo spettro di massa MALDI (m/z osservato 629.32, m/z calcolato 629,26 [M^+]).

d) Solfonazione dell'ammino tetrafenilporfirina

In un pallone di vetro da 250 mL munito di agitazione si discioglie l'ammino tetrafenil porfirina (A_3B-NH_2) in 20 mL di H_2SO_4 95-98% (0.366 mol). Si mantiene il pallone, coperto con carta stagnola, sotto agitazione a 80°C per 3 giorni. La sospensione appare di colore verde. La reazione è bloccata tramite aggiunta di 20 mL di acqua milliQ. Sulla miscela di reazione si eseguono 4 lavaggi con acqua milliQ e relative centrifugazioni (7000 rpm, 5 min. ciascuna). Si aggiungono 4.5 mL di NH_4OH 30-33% per neutralizzare il pH, quindi si evapora il solvente tramite evaporatore rotante.

Per ottenere la forma sodica della porfirina si utilizza 1 g di una resina a scambio ionico, Amberlist 15 fornita in forma acida dalla Sigma-Aldrich. La resina è caricata con 610 mg di NaCl disciolti nella minima quantità di acqua possibile e sotto agitazione per 1 ora, quindi lasciata decantare e risospesa in nuova acqua milliQ (si controlla che nel surnatante non sia rimasto NaCl tramite aggiunta di $AgNO_3$). Il prodotto, $TPPS_3$-NH_2, disciolto in acqua, è posto a contatto con la resina sotto agitazione per mezz'ora, quindi filtrato per eliminare la

resina e seccato facendo evaporare il solvente con evaporatore rotante. Il solido è di colore rosso scuro con riflessi verdi. La natura del prodotto è confermata dallo spettro di massa MALDI (m/z osservato 868.28, m/z calcolato 869.13 [M^+]).

Resa complessiva (sintesi porfirina+solfonazione): 4.6% calcolata rispetto al pirrolo (0.180 g di porfirina).

IR (pastiglia con KBr): 3452-3432, 2920, 2851, 1621, 1604, 1038, 1012, 802, 740 637 cm^{-1}.

e) Sintesi dell'ibrido cellulosa nanocristallina-tetrafenilporfirina trisolfonata

In una fiala di vetro si sospendono 0.153 g di nanocellulosa carbossilata (D.O. 0.82 mmol COOH/g di NCC) in 18 mL di una soluzione tampone acido 2-(N-morfolino) etansolfonico "MES" 50 mM a pH 4. Dopo aver sonicato la sospensione per 5 minuti, si aggiungono 0.242 g di N-(3-dimetilamminopropil)-N′-etilcarbodimmide "EDC·HCL" (0.00126 mol), 0.1486 g N-idrossisuccinimide "NHS" (0.00129 mol) ed 0.0719 g di tetrafenil porfirina trisolfonata (0.0827 mmol). Si lascia la miscela di reazione sotto costante agitazione e temperatura ambiente per 4 giorni. Tramite centrifugazione si separa la soluzione di porfirina non reagita dal prodotto di reazione (1 centrifugazione, 13000 rpm per 10 minuti). Il prodotto è lavato con acqua milliQ fino a quando il surnatante ottenuto dalla centrifugazione è quasi incolore (9 lavaggi, ogni centrifugazione 13000 rpm per 15 minuti). Si dializza il prodotto in una soluzione satura di NaCl per 1 giorno e successivamente in acqua milliQ per 6 giorni. Dopo 7 giorni di dialisi si liofilizza il prodotto.

Resa: 44.8% (0.06870 g di NCC-$TPPS_3$).

IR (pastiglia con KBr) [IR-3]: 3395-3344, 2904, 1734, 1617, 1161, 1111, 1060, 1034 cm^{-1}.
UV-Vis (in acqua milliQ) λ (nm) [UV-Vis 1]: 418, 519, 560, 600, 650.

f) Metallazione con $Zn(OAc)_2$ dell'ibrido cellulosa nanocristallina-tetrafenilporfirina trisolfonata

In una fiala di vetro si sospendono 0.0253 g di nanocellulosa funzionalizzata, $NCTPPS_3$ in 3 mL di metanolo. Si aggiunge nella fiala una soluzione satura di $Zn(OAc)_2$ (11.4 mg in 2 mL di metanolo). Si mantiene la miscela di reazione sotto leggero riscaldamento (30 °C) e agitazione continua fino a quando lo spettro di assorbimento UV-Vis del composto

metallato non varia più (shift della Soret Band e comparsa di due Q bands). Si centrifuga la soluzione (1 centrifugazione, 12000 rpm per 5 minuti) e sul corpo di fondo vengono fatti tre lavaggi con metanolo e due con acqua milliQ, seguiti da relative centrifugazioni (12000 rpm per 5 minuti). Dopo l'ultima centrifugazione il solido viene liofilizzato.

Resa: 85.8% (0.0217 g di NCC-TPP(Zn)S_3).

UV-Vis (in acqua milliQ) λ (nm) [UV-Vis 3]: 427, 560, 601.

6.4 Procedure strumentali

a) Titolazioni conduttimetriche della cellulosa nanocristallina carbossilata

In un becker si sospende un campione di NCC-COOH (25÷50 mg) in 10 mL di HCl 0.01 N e si sonica per 10 minuti. Si procede titolando il campione con NaOH 0.01 N, ad ogni aggiunta si registra la variazione di conducibilità attraverso un conduttimetro. Il D.O. del composto viene calcolato mediante la seguente equazione:

$$\mathrm{DO} = \frac{162(V_2 - V_1)C}{w - 14(V_2 - V_1)C}$$

V_2 e V_1 = volumi (L) di NaOH tratto orizzontale della curva di titolazione, C = concentrazione NaOH (M), w = massa del campione in grammi

b) Foto-ossidazione della L-metionina metil estere

Si sospendono 1.5 mg di NCC-TPPS_3 in 1.5 mL di D_2O, quindi si sonica fino ad ottenere una sospensione stabile e si aggiungono 54 mg di L-metionina metil estere. La sospensione è suddivisa in due celle di quarzo a volume ridotto. In una cella (cella 1) si aggiungono 153 μL di TMβCD $5.8*10^{-2}$ mM in D_2O e nell'altra (cella 2) un'uguale quantità di D_2O. Entrambe le celle sono saturate con ossigeno e chiuse con setto poroso. Si illuminano entrambe le celle utilizzando una lampada UV Xe/Hg a 500 W, con filtro passa alto (λ > 375 nm). La cella 1 è illuminata per 15 min., 45 min. e 75 min., mentre la cella 2 è illuminata per 15 min. e 75 min. . Dopo ogni intervallo di illuminazione si centrifuga la sospensione presente nelle celle, quindi il surnatante è analizzato mediante spettrometria di massa MALDI. I prodotti di ossidazione dopo 75 minuti di illuminazione sono analizzati anche mediante spettroscopia NMR.

Calcoli per la determinazione del TOF–cella 1- spettro NMR-1

mmol $TPPS_3$: 0.75 mL*0.001 g/mL*0.00311 mmol $TPPS_3$/g NCC=2 .33*10^{-6} mmol

mmol L-Metionina metil estere: (53,9 mg*0,5)/163,24 g/mol=1,65*10^{-1} mmol

mmol TMβCD: 153*10^{-6} L*5.8*10^{-2} mM = 8.9 *10^{-6} mmol

rapporto (mmol L-Metionina metil estere/mmol $TPPS_3$)=70815

rapporto (integrale segnale **I**/ integrale segnale **e**)=0,1808

numero di turnover (TO): 0,1808*70815=12803

frequenza di turnover (TOF): 171 min^{-1}

Calcoli per la determinazione del TOF–cella 2-spettro NMR-2

mmol $TPPS_3$: 0,75 mL*0.001 g/mL*0,00311 mmol $TPPS_3$/g NCC=2,33*10^{-6} mmol

mmol L-Metionina metil estere: (53,9 mg*0,5)/163,24 g/mol=1,65*10^{-1} mmol

rapporto (mmol L-Metionina metil estere/mmol $TPPS_3$)=70815

rapporto (integrale segnale **I**/ integrale segnale **e**)=0,3546

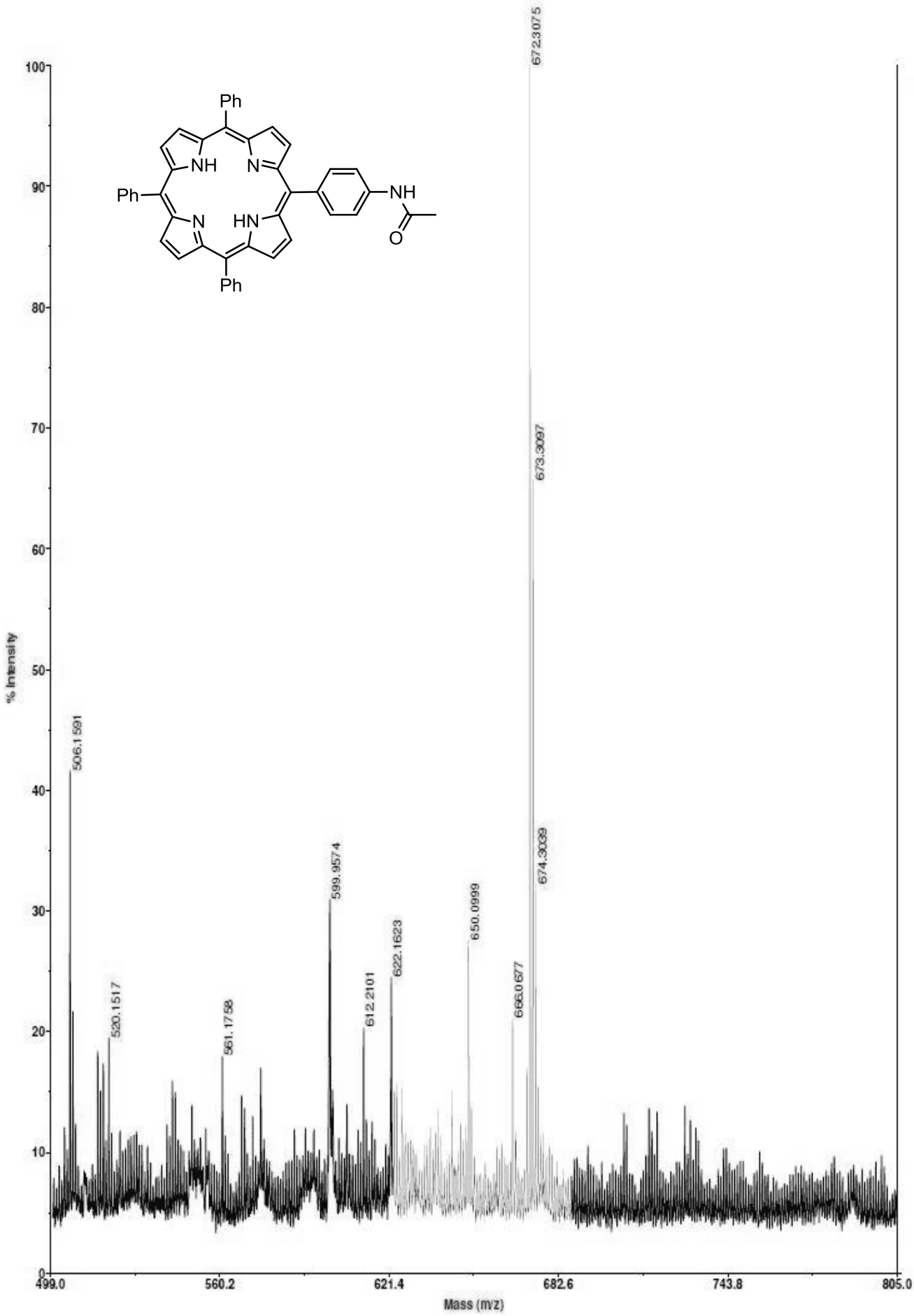
numero di turnover (TO): 0,3546*70815=25111

frequenza di turnover (TOF)=335 min^{-1}

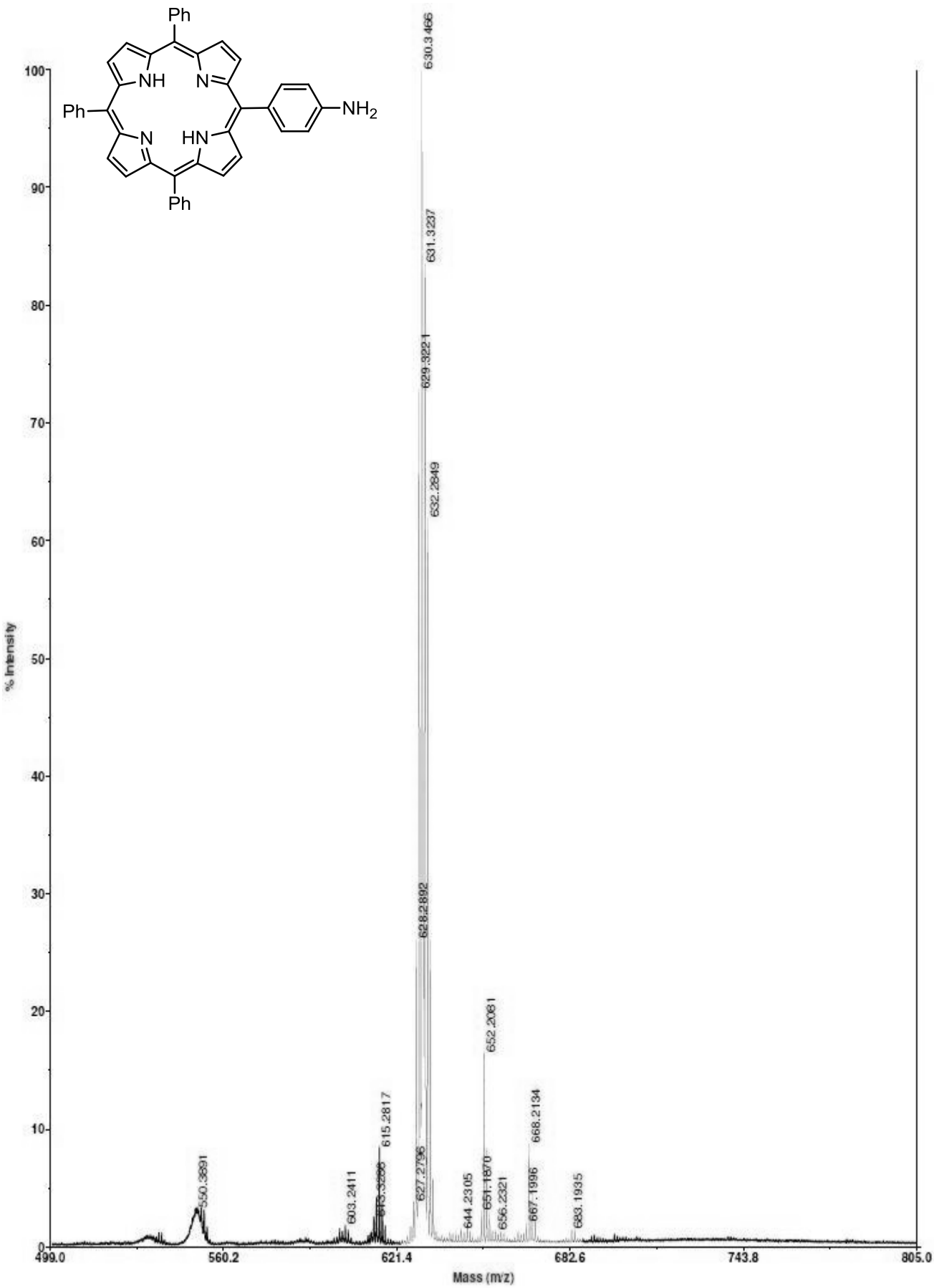
c) Foto-ossidazione del 9,10-antracene-di(metilene) acido dimalonico (ABDA)

Si testa la fotostabilità del composto ABDA mettendo in una cella di quarzo a volume ridotto 24.2 µL di una soluzione acquosa di ABDA 4.65 mM (in forma sodica), 725 µL di D_2O e 100 µL di una soluzione tampone di sodio fosfato bibasico 0.1 M a pH 7. La cella, munita di agitazione con micro ancoretta, è saturata di ossigeno e illuminata con un sistema di LED bianchi (1.5 W) per intervalli di tempo 2 min. fino ad arrivare ad un tempo totale di illuminazione di 12 min. Dopo ogni illuminazione si registra lo spettro UV-Vis. L'ossidazione vera e propria della L-metionina metil estere si ottiene mettendo in un'altra cella di quarzo a volume le stesse quantità delle cella precedente e 0.50 mg di NCC-$TPPS_3$. Si illumina la cella per un tempo totale di 14 min con LED bianchi (1.5 W). L'ossidazione è monitorata registrando lo spettro UV-Vis ogni 2 min. di illuminazione.

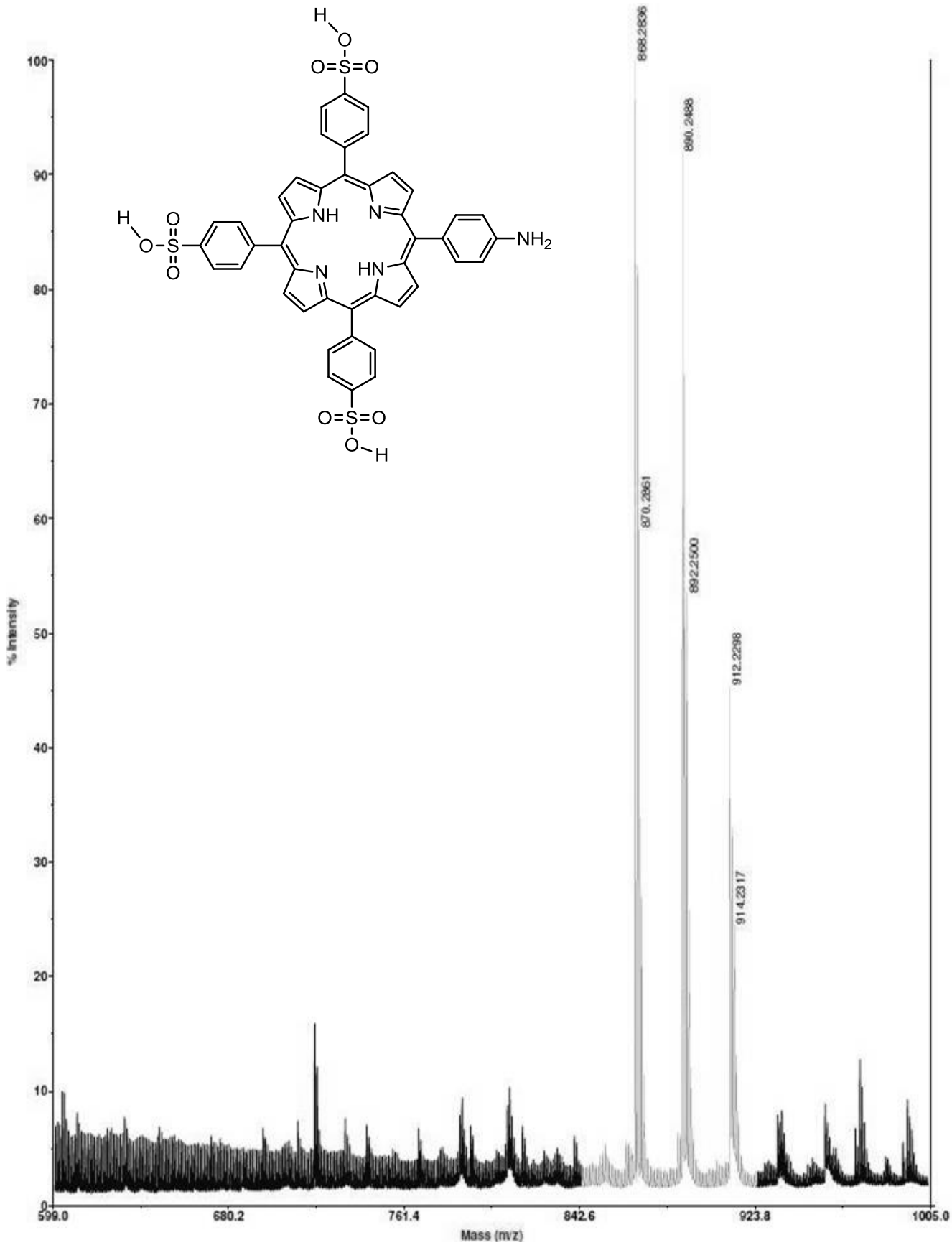
7 APPENDICE: SPETTRI DI MASSA MALDI



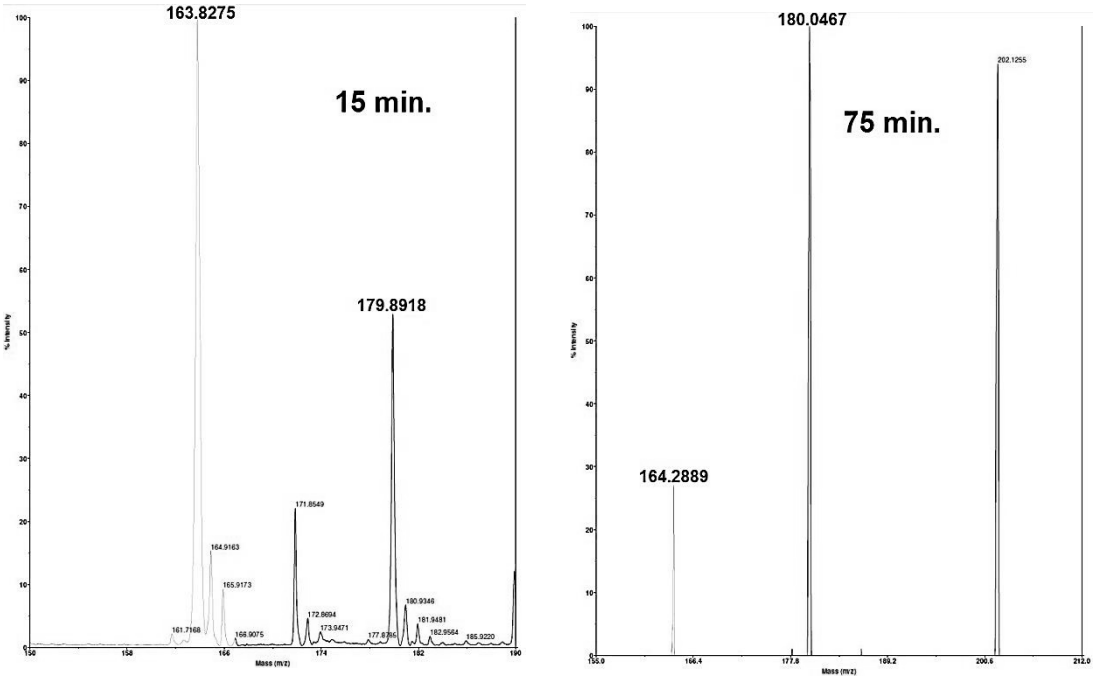
MALDI 1: Spettro di massa MALDI della acetammido porfirina



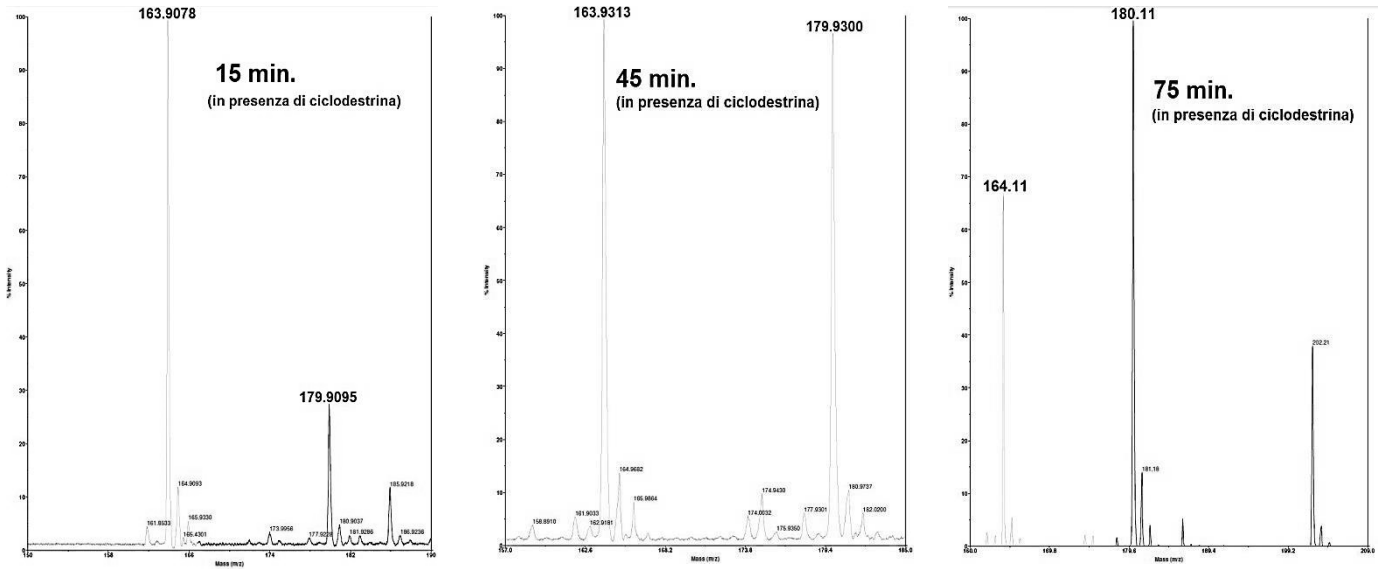
MALDI 2: Spettro di massa MALDI della tetrafenil porfirina (TPP-NH_2)



MALDI 3: Spettro di massa MALDI della tetrafenil porfirina trisolfonata ($TPPS_3$ -NH_2)



Spettri di massa MALDI: Ossidazione della L-metionina metil estere (senza ciclodestrina)



Spettri di massa MALDI: Ossidazione della L-metionina metil estere (con ciclodestrina)

BIBLIOGRAFIA

1 Miriam de Souza Lima, M.; Borsali, R. *Macromol. Rapid Commun.***2004**, 25, 771.

2 Rånby, B. G. *Acta Chem. Scand.* **1949**, 3, 649.

3 Rånby, B. G. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 158.

4 Rånby, B. G.; Ribi, E. *Experimentia* **1950**, 6, 12.

5 Mukherjee, S. M.; Woods, H. *J. Biochim. Biophys. Acta* **1953**, 10, 499.

6 Battista, O. A. *Ind. Eng. Chem.* **1950**, 42, 502.

7 Battista, O. A.; Coppick, S.; Howsmon, J. A.; Morehead, F. F.; Sisson, W. A. *Ind. Eng. Chem.* **1956**, 48, 333.

8 Marchessault, R. H.; Morehead, F. F.; Walter, N. M. *Nature* **1959**, 184, 632.

9 Cirtiu, C. M.; Dunlop-Breière, A. F.; Moores, A. *Green Chem.* **2011**, 13, 288.

10 a)Yano, H.; Sugiyama, J.; Nakagaito, A. N.; Nogi, M.; Matsuura, T.; Handa, K. *Adv. Mat.* **2005**, 17, 153. b) Mahmoud, K.A.; Lam, E.; Hrapovic, S.; Luong, J.H.T. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2013**, 5, 4978.

11 Dash, R.; Ragauskas, A. J. *RSC Advances* **2012**, 2, 3403.

12 Kalia, See S.; Dufresne, A.; Cherian, B. M.; Kaith, B. S.; Avérous, L.; Njuguna, L.; Nassiopoulos, E. *Int. J. Pol. Sci.* **2011**, 1.

13 Drogat, N.; Granet, R.; Le Morvan, C.; Bégaud-Grimaud, G.; Krausz, P.; Sol, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3648.

14 a) Feese, E.; Sadeghifar, H.; Gracz, A. S.; Argyropoulos, D. S.; Ghiladi, R. A. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3528. b) Carpenter, B. L.; Feese, E.; Sadeghifar, H.; Argyropoulos, D. S.; Ghiladi, R.A. *Photochem. Photobiol.* **2012**, 88, 527.

15 a)Liang, C. Y.; Marchessault, R. H. *J. Polym. Sci.* **1959**, 37, 385. b) Liang, C. Y.; Marchessault, R. H. *J. Polym. Sci.* **1960**, 43, 71.

16 Gardner, K. H.; Blackwell, J. *Biopolymers* **1974**, 13, 1975.

17 Sarko, A.; Muggli, R. *Macromolecules* **1974**, 7, 486.

18 Meyer, K. H.; Mark, H.; Zeits, F. *Phys. Chem.* **1929**, B2, 115.

19 Meyer, K. H.; Misch, L. *Helv. Chim. Acta* **1937**, 20, 232.

20 Atalla, R. H.; Vanderhart, D. L. *Science* **1984**, 223, 283.

21 Kuga, S.; Takagi, S.; Brown, R. M. *Jr. Polymer* **1993**, 34, 3293.

22 Wada, M.; Chanzy, H.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Macromolecules* **2004**, 37, 8548.

23 Wada, M.; Heux, L.; Nishiyama, Y.; Langan, P. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 302.

24 a)Chanzy, H.; Imada, K.; Mollard, A.; Vuong, R.; Barnoud, F. *Protoplasma* **1979**, 100, 303 b) Helbert, W.; Sugiyama, J.; Ishihara, M.; Yamanaka, S. *J. Biotechnol.***1997**, 57, 29.

25 Brown, R. M. J. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **1996**, A33, 1345.

26 Williamson, R. E.; Burn, J. E.; Hocart, C. H. *Trends Plant Sci.* **2002**, 7, 461.

27 Haigler, C. H. *In Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*; New York, 1991.

28 Fengel, D.; Wegener, G. *Wood—chemistry, ultrastructure, reactions*; Berlin , 1989.

29 Fink, H. P.; Hofmann, D.; Purz, H. J. *Acta Polym.* **1990**, 41, 131-137.

30 Rowland, S. P.; Roberts, E. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1972**, 10, 2447.

31 Angles, M. N.; Dufresne, A. *Macromolecules* **2001**, 34, 2921.

32 Ruiz, M. M.; Cavaille, J. Y.; Dufresne, A.; Gerard, J. F.; Graillat, C. *Compos. Interfaces* **2000**, 7, 117.

33 Yachi, T.; Hayashi, J.; Takai, M.; Shimizu, Y. *J. Appl. Polym. Sci.:Appl. Polym. Symp.* **1983**, 37, 325.

34 Nishiyama, Y.; Kim, U. J.; Kim, D. Y.; Katsumata, K. S.; May, R. P.; Langan, P. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1013.

35 Battista, O. A. *Ind. Eng. Chem.* **1950**, 42, 502.

36 Kai, A. *Sen-i Gakkaishi* **1976**, 32, T326.

37 Revol, J. F.; Bradford, H.; Giasson, J.; Marchessault, R. H.; Gray, D. G. *Int. J. Biol. Macromol* **1992**, 14, 170.

38 Araki, J.; Wada, M.; Kuga, S.; Okano, T. *Colloids Surf., A* **1998**, 142, 75.

39 Bondeson, D.; Kvien, I.; Oksman, K. *In Cellulose Nanocomposites:Processing, Characterization, and Properties*; Oksman, K., Sain, M. ACS Symposium Series 938; American Chemical Society: Washington DC 2006.

40 Beck-Candanedo, S.; Roman, M.; Gray, D. G. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1048.

41 Elazzouzi-Hafraoui, S.; Nishiyama, Y.; Putaux, J. L.; Heux, L.;Dubreuil, F.; Rochas, C. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 57.

42 De Souza Lima, M. M.; Wong, J. T.; Paillet, M.; Borsali, R.; Pecora, R. *Langmuir* **2003**, 19, 24.

43 Revol, J. F. *Carbohydr. Polym.* **1982**, 2, 123.

44 Terech, P.; Chazeau, L.; Cavaille, J. Y. *Macromolecules* **1999**, 32, 1872.

45 Hanley, S. J.; Revol, J.-F.; Godbout, L.; Gray, D. G. *Cellulose* **1997**, 4, 209.

46 Revol, J. F.; Bradford, H.; Giasson, J. et. al. *Int.J.Biol.Macromol.* **1992**, 14, 170.

47 S. Elazzouzi-Hafraoui, J. L. Putaux and L. Heux, J. Phys. Chem. B **2009**, 113, 11069.

48 Revol, J. F.; Godbout, J. D. L.; Gray, D. G. *International Patent WO* **1995** 95/21901.

49 Dong, X. M.; Kimura, T.; Revol, J. F.; Gray, D. G. *Langmuir* **1996**, 12, 2076.

50 Dong, X. M.; Gray, D. G. *Langmuir* **1997**, 13, 2404.

51 Beck-Candanedo, S.; Viet, D.; Gray, D. G. *Cellulose* **2006**, 13, 629.

52 Beck-Candanedo, S.; Viet, D.; Gray, D. G. *Langmuir* **2006**, 22, 8690.

53 Beck-Candanedo, S.; Viet, D.; Gray, D. G. *Macromolecules* **2007**, 40, 3429.

54 Heux, L.; Chauve, G.; Bonini, C. *Langmuir* **2000**, 16, 8210.

55 R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen and J. Youngblood, *Chem. Soc. Rev*. **2011**, 40, 3941.

56 I. Sakurada, Y. Nukushina et. al. *J. Polym. Sci.* **1962**, 57, 651–660.

57 a) Tashiro, K.; Kobayashi, M. *Polymer* **1991**, 32, 1516. b) Marhofer, R. J.; Reiling, S.; Brickmann, J. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1996**, 100, 1350.

58 Sturcova, A.; Davies, G. R.; Eichhorn, S. J. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1055.

59 Iwamoto, S.; Kai, W. H.; Isogai, A.; Iwata, T. Biomacromolecules **2009**, 10, 2571.

60 Revol, J. F. et al.; *J. Pulp Pap. Sci.* **1998**, 24, 146.

61 Cetin, N. S.; Tingaut, P.; Ozmen, N.; Henry, N.; Harper, D.; Dadmun, M.; Sèbe, G. *Macromol. Biosci.* **2009**, 9, 997.

62 Cao, X. D.; Habibi, Y.; Lucia, L.A. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 38, 7137.

63 Araki, J.; Wada, M.; Kuga, S. *Langmuir* **2001,** 17, 21.

64 Mangalam, A. P.; Simonsen, J. et al. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 497.

65 Azzam, F.; Heux, L; Putaux, J. L.; Jean, B. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3652.

66 Morandi, G.; Heath, L.; Thielemans, W *Langmuir* **2009,** 25, 8280.

67 Yia, J.; Xua, Q.; Zhanga, X.; Zhang, H. *Polymer* **2008**, 20, 4406.

68 Yia, J.; Xua, Q.; Zhanga, X.; Zhang, H. *Cellulose* **2009**, 6, 989.

69 Dong, S.; Roman, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13810.

70 Nielsen, L. J.; Eyley, S.; Thielemans, W.; Aylott, J. W. *Chem.Commun.* **2010**, 46, 8929.

71 Eyley, S.;Thielemans, W. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4177.

72 Hasani, M.; Cranston, E. D.; Westman, G.; Gray, D. G. *Soft Matter* **2008**, 4, 2238.

73 Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*; Gordon and Breach Science, 2000.

74 C. Danumah, and H. Fenniri, *Mater. Res. Symp. Proc.* **2011**, 1312, 467.

75 Bowman, M. D.; Jeske, R. C.; Blackwell, H. E. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2019.

76 Edmond, L. et. al. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2012**, 1, 278.

77 Nooy, A. E. J.; Besemer, A. C.; van Bekkum, H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, 113, 165.

78 Montanari, S.; Roumani, M.; Heux, L.; Vignon, M. R. *Macromolecules* **2005**, 38, 1665.

79 Habibi, Y.; Chanzy, H.; Vignon, M. R. *Cellulose* **2006**, 13, 679.

80 Filipponen, I.; Argyropoulos, D. S. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 1060.

81 Lin, N.; Bruzzese, C.; Dufresne, A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, 4, 4948.

82 Fazio, M. A.; Lee, O. P.; Schuster, D. I. *Org. Lett.* **2008**, 10, 4979.

83 E. Sansiaume et al. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 1593.

84 Lin, N.; Huang, J; Dufresne, A. Nanoscale **2012**, 4, 3274.

85 Uttamlal, M.; Sheila Holmes-Smith, A. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 454, 223.

86 Polo, C. F.; Frisardi, A. L.; Resnik, E. R.; Schoua, A. G. M.; Batlle, A. M. C. *Clin. Chem.* **1988**, 34/4, 757.

87 a) Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Gennari, G.; Lucchini, V.; Simonato, L.; Tonellato, U. *Tetrahedron. Lett.* **1997**, 38, 7919. b) Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Lucchini, V.; Simonato, L.; Tonellato, U. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 9013.

88 Carofiglio, T.; Donnola, P.; Maggini, M.; Rossetto, M.; Rossi, E. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 2815.

89 Tingting, Z.; Hao, W.; Shao Q.Y.; Qing, H. X.; Guo Qin, X. *Langmuir* **2010**, 26, 14937.

90 Zhao, B.; Yin, J. J. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, 241, 163.

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il Professore Tommaso Carofiglio, relatore della mia tesi, per la grande dedizione, la simpatia e l'entusiasmo con cui mi ha seguito durante questo progetto di tesi, nonché per avermi fatto provare concretamente la ricerca scientifica.
Ringrazio il Dottore Marco Ruzzi per i consigli e le osservazioni che mi ha fornito circa il mio lavoro di tesi. Ringrazio il Professore Michele Maggini per avermi dato la possibilità di svolgere la mia tesi presso il suo gruppo di ricerca.
Ringrazio tutti i ragazzi del Lab 205 per questi 8 mesi passati insieme, per avere allietato la mia presenza con le chiaccherate serie e non. Complimenti perché non è facile lavorare in tanti nello stesso spazio e voi mi avete dimostrato di essere un' ottima compagnia di persone con cui si riesce a lavorare serenamente. In particolare ringrazio Prashant, mio "tutore" in laboratorio, che mi ha seguito fin dai primi giorni del mio ingresso in tesi insegnandomi le basi necessarie ad affrontare il lavoro di tesi (e per aver messo a dura prova il mio inglese "scolastico"). Ringrazio Enrico, Simone e Patrizio per il tempo e la pazienza che più volte hanno dedicato a me.
Ringrazio Marco, mio compagno di cappa, per tutto il lavoro che abbiamo svolto assieme.
Ringrazio il gruppo di ricerca del Professore Maurizio Prato dell'Università di Trieste per la collaborazione avuta durante questo progetto di tesi.
Infine desidero ringraziare la mia famiglia che sempre mi ha permesso di studiare secondo i miei interessi, senza farmi mancare nulla. Questo traguardo lo devo anche a lei.