



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Scienze Chimiche

Coloranti BODIPY per la funzionalizzazione di nanotubi di carbonio

Bodipy dyes for the functionalisation of carbon nanotubes

Relatore
Stefano Cicchi

Candidato
Furio Lanciano

Sommario

1 Sommario

1	Sommario	2
2	Scopo del lavoro	4
3	Introduzione	6
3.1	Click chemistry.....	6
3.1.1	Classificazione delle reazioni Click.....	6
3.2	Sonde fluorescenti.....	9
3.2.1	La famiglia dei Bodipy.....	10
3.2.2	Sintesi dei Bodipy	11
3.2.2.1	Da aldeidi e pirroli	12
3.2.2.2	Da pirroli e derivati carbossilici	12
3.2.2.3	Da pirrolidin-2-carbossialdeide	13
3.2.3	Criteri di progettazione per una sonda fluorescente	14
3.2.4	Modifica della struttura del <i>Bodipy</i>	15
3.2.5	Nuovi usi del Bodipy	18
3.3	Nanotubi di Carbonio e Drug Delivery.....	21
3.3.1	Caratteristiche e tipologie	21
3.3.2	Impiego in drug delivery.....	23
4	Descrizione del lavoro	27
4.1	Sintesi del Bodipy Core	27
4.2	Sintesi dei derivati del Bodipy Core.....	32
4.2.1	Con piridin-2-carbossialdeide.....	32
4.2.2	Con <i>p</i> -idrossibenzaldeide	35
4.2.3	Con benzaldeide	39
4.3	Sintesi del nitro-addotto del Bodipy Core mediante nuova via sintetica.....	44
4.4	Preparazione dell'addotto Bodipy-piridina (38) – nanotubi di carbonio	47
4.4.1	Preparazione dei nanotubi di carbonio (Ossidazione)	47
4.5	Test biologici e caratteristiche spettrofotometriche.....	50
4.5.1	Microscopio confocale.....	50
4.5.2	Sonde fluorescenti.....	51
4.6	Addotti con i nanotubi.....	54
4.6.1	Con Bodipy Core	54
4.6.2	Con Bodipy-piridina	55
4.7	Test biologici e analisi al microscopio confocale	57
4.7.1	Citofluorimetria	57

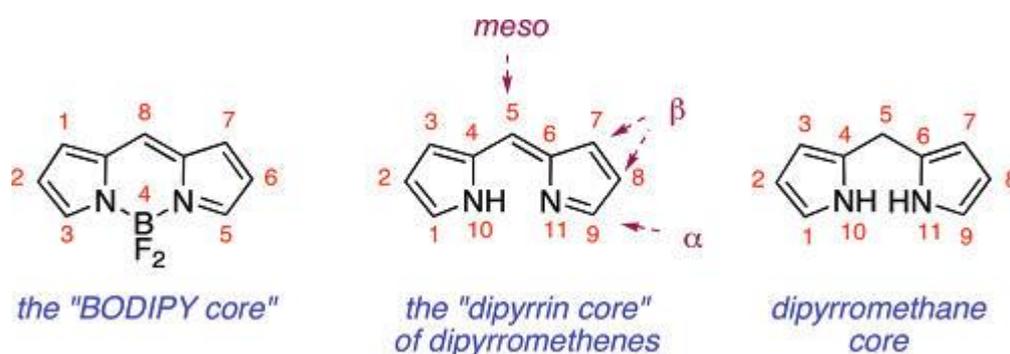
Sommario

4.7.2	Microscopia confocale.....	60
5	Conclusioni	62
6	Sviluppi futuri	63
7	Parte sperimentale	64
7.1	Reagenti e strumentazione	64
7.2	Acronimi e formule utilizzate	65
7.3	Sintesi effettuate	67
7.3.1	Sintesi del composto 8-(4-nitrofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (36).....	67
7.3.2	Sintesi del composto 8-(4-amminofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a,-diaza-s-indacene (37)	69
7.3.3	Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a,-diaza-s-indacene (1)	70
7.3.4	Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(piridin-2-il)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (38)	72
7.3.5	Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(piridin-2-il)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (38)	74
7.3.6	Sintesi dell'addotto 46.....	76
7.3.7	Sintesi dell'addotto 46.....	77
7.3.8	Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(4-fenolil)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (39).....	79
7.3.9	Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(4-fenolil)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (40).....	83
7.3.10	Sintesi del composto 8-(4-nitrofenil)-1,3,5,7-tetrametil-3a,4a-diaza-s-indacene (41)	87
7.3.11	Sintesi del composto 8-(4-nitrofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (36).....	88
8	Bibliografia.....	89

Scopo del lavoro

2 Scopo del lavoro

Il seguente lavoro di tesi si concentra sulla sintesi e la caratterizzazione di derivati della molecola 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, detto altrimenti Bodipy (*figura 1*). Queste sono sonde fluorescenti, oramai note in letteratura, usate in moltissimi campi¹⁻³.



*figura 1: struttura del BODIPY*²

In questo lavoro di tesi il “**Bodipy Core**” usato come base di partenza per le sintesi dei suoi derivati è quello illustrato in *figura 2*. Come si nota è a sua volta un derivato del Bodipy Core illustrato in precedenza.

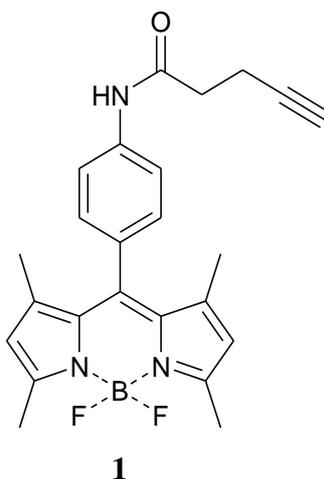


figura 2: Bodipy Core

Esso presenta un anello aromatico sostituito con un gruppo ammidoalchinico terminale e quattro gruppi metilici in posizioni 1, 3, 5, 7. Come vedremo in seguito il gruppo ammidoalchinico terminale ci permette di procedere con la reazione di CuAAC (acronimo per *Coppercatalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*), facente parte di una famiglia di reazioni sotto il nome di “Click Chemistry”. I gruppi metilici invece rendono questa molecola un ottimo *building block* per ulteriori funzionalizzazioni; in

Scopo del lavoro

particolar modo ci concentreremo sull'estensione della coniugazione per formare nuovi fluorofori, tramite reazione di *Knoevenagel*, catalisi acida e presenza di una base e di un aldeide, come descritto generalmente nella *figura 3*.

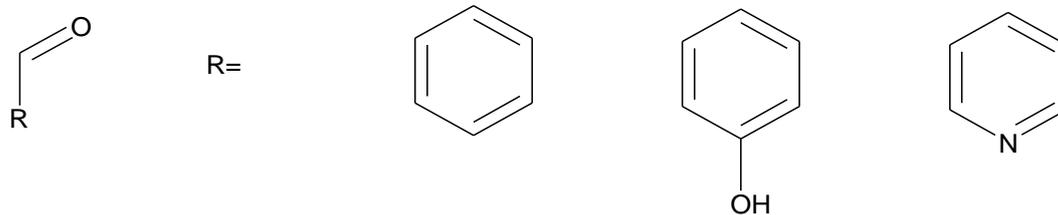


figura 3: Aldeidi utilizzate nella sintesi

I derivati sintetizzati sono serviti come sonde fluorescenti di nanotubi di carbonio per uno studio di *drug delivery*. L'attacco su quest'ultimi è avvenuto proprio in virtù del gruppo immino-terminale, sfruttato nella reazione di cicloadizione CuAAC.

3 Introduzione

3.1 Click chemistry

Da quando nel 1999, durante il 217° incontro annuale de “American Chemical Society”, il gruppo del Dr. Sharpless introdusse per la prima volta la dicitura “Click chemistry”, questa è diventata uno dei principali argomenti, come evidenziato da una crescita quasi esponenziale di pubblicazioni a riguardo. La “Click chemistry” viene così definita, dal Dr. Sharpless: “... deve essere modulare, di ampia portata, dare rese molto elevate, generare sottoprodotti inoffensivi che possano essere rimossi da metodi non cromatografici, essere stereospecifica (ma non necessariamente enantioselettiva). I processi devono essere caratterizzati da condizioni di reazione semplici (idealmente dovrebbero essere inerti all’ossigeno e all’acqua), da reagenti di partenza facilmente e velocemente reperibili, l’assenza di solvente o comunque un solvente facilmente rimovibile ed un prodotto di facile isolamento. La purificazione, se richiesta, non deve prevedere metodi cromatografici e il prodotto deve risultare stabile in condizioni fisiologiche”. In altre parole “... tutte le ricerche devono essere ristrette a molecole che siano di facile preparazione”⁴.

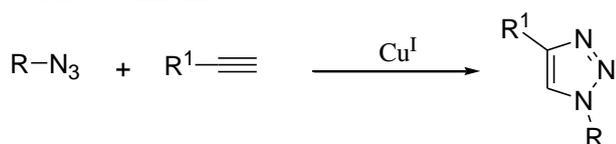
3.1.1 Classificazione delle reazioni Click

Esistono fondamentalmente quattro tipologie di reazioni Click, esemplificate nello *schema 1*⁴:

- Cicloaddizioni – in particolare si fa riferimento alle cicloaddizioni 1,3-dipolari, ma si possono trovare anche le Etero cicloaddizioni di Diels-Alder (HDA);
- Apertura nucleofica di un anello – ci si riferisce all’apertura di eterocicli elettrofili tesi, come epossidi, aziridine, solfati ciclici etc.;
- Chimica del carbonile di tipo non aldolico – esempi includono la formazione di urea, eteri ossimici, idrazoni, etc.; le reazioni carboniliche di tipo aldolico non sono guidate fortemente dall’aspetto termodinamico, per cui presentano tempi di reazione lunghi e, spesso, sottoprodotti, motivi per cui non rientrano sotto la categoria “Click”;
- Addizione a legami multipli Carbonio-Carbonio – esempi includono epossidazione, diidrossilazione, alcune addizioni di Michael etc.;

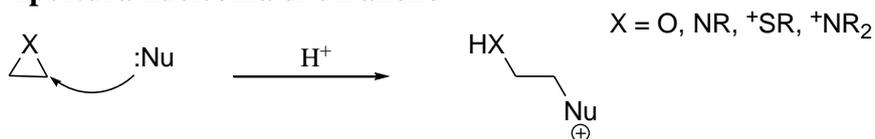
Introduzione

Cicloaddizioni

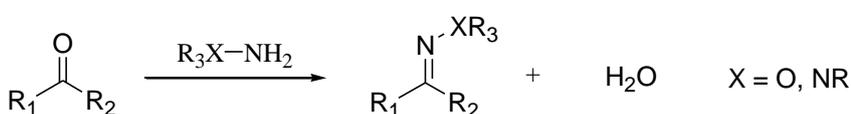


(Cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen tra azidi e alchini terminali)

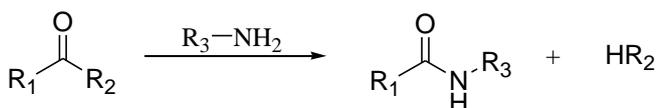
Apertura nucleofila di un anello



Chimica del carbonile di tipo non aldolico

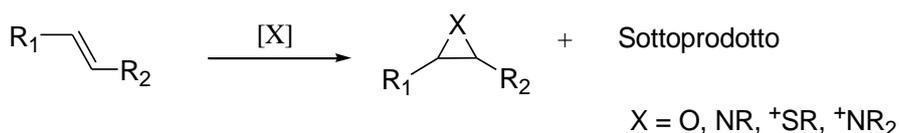


(Formazione di idrazone/etere ossimico)



(Formazione di ammido/isourea)

Addizione a legami multipli C-C



(Formazione di vari anelli a 3 termini)



(Alcune addizioni di Michael)

Schema 1: schema riassuntivo reazioni di click chemistry⁴; “Nu” Nucleofilo, “GEA” Gruppo Elettron Attrattore

Di queste quattro famiglie, le cicloaddizioni 1,3-dipolari sono, indubbiamente, le più usate, in particolar modo la Cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen Cu^I-catalizzata (Cu^I-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, HDC), tra un’azide ed un alchimo terminale per formare 1,2,3-triazoli⁴. La

Introduzione

reazione CuAAC nonostante sia stata la più indagata e sviluppata presenta comunque dei limiti applicativi se condotta *in vivo*; ad esempio è noto il suo ruolo nell'aumento dello stress ossidativo in presenza di biomolecole. Questo perché la catalisi tramite Cu^I può comportare la formazione di alcuni ROS (Reactive Oxygen Species) come H₂O₂, l'idrossile (·OH), e il superossido (O₂⁻), radicali molto dannosi nei confronti dei sistemi biologici. La produzione di ·OH, il più pericoloso tra i ROS, è mediata dalla reazione di Fenton in presenza di un metallo di transizione, nel nostro caso Cu^I, e H₂O₂ (a). H₂O₂ richiesta può essere sintetizzata *in situ* in due modi: in presenza di ascorbato (AH₂), O₂ può essere ridotto a H₂O₂ in presenza di catalizzatori tipo Cu^{II} o altri ioni di metalli di transizione (b); in assenza di ascorbato o di altri agenti riducenti, Cu^I può ridurre O₂ a H₂O₂, attraverso un processo in due step comprendente una mediazione del superossido O₂⁻ (c,d). Nello **schema 2** sono illustrati i suddetti processi^{5,6}.

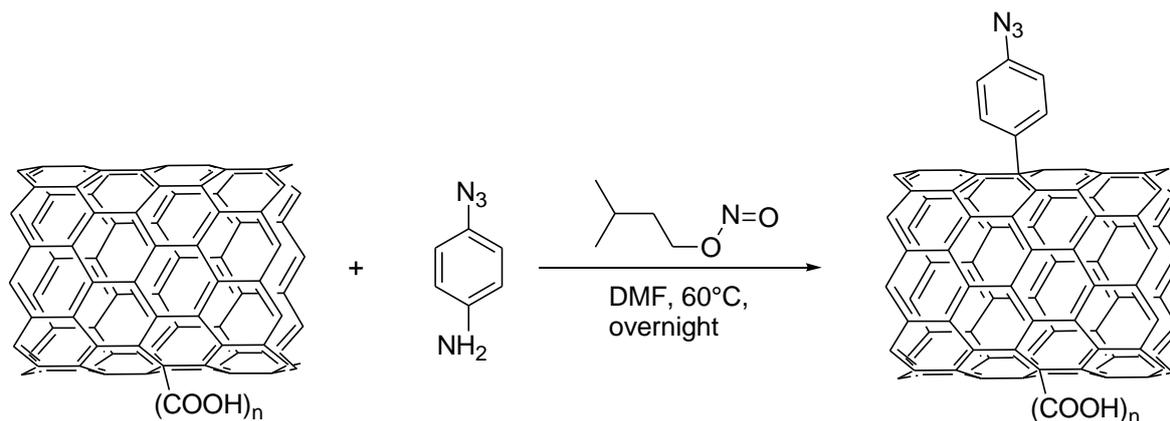


Schema 2: riepilogo reazioni di formazione di ·OH

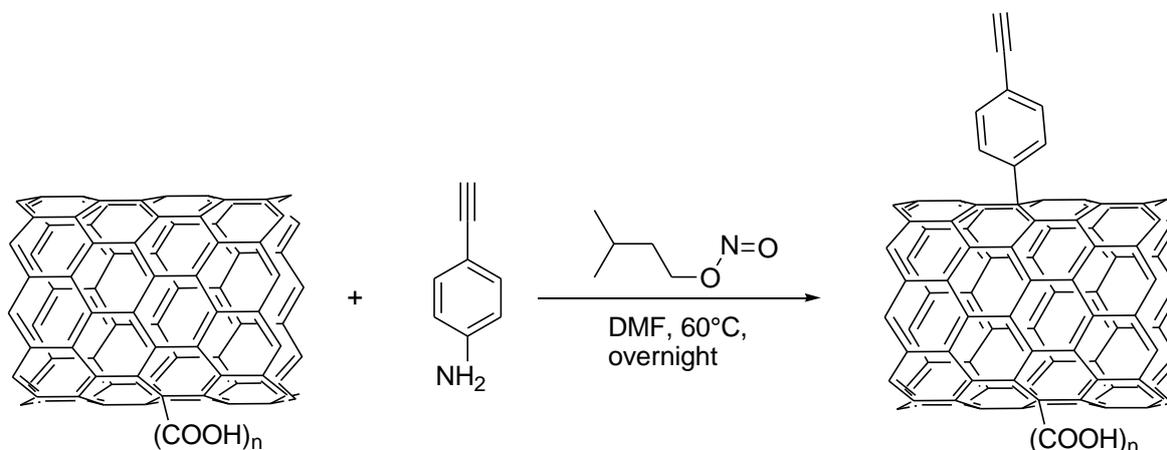
Inoltre non bisogna dimenticare della tossicità stessa dell'elemento Cu, usato come catalizzatore. Nonostante il nostro corpo abbia bisogno del rame, un'eccessiva assunzione può portare a drastiche conseguenze, come epatiti, disordini neurologici, patologie renali etc... Una delle cause per queste conseguenze risiede nelle problematiche sopra citate; ovviamente a quelle se ne dovrebbero aggiungere altre. Appare, quindi, evidente che l'utilizzo *in vivo* di questa reazione presenta delle difficoltà applicative, nonostante recenti studi hanno dimostrato di essere in grado di rimuovere fino al 98% di rame⁴

Inoltre non bisogna dimenticare la pericolosità della famiglia delle azidi, in quanto quando il rapporto tra atomi di Carbonio e atomi di Azoto tende a 1 o, addirittura a meno, questi composti sono altamente esplosivi, il cui innesco non richiede niente di più che una piccola quantità di energia esterna, come il calore o la pressione. E, sebbene in ambito farmaceutico il rapporto è spesso molto più grande di 1, in virtù di lavori su grandi molecole dai grandi contenuti in Carbonio, all'infuori del suddetto ambiente spesso rappresenta un problema (anche nel nostro personale lavoro di tesi la formazione e la successiva manipolazione dell'azide ha rappresentato uno step molto delicato). Noi, nel nostro studio, abbiamo utilizzato la catalisi mediante Cu per funzionalizzare dei nanotubi di carbonio tramite reazione di *click chemistry*, a sua volta precedentemente preparati con una funzione azide o alchino terminale, come nello schema seguente (**schema 3**):

Introduzione



Reazione di Tour



Reazione di Tour

Schema 3: funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio con funzione azido o alchino terminale per successiva ulteriore funzionalizzazione tramite reazione di CuAAC

3.2 Sonde fluorescenti

Spettroscopia di fluorescenza, imaging di fluorescenza e indicatori fluorescenti sono oggi strumenti indispensabili in moltissimi campi come la medicina, la scienza, la diagnostica clinica, la biochimica, la biologia molecolare e moltissimi altri¹. La famiglia di coloranti *BODIPY*, nonostante sia apparsa la prima volta nel 1968 grazie a Treibs e Kreuzer, non venne presa seriamente come possibile sonda fluorescente, marcatore biologico o interruttore fluorescente (e molto altro) fino alla metà degli anni '90. Da allora vi è stato un ingente aumento di pubblicazioni e brevetti a riguardo¹.

Introduzione

3.2.1 La famiglia dei Bodipy

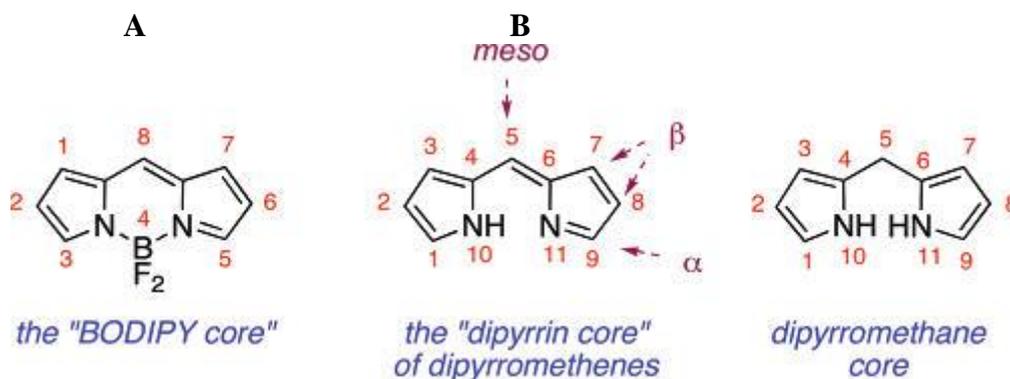


figura 1: struttura del BODIPY²

In **figura 1** viene mostrato il cosiddetto *BODIPY Core* (A) il quale, però, non è mai stato isolato. Questo, infatti, è dovuto alla sua estrema reattività a sua volta dovuta alla mancanza di sostituenti sui carboni pirrolici. Viene, invece, riportata in letteratura la sintesi del suddetto *dipyrroin core* (B), o dipirrometene, precursore del *Bodipy core*; anche quest'ultimo risulta molto instabile, decomponendosi a temperature superiori a -40°C . Il primo semplice Bodipy sintetizzato è il Bodipy dimetil sostituito (C) (**figura 4**) e viene usato come riferimento per altrettante strutture semplici di Bodipy alchilati².

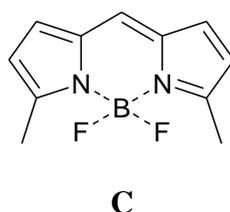
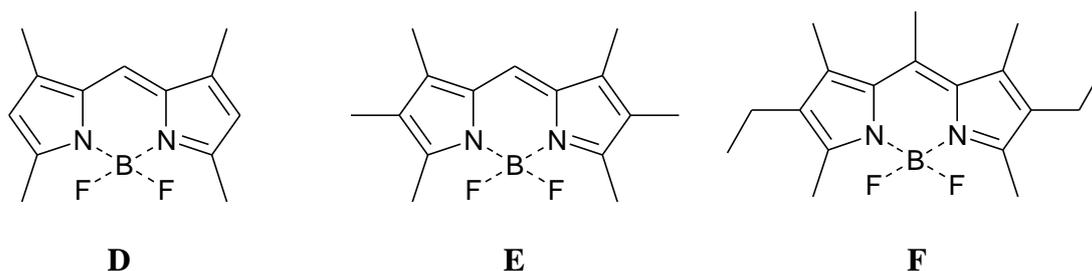


figura 4: Bodipy 3,5-dimetil sostituito, EtOH, Φ 0.81; $\lambda_{\text{max abs}} = 506 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max emiss}} = 520 \text{ nm}$

Se passiamo a sistemi tetra-, esa-, epta-sostituiti, simmetrici, e li si compara tra loro (**figura 5**), si può definire che lo shift di fluorescenza tende al rosso in modo molto chiaro²;



Introduzione

figura 5: **D**, EtOH, Φ 0.80; $\lambda_{max\ abs}= 505\ nm$, $\lambda_{max\ emiss}= 516\ nm$; **E**, EtOH, Φ 0.56; $\lambda_{max\ abs}= 528\ nm$, $\lambda_{max\ emiss}= 535\ nm$; **F**, EtOH, Φ 0.70; $\lambda_{max\ abs}= 517\ nm$, $\lambda_{max\ emiss}= 546\ nm$

Si è quindi visto l'effetto dei sostituenti alchilici sui carboni pirrolici; passando all'effetto dei sostituenti alchilici o arilici in posizione *meso*, non si rilevano grosse incidenze sui valori delle lunghezze d'onda d'assorbimento o di emissione di fluorescenza, mentre è abbastanza incidente sulla resa quantica di quest'ultima (basti confrontare i valori dei prodotti **H** e **D** ad esempio) (**figura 6**)².

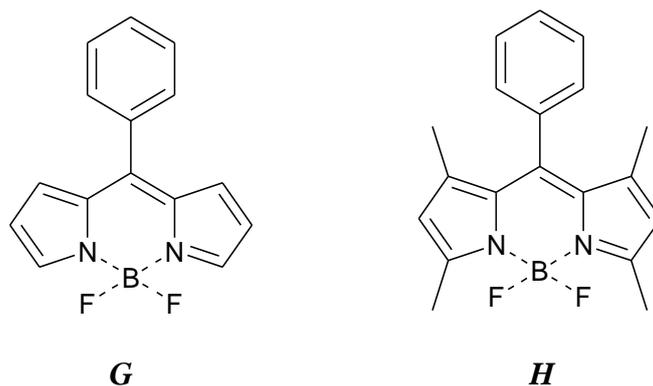


figura 6: **G**, MeOH, Φ 0.19; $\lambda_{max\ abs}= 508\ nm$, $\lambda_{max\ emiss}= 519\ nm$; **H**, MeOH, Φ 0.65; $\lambda_{max\ abs}= 498\ nm$, $\lambda_{max\ emiss}= 508\ nm$;

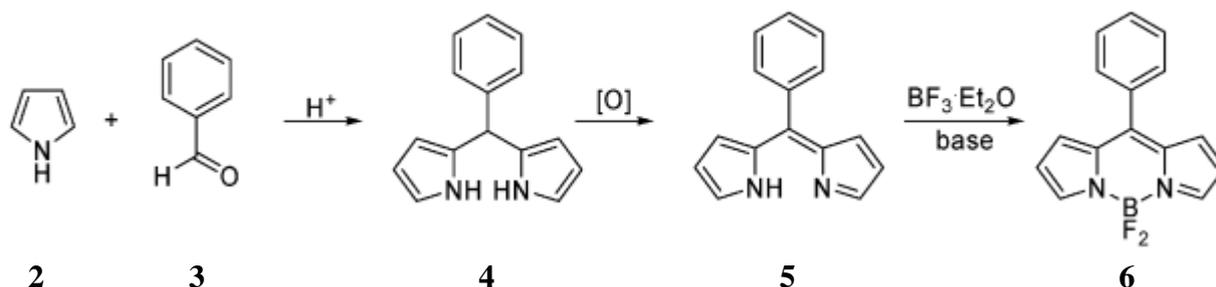
La differenza invece presente tra gli esempi **G** e **H** lo si deve principalmente alla presenza dei gruppi metilici 1,7 che irrigidendo la molecola e, in particolar modo, impedendo la libera rotazione del gruppo fenile, riducono la perdita di energia dagli stati eccitati per via non radiativa.

3.2.2 Sintesi dei Bodipy

In letteratura esistono molteplici fonti descrittive delle vie sintetiche per la formazione di un'infinità di classi di composti appartenenti alla suddetta famiglia^{1,2}. Ne descriverò in seguito solo alcune, tra cui quelle da noi utilizzate, non volendo essere questo il luogo per un'esauriva descrizione di tutte le vie sintetiche.

Introduzione

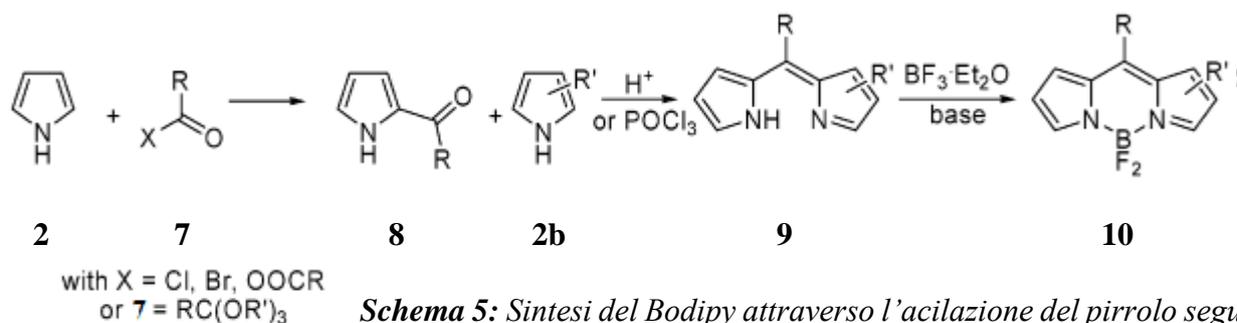
3.2.2.1 Da aldeidi e pirroli



Schema 4: Condensazione tra pirrolo (2) e un'aldeide aromatica (3), per ottenere il dipirrometano (4). Per successiva ossidazione e complessazione si ottiene il BODIPY (6) finale¹

La condensazione acido-catalizzata tra pirrolo ed aldeidi porta alla formazione di dipirrometani (*schema 4*). Per pirroli non sostituiti, il processo viene condotto utilizzando il pirrolo stesso come solvente, così da prevenire la polimerizzazione; modificazioni della procedura possono permettere l'utilizzo di un minor numero di equivalenti di pirrolo stesso. Ovviamente per pirroli 2-sostituiti le condensazioni multiple non rappresentano una reazione competitiva, per cui non è necessario un eccesso di pirrolo. Il prodotto 4, essendo abbastanza instabile, sensibile alla luce, aria e acidi, deve essere utilizzato immediatamente. L'ossidazione di 4 porta alla formazione di un dipirrometene. La suddetta ossidazione può essere eseguita con DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone) o *p*-cloranile (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzochinone) per condizioni di reazioni più blande. In generale è raro trovare esempi di utilizzo di aldeidi non aromatiche, in quanto lo step di ossidazione tende a fallire in questi casi. Il trattamento del prodotto 5, così ottenuto, con BF₃·Et₂O, sotto catalisi basica, produce il prodotto 6 con rese elevate¹.

3.2.2.2 Da pirroli e derivati carbossilici

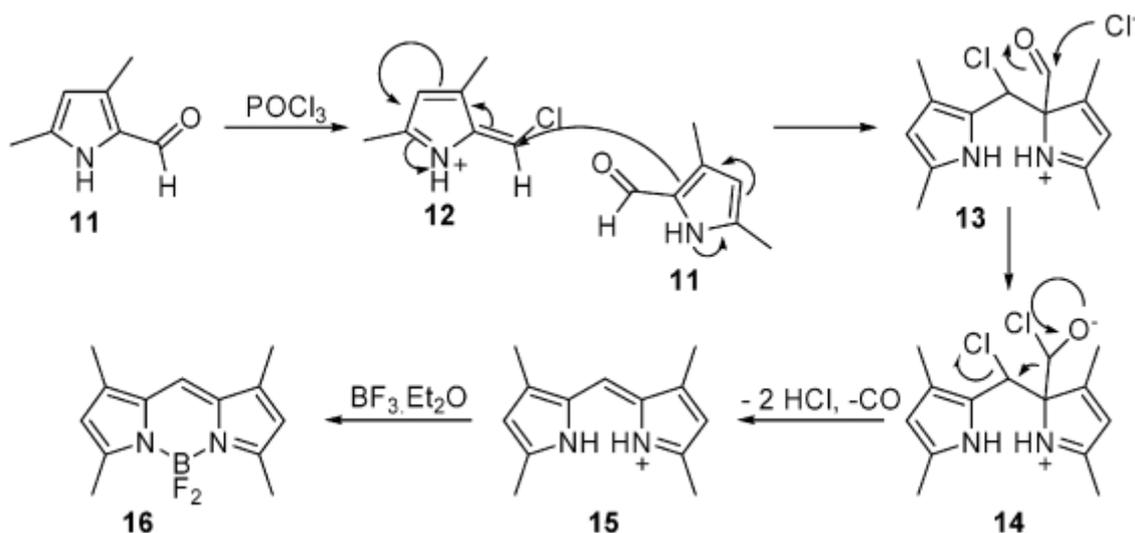


Schema 5: Sintesi del Bodipy attraverso l'acilazione del pirrolo seguita da condensazione e complessazione¹

Introduzione

Un'altra via sintetica possibile, prevede l'uso di pirroli e derivati carbossilici, come cloruri acilici, anidridi, ed ortoesteri. Tramite lo *schema 5* è possibile individuare gli step necessari; si parte dalla condensazione del pirrolo **2** con un derivato acilico generico, **7**. Il prodotto così formato, l'acilpirrolo **8**, che non è solitamente isolato, viene trasformato nel dipirrometene. La particolarità di questa via sintetica risiede nel fatto che è possibile sintetizzare molti dipirrometeni asimmetrici, questo grazie alla possibilità di far reagire l'intermedio acilpirrolico **8** con un ulteriore derivato acilico **2b**, diverso da quello di partenza, in una condensazione acido-catalizzata. Un passaggio con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, in eccesso di base, produce, come già precedentemente descritto, una resa elevata del complesso finale **10**¹.

3.2.2.3 Da pirrolidin-2-carbossialdeide



*Schema 6: Condensazione-decarbonylazione one-pot del pirrol-2-carbossialdeide per la formazione di dipirrometene e BODIPY*¹

Una terza strada, descritta nello *schema 6*, descrive un interessante alternativa alla condensazione di un acil-pirrolo. L'ossicloruro di fosforo porta alla formazione dell'*azafulvene* **12**, attaccato a sua volta da una seconda molecola di pirrol-2-carbossialdeide **11**. Il successivo attacco nucleofilo dello ione cloruro, seguito dalla decarbonylazione, portano prima al dipirrometene **15** che, come già in precedenza, viene complessato al BODIPY finale **16**. Il prodotto essendo frutto di una procedura one-pot e richiedendo poca purificazione è generalmente ottenuto in eccezionalmente alte rese¹.

3.2.3 Criteri di progettazione per una sonda fluorescente

Purtroppo i criteri che dovrebbero essere tenuti in conto simultaneamente e ottimizzati allo stesso modo, sono molti¹:

- Alta selettività ed alta risposta di fluorescenza all'analita in questione senza esser soggetto a reazioni competitive con altri analiti presenti;
- Robustezza della sonda, intesa come alta resistenza sia ad agenti chimici sia alla luce;
- La fluorescenza deve essere il più intensa possibile, richiedendo larghi valori di ϵ (λ) alla lunghezza d'onda λ di eccitazione e resa quantica Φ molto elevata;
- Se la risposta deve essere tempo-dipendente, allora il meccanismo associativo-dissociativo tra recettore e analita deve essere veloce, così da permettere un'indagine in tempo reale della concentrazione;
- Il segnale di fluorescenza generato dalla "accensione" della sonda (ad esempio enhancement di fluorescenza o shifts sulla lunghezza d'onda di eccitazione e/o emissione, deve essere favorito sulla risposta di tipo "spegnimento" (ad esempio, quenching di fluorescenza), con un concomitante rapporto segnale/rumore più basso;
- Indicatori che assorbono ed emettono luce nel visibile o nel vicino infrarosso NIR (650-900 nm) sono da preferirsi, poiché in grado di offrire numerosi vantaggi rispetto a quelli UV:
 - Disponibilità di laser a basso costo come efficienti fonti di eccitazione;
 - Lunghezze d'onda di emissione compatibili con detector non troppo cari;
 - Mancanza totale di costosa attrezzatura ottica al quarzo;
 - Un minor scattering della luce;

Alcuni dei criteri sopracitati sono particolarmente importanti per l'indagine all'interno di cellule vive:

- Selettività per un specifico analita rispetto agli altri analiti cellulari;
- La intensità di fluorescenza della sonda né permette una sua minor concentrazione all'interno della cellula stessa, riducendo di fatto la fototossicità verso le stesse;
- Profili di eccitazione ed emissione nel NIR minimizzano i danni indotti dalla luce al campione e i fenomeni di auto-fluorescenza dovuta a cromofori endogeni;

Introduzione

Nel NIR, i campioni biologici hanno una bassa fluorescenza di background che produce, di conseguenza, un alto rapporto S/N; inoltre in questa banda, lo scattering Rayleigh e Raman è ridotto, permettendo alla luce una grande capacità di penetrazione nei tessuti e nelle cellule biologiche. Motivi, tutti questi, per cui un sensore fluorescente nel NIR detiene un enorme potenziale per le applicazioni di *imaging in vivo*¹.

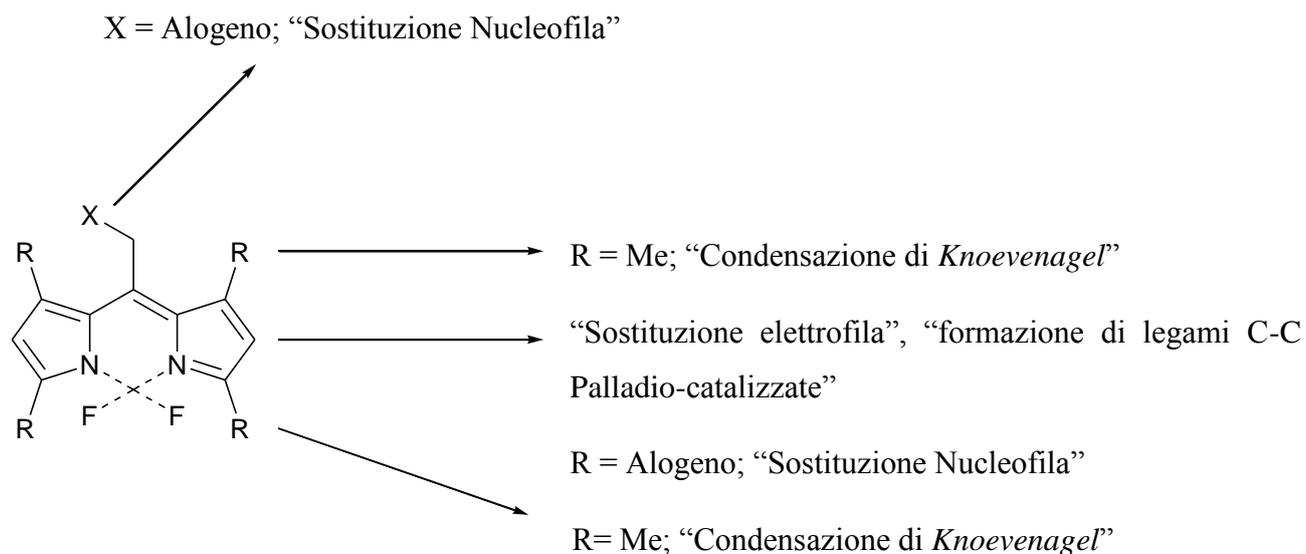
A tutto questo dobbiamo aggiungerci che, in ambiente biologico, viene richiesta anche una certa solubilità in acqua, permeabilità di membrana ed una tossicità minima verso i campioni. La permeabilità di membrana è una caratteristica strettamente legata al pH, per cui nello sviluppo del colorante d'uso biologico è un argomento da tenersi prepotentemente in considerazione¹.

Da questo punto di vista il Bodipy, pur non presentando tutte le peculiarità sopradescritte, si presenta come un ottimo investimento come *building block*; presenta una buona stabilità rispetto ad agenti chimici ed alla luce, è relativamente insensibile alla polarità e al pH dell'ambiente in cui si trova, ha piccole dimensioni molecolari, detiene una brillante fluorescenza dovuta ad alte $\epsilon(\lambda)$ e Φ e profili di eccitazione ed emissione nella regione del visibile, oltre che permettere, grazie a piccole modificazioni spesso relativamente semplici, una grande varietà di variazioni alle sue caratteristiche di fluorescenza^{1,2}.

3.2.4 Modifica della struttura del *Bodipy*

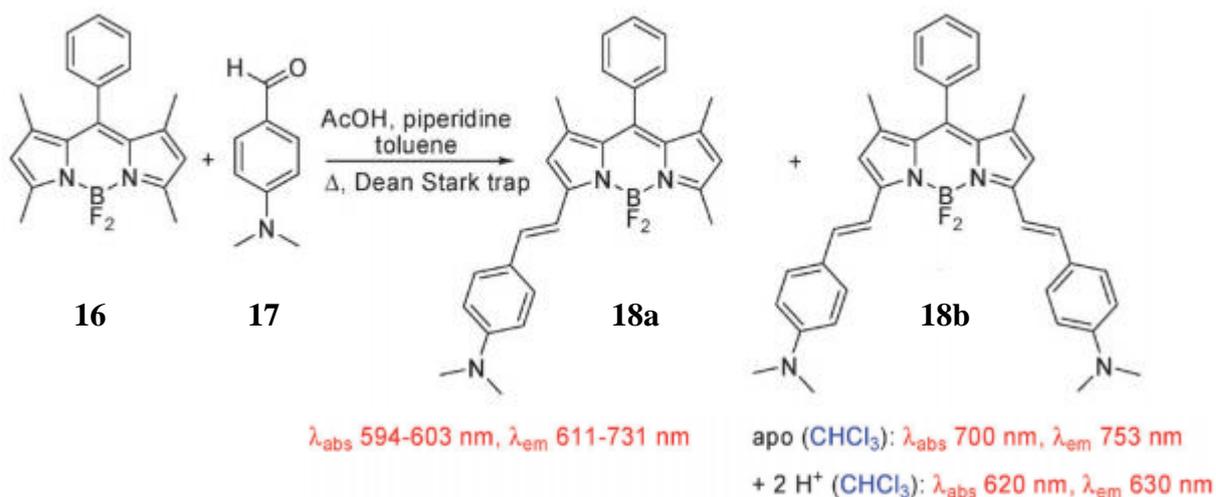
Il *Bodipy* si presenta sufficientemente stabile per poter subire tutta una serie di processi atti a modificarne la struttura *base*. Io esaminerò quelli su cui ci siamo soffermati di più. Nello *schema 7* è riportato un rapido prospetto di quali sono le posizioni, i sostituenti e le reazioni che può subire il *Bodipy*.

Introduzione



Schema 7: schema riassuntivo delle eventuali modificazioni al Bodipy

Come altri sistemi eteroaromatici elettron-poveri, i gruppi 3,5-metilenici sono relativamente acidi. Questa caratteristica permette al *Bodipy* di poter effettuare, in presenza di aldeidi aromatiche, una reazione di *Knoevenagel* (**schema 8**)¹. Solitamente la reazione ha luogo in catalisi basica oppure in una soluzione tampone, e la rimozione d'acqua dalla miscela può essere ottenuta tramite l'utilizzo di Dean-Stark oppure tramite l'uso di setacci molecolari. Nonostante la facilità di questo tipo di reazione abbia provveduto ad una sua applicazione sempre più ampia nel campo, le rese spesso sono basse o addirittura non riportate in letteratura; inoltre si è ravvisato che un grande numero di aldeidi particolarmente elettron-povere non reagisce in quelle condizioni¹.

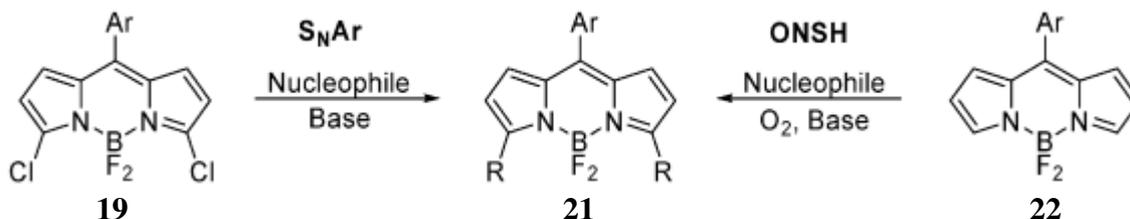


Schema 8: Condensazione del 3,5-dimetil-BODIPY con aldeidi aromatiche; la reazione può produrre sia il mono che il distirilato fluoroforo¹

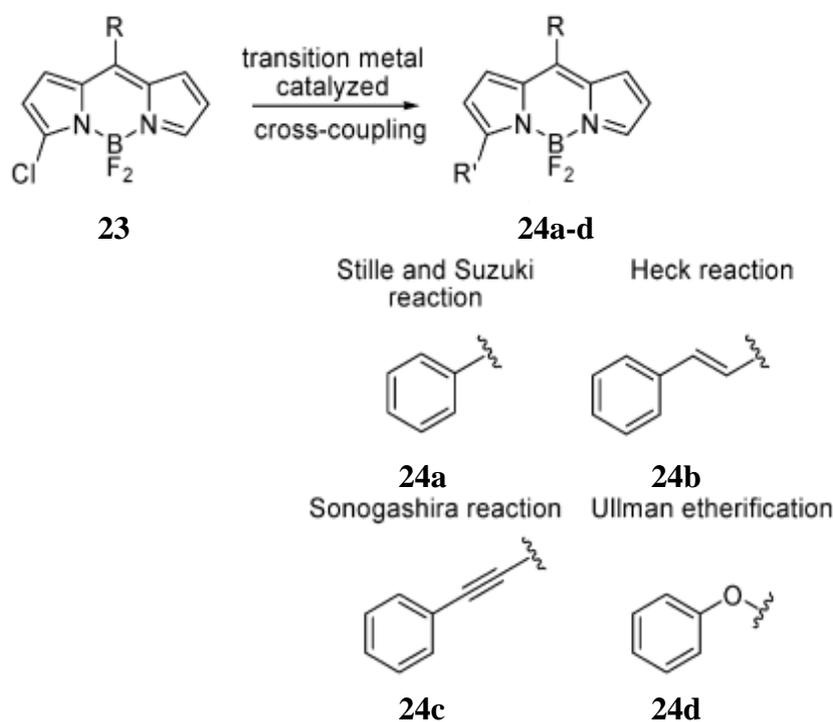
Introduzione

L'effetto di sostituenti elettron-donatori sull'aldeide aromatica (**17**) sposta le lunghezze d'onda sia d'assorbimento che di emissione verso il rosso o, addirittura, il NIR, in un chiaro effetto *redshift* (confrontare i valori di **18a** con **18b**)¹.

La deficienza elettronica delle posizioni 3,5 rende i sostituenti alogenurici nelle suddette i bersagli ideali per una Sostituzione Nucleofila Aromatica (S_NAr) (*schema 9*), o per un cross-coupling Palladio-catalizzata come nello *schema 10*¹.



Schema 9: Sostituzione Nucleofila Aromatica (S_NAr) e Sostituzione Ossidativa Nucleofila nelle posizioni 3,5 del BODIPY¹



Schema 10: Funzionalizzazione del BODIPY-3-alogenato attraverso una catalisi mediante metallo di transizione. Il gruppo R' è eliminato per le varie tipologie di reazioni

Introduzione

3.2.5 Nuovi usi del Bodipy

Finora abbiamo visto la classe di composti *Bodipy* come sonde fluorescenti per imaging. Ma ultimamente questa classe di composti sta vedendo nuovi orizzonti di utilizzo. Uno dei più promettenti ed ancora in fase embrionale, è il loro uso nella terapia fotodinamica (PDT, PhotoDynamic Therapy), ovvero come *photosensitizers*⁷.

Per la PDT è necessario avere un farmaco fotosensibilizzante, luce e ossigeno. Quando reazioni fotochimiche generano uno stato di singoletto dell'ossigeno, partendo da $^3\text{O}_2$, allora ciò provoca danni ai tessuti dove queste tre condizioni si trovano a concorrere. Questo effetto è altamente localizzato visto il tempo di emivita dello stato di singoletto dell'ossigeno ($0.6 \cdot 10^{-6}$ s) ed è aumentato sia dalla maggiore selettività del *photosensitizer* verso le cellule morte rispetto a quelle vive sia dalla focalizzazione della luce nella regione da trattare⁷.

Le caratteristiche che l'eventuale *photosensitizer* dovrebbe avere sono⁷:

- Bassa tossicità in assenza di luce;
- Profili di effetti collaterali bassi (ad es. dolore dopo l'irraggiamento, fotosensibilità della pelle);
- Appropriato bilanciamento tra comportamento idrofobo/idrofilo, per un corretto accumulo nel tessuto cancerogeno;
- Coefficienti di estinzione elevati, soprattutto ad elevate lunghezze d'onda per una penetrazione profonda della luce;
- Resa quantica bassa per *photobleaching*;
- Un'alta efficienza nel *singlet-to-triplet intersystem crossing*;

la seguente **tabella 1** presenta un piccolo riassunto dei più recenti *photosensitizers*, assieme alle loro principali caratteristiche chimico-fisiche:

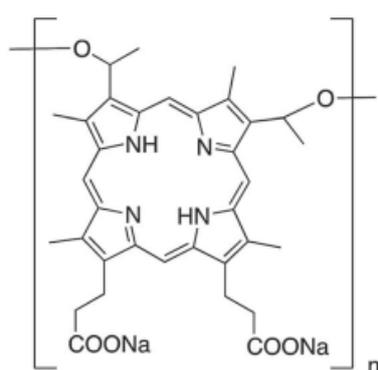
Introduzione

Photosensitizer	$\lambda_{\max \text{ abs}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\max \text{ emiss}}$ (nm)	Φ_{FI}	Φ_{PB}	Φ_{Δ}	Log P_{ofw}
Porfimer sodium (Photofrin [®])	630 ¹³	3000 ¹³	NA	NA	5.4×10^{-5} (PB) ¹⁴	0.25 (PB + 1% TX100; 630 nm; oxygen depletion with FFA) ¹⁵	3.96 (calc.) ¹⁶
Protoporphyrin IX (Levulan [®])	635 ¹³	5000 ¹³	630 (ex 397 nm; PBS) ¹⁷	0.011 (ex 397 nm; PBS) ¹⁷	NA	0.54 (PB + 1% TX100; 630 nm; lysozyme inactivation; RB at 0.75) ¹⁸	NA
Temoporfin (Foscan [®])	650 (EtOH) ¹⁹ 652 (H ₂ O) ¹⁹	39 000 (EtOH) ¹⁹ 23 000 (H ₂ O) ¹⁹	655 (PBS) ²⁰	NA	1.54×10^{-5} (PBS + 10% FCS) ²¹	0.31 (PBS + 10% FCS; >610 nm; DPBF; hypericin at 0.36) ²¹	9.24 ²²
Verteporfin (Visudyne [®])	688 (PBS + 2% TX100) ²³ 692 (PBS) ²³	31 200 (PBS + 2% TX100) ²³ 13 500 (PBS) ²³	694 (PBS + 2% TX100) ²³ 695 (PBS) ²³	0.049 (PBS + 2% TX100) ²³ 0.002 (PBS) ²³	5.35×10^{-5} (PBS + 2% TX100) ²³ 2.80×10^{-5} (PBS) ²³	0.82 (PB + 1% TX100; 692 nm; lysozyme inactivation; MB at 0.52) ¹⁸	7.76 (calc.) ²⁴
Talaporfin (Laserphyrin [®])	654 (PBS) ²⁵	40 000 (PBS) ²⁵	660 (PBS) ²⁵	NA	8.2×10^{-4} (PBS) ²⁵	0.77 (D ₂ O, oxygen depletion with FFA) ²⁵	-1.92 ²⁶
Ce6 (Photolon [®])	663 (PBS) ²⁷	38 000 (PBS) ²⁷	662 (PBS) ²⁷	0.18 (PBS) ²⁷	NA	0.75 (PB; 660 nm; lysozyme inactivation; MB at 0.52) ¹⁸	0.78 ²⁷

tabella 1: photosensitizer più recenti con principali proprietà chimico-fisiche⁷

La classe di composti *Bodipy* presenta molte caratteristiche interessanti per il loro utilizzo come *photosensitizer*, come coefficienti di estinzione molto elevati, insensibilità all'ambiente, resistenza al *photobleaching* e un rapporto di tossicità luce/buio molto elevato. Ovviamente le sue rese quantiche elevate rientrano nelle caratteristiche indesiderate, ma data la sua resistenza, il *Bodipy* può essere modificato per ridurre la fluorescenza e potenziare il singlet-to-triplet intersystem crossing⁷.

In genere questo risultato è raggiunto mediante alogenazione del *Bodipy* per effetto dell'accoppiamento spin-orbita dovuta all'atomo pesante⁷. Di seguito, nella **figura 7**, sono raffigurati vari *photosensitizers*, sia "classici" sia gli eventuali *Bodipy*-costituiti.



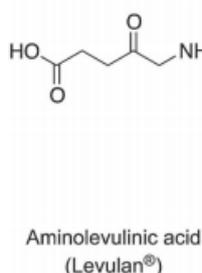
Hematoporphyrin (Photofrin[®]) n=1-9

PB

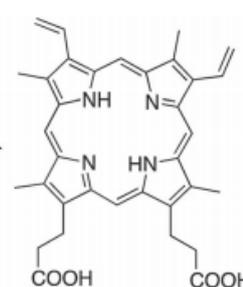
$\lambda_{\max \text{ abs}}$ 630 nm
 ϵ 1170 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

¹O₂ 0.28 (methylene blue, lysozyme inactivation)
indication: esophagus, lung and bladder cancer

25



Aminolevulinic acid (Levulan[®])



Protoporphyrin IX (PB)

$\lambda_{\max \text{ abs}}$ 635 nm
 ϵ 5000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

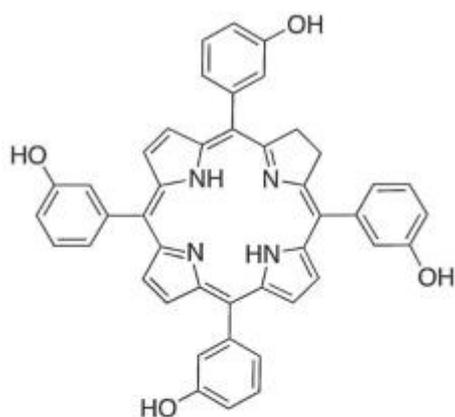
¹O₂ 0.54 (methylene blue, lysozyme inactivation)

indication: non melanoma skin cancer

27

26

Introduzione



Temoporfin (Foscan®)

EtOH

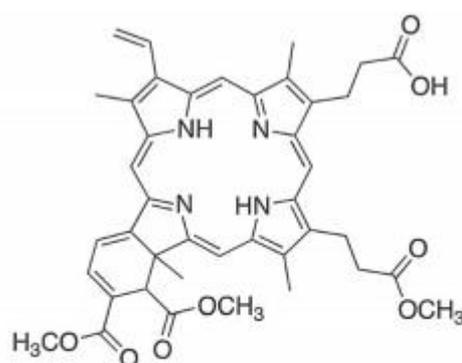
$\lambda_{\text{max abs}}$ 650 nm

ϵ 39000 M⁻¹cm⁻¹

¹O₂ 0.30 (hypericin, DPPH)

indication: head and neck cancer

28



Verteporfin (Visudyne®)

PBS/Tx100

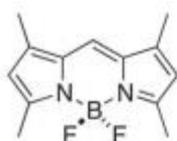
$\lambda_{\text{max abs}}$ 689 nm

ϵ 31200 M⁻¹cm⁻¹

¹O₂ 0.79 (methylene blue, lysozyme inactivation)

indication: age-related macular degeneration

29



MeOH, Φ = 0.7

$\lambda_{\text{max abs}}$ 502 nm

ϵ 120000 M⁻¹cm⁻¹

$\lambda_{\text{max emiss}}$ 508 nm

¹O₂ generation rel. rate 0.48

(methylene blue)

IC₅₀ (HL-60 cells)

>100 (0 J cm⁻²),

4.4 ± 0.4 μM (4.1 J cm⁻²)

IC₅₀ (HSC-2 cells)

>100 (0 J cm⁻²),

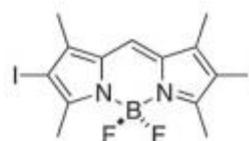
8.7 ± 2.0 μM (4.1 J cm⁻²)

IC₅₀ (HK1 cell)

76.8 ± 10.6 μM (0 J cm⁻²),

6.2 ± 1.2 μM (4.1 J cm⁻²)

30



MeOH, Φ = 0.02

$\lambda_{\text{max abs}}$ 534 nm

ϵ 110000 M⁻¹cm⁻¹

$\lambda_{\text{max emiss}}$ 548 nm

¹O₂ generation rel. rate 23.9

(methylene blue)

IC₅₀ (HL-60 cells)

>100 (0 J cm⁻²),

62 ± 11 nM (4.1 J cm⁻²)

IC₅₀ (HSC-2 cells)

>100 (0 J cm⁻²),

0.64 ± 0.06 μM (4.1 J cm⁻²)

IC₅₀ (HK1 cell)

>100 (0 J cm⁻²),

0.57 ± 0.06 μM (4.1 J cm⁻²)

31

Introduzione

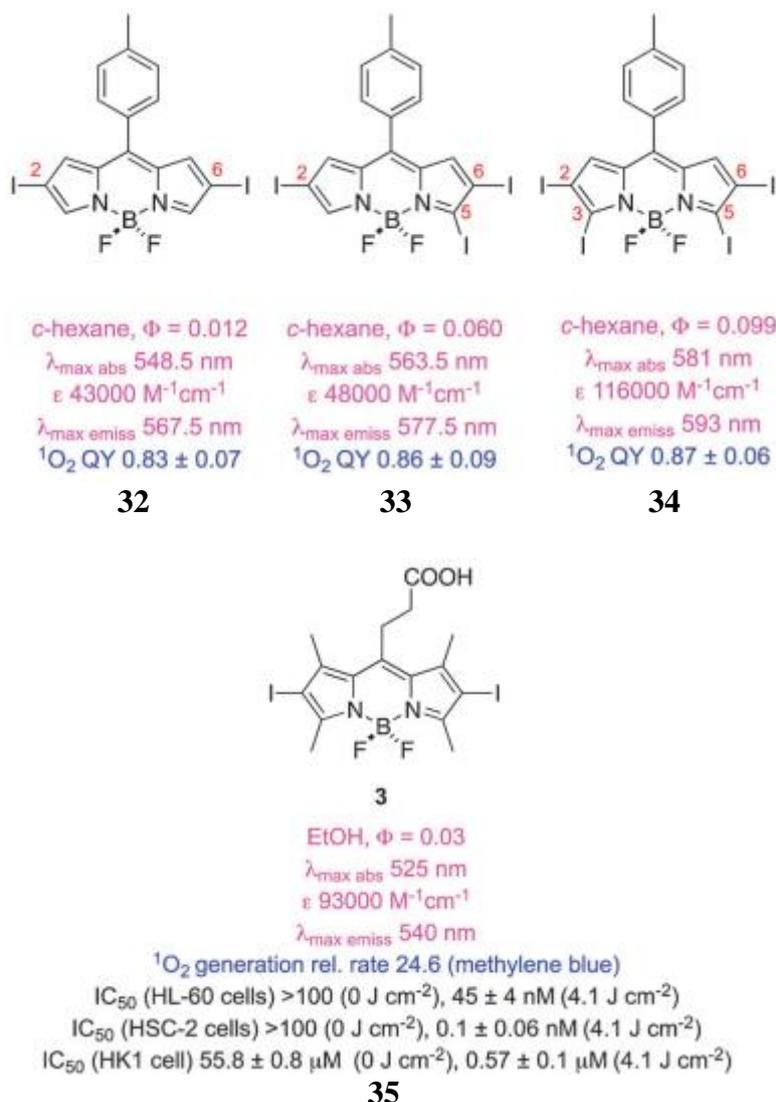


figura 7: Vari photosensitizers, sia quelli più recenti, sia gli eventuali derivati dal Bodipy⁷

3.3 Nanotubi di Carbonio e Drug Delivery

3.3.1 Caratteristiche e tipologie

Fin dalla loro scoperta da parte del giapponese Sumio Ijima nel 1991, i nanotubi di carbonio hanno focalizzato su di loro l'attenzione generale. Questo grazie alle loro proprietà sia chimiche che fisiche, in campo meccanico, termico ed elettronico. Particolari sono le proprietà meccaniche, con moduli di Young nel range di 100-1000 GPa e forze dell'ordine di 2.5-3.5 GPa⁸. I nanotubi hanno diametri che vanno da 0.1 a 100 nm e lunghezze fino ad 1-2 mm, mentre la loro densità può arrivare a circa 1.3 g/cm³⁸. La struttura base è costituita da anelli benzenici condensati, arrotolati a formare, ovviamente, un cilindro (aperto o chiuso che sia)⁹. In base al numero di stratificazioni di cui è costituito il

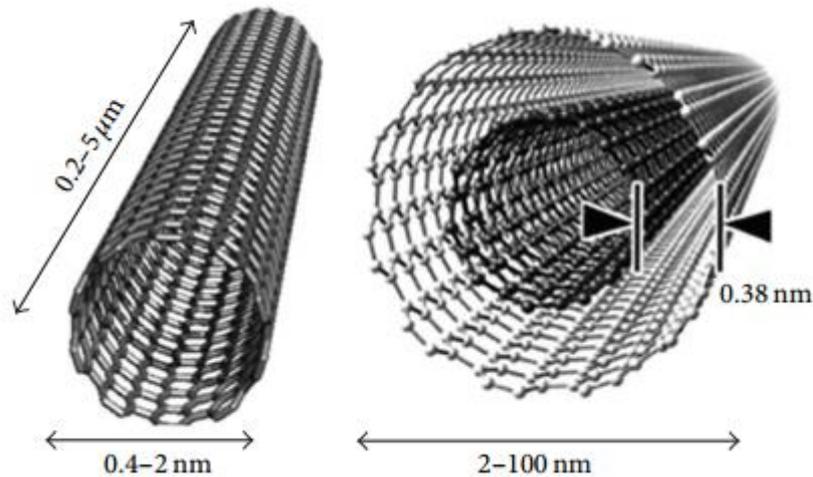
Introduzione

nanotubo, essi si dividono in due grandi famiglie: SWCNT (Single Walled Carbon NanoTubes) e MWCNT (Multi Walled Carbon NanoTubes).

I SWCNT, sono costituiti da un singolo foglio di grafene arrotolato per formare un cilindro di diametro tra i 0.4 e i 2 nm⁹.

I MWCNT consistono in due o più cilindri coassiali, ognuno costituito da un singolo foglio di grafite. Il diametro esterno va da 2 a 100 nm. Di seguito viene riportato uno schema (*figura 8*) insieme ad una tabella con le principali differenze tra le due famiglie di nanotubi (*tabella 2*)⁹.

figura 8: SWCNT (sinistra) e MWCNT (destra)



Differences between SWNT and MWNT	
SWNT Single layer graphene	MWNT Multiple grapheme layer
Catalyst is required for synthesis	Can be produced without catalyst
Bulk synthesis is difficult as it requires proper control over growth and atmospheric conditions.	Bulk synthesis is easy
Purity is poor	Purity is high
A chance of defect is more during fuictionalization	A chance of defect is less but once occurred it is difficult to improve
Less accumulation in body	More accumulation in the body
Characterization and evaluation is easy	It has very complex structure
It can be easily twisted & are more liable	It cannot be easily twisted

*tabella 2: tabella con le principali differenze tra SWCNT e MWCNT*⁸

I metodi di preparazione sono principalmente tre:

- Metodo a Scarica ad Arco;
- Metodo tramite Ablazione Laser;
- Metodo CVD (Deposizione Chimica di Vapori);

Introduzione

Inoltre la configurazione della struttura del nanotubo conferisce particolari proprietà elettriche, come si può osservare tramite la *figura 9*:

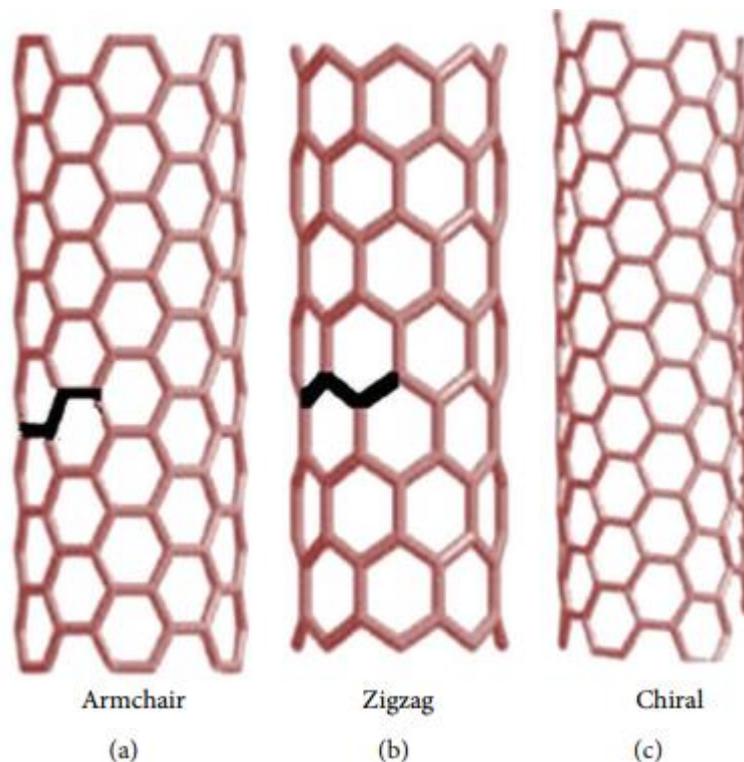


figura 9: Configurazioni varie della struttura del nanotubo di carbonio: Armchair, Zigzag e Chiral. Differiscono per l'angolo chirale e per il diametro: nanotubi con configurazione armchair (a) hanno proprietà elettriche simili ai metalli; i nanotubi con configurazione a Zigzag (b) o Chiral (c) hanno, invece, proprietà elettriche simili a quelle dei semiconduttori

3.3.2 Impiego in drug delivery

Lo studio per l'impiego di nanomateriali nelle problematiche relative al trasporto di farmaci è cresciuto costantemente a partire dall'inizio del 21° secolo, in particolar modo l'utilizzo di strutture di nanotubi di carbonio⁹. Nella seguente *tabella 3*, sono riportati i principali nanomateriali utilizzati ad oggi nei processi di drug delivery¹⁰:

Introduzione

Table 1. Types of nanocarriers for drug delivery				
System	Structure	Characteristics	Examples of compounds	Ref.
Polymeric nanoparticles (polymer-drug conjugates)	Drugs are conjugated to the side chain of a linear polymer with a linker (cleavable bond)	(a) Water-soluble, nontoxic, biodegradable (b) Surface modification (pegylation) (c) Selective accumulation and retention in tumor tissue (EPR effect) (d) Specific targeting of cancer cells while sparing normal cells—receptor-mediated targeting with a ligand	Albumin-Taxol (Abraxane) PGA-Taxol (Xyotax) PGA-Camptothecin (CT-2106) HPMA-DOX (PK1) HPMA-DOX-galactosamine (PK2)	(7) (11) (12) (14) (58)
Polymeric micelles	Amphiphilic block copolymers assemble and form a micelle with a hydrophobic core and hydrophilic shell	(a) Suitable carrier for water-insoluble drug (b) Biocompatible, self-assembling, biodegradable (c) Ease of functional modification (d) Targeting potential	PEG-pluronic-DOX PEG-PAA-DOX (NK911) PEG-PLA-Taxol (Genexol-PM)	(16) (17) (18)
Dendrimers	Radially emerging hyperbranched synthetic polymer with regular pattern and repeated units	(a) Biodistribution and PK can be tuned (b) High structural and chemical homogeneity (c) Ease of functionalization, high ligand density (d) Controlled degradation (e) Multifunctionality	PAMAM-MTX PAMAM-platinate	(64) (21)
Liposomes	Self-assembling closed colloidal structures composed of lipid bilayers	(a) Amphiphilic, biocompatible (b) Ease of modification (c) Targeting potential	Pegylated liposomal DOX (Doxil) Non-pegylated liposomal DOX (Myocet) Liposomal daunorubicin (DaunoXome)	(22) (23) (24)
Viral nanoparticles	Protein cages, which are multivalent, self-assembled structures	(a) Surface modification by mutagenesis or bioconjugation—multivalency (b) Specific tumor targeting, multifunctionality (c) Defined geometry and remarkable uniformity (d) Biological compatibility and inert nature	HSP-DOX CPMV-DOX	(29, 30) (27)
Carbon nanotubes	Carbon cylinders composed of benzene ring	(a) Water-soluble and biocompatible through chemical modification (organic functionalization) (b) Multifunctionality	CNT-MTX CNT-amphotericin B	(34) (33)

Abbreviations: PGA, poly-(L-glutamate); HPMA, *N*-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide copolymer; PEG, polyethylene glycol; PAA, poly-(L-aspartate); PLA, poly-(L-lactide); PAMAM, poly(amidoamine); DOX, doxorubicin; MTX, methotrexate; PK, pharmacokinetics; EPR, enhanced permeability and retention; CNT, carbon nanotube; HSP, heat shock protein; CPMV, cowpea mosaic virus.

tabella 3: principali nanomateriali utilizzati ad oggi per il trasporto di farmaci e loro principali caratteristiche¹⁰

Nonostante i grandi passi avanti fatti nelle terapie oncologiche, rimangono tutt'oggi dei seri inconvenienti; uno dei problemi non ancora risolti è sicuramente quello riguardante la scarsa selettività verso i tessuti carcinosi che comporta dei severi effetti collaterali dannosi per i pazienti in cura. Un altro grande problema riguardante le terapie chemioterapiche, è, indubbiamente, la *multi-drug resistance* (MDR)^{11,12}. Ad oggi, i meccanismi associati alla MDR nel tumore sono stati ampiamente esplorati¹². Uno dei principali meccanismi legati alla MDR è l'aumento di efflusso del

Introduzione

farmaco antitumorale all'esterno della cellula, una volta che questo è stato internalizzato; questo è dovuto dalla sovraespressione della *P-glicoproteina* (*P-gp*) nelle cellule, che comporta, naturalmente, l'impossibilità del farmaco di compiere la sua azione citotossica^{11,12}. Le nanotecnologie possono aiutare a superare queste limitazioni tramite un targeting specifico delle cellule tumorali, sia tramite azioni non-specifiche, passive, sia tramite azioni specifiche come interazioni ligando-recettore¹¹. La metodologia passiva sfrutta l'effetto chiamato *EPR* (*figura 10*), *enhanced permeability and retention*, ovvero l'aumento della permeabilità e della ritenzione per le cellule tumorali¹¹. I tessuti tumorali sono, generalmente, caratterizzati da processi di angiogenesi molto rapidi ed improvvisi, che producono vasi sanguigni con strutture non più compatte tra loro e con larghe "finestre" a causa dell'estesa disorganizzazione del tessuto endoteliale¹¹. In più lo strato di tessuto muscolare liscio è spesso assente o anormale, ne consegue una passiva dilatazione del vaso stesso¹¹. La conseguenza è un aumento dell'*extravasazione* (migrazione di una qualunque particella al di fuori del torrente circolatorio) di macromolecole nel tessuto tumorale, in contrasto con molecole dal basso peso molecolare che sottostanno ad un rapido smaltimento per via renale¹¹. Inoltre, una pressione venosa minore accompagnata da un povero drenaggio linfatico, possono portare alla ritenzione delle macromolecole accumulate nel tessuto tumorale¹¹. Per questi motivi, il trasporto di farmaci usando nanomateriali risulterebbe più efficace rispetto all'utilizzo del farmaco libero. Questo effetto risulterebbe ulteriormente potenziato dall'utilizzo di determinati ligandi (come ad esempio, anticorpi), attaccati ai nanomateriali, in grado di riconoscere specifici marker tumorali. Inoltre il trasporto del farmaco attraverso nanovettori potrebbe includere nuove vie sia metaboliche che cellulari in grado di eludere la MDR¹¹. Da questo punto di vista i nanotubi di carbonio hanno dimostrato un'eccellente performance, in quanto in grado di attraversare le barriere biologiche molto facilmente; in particolare anche se il meccanismo di internalizzazione non è ancora stato perfettamente elucidato, è ormai riconosciuto generalmente che i nanotubi di carbonio sono in grado di attraversare la membrana cellulare di qualsiasi tipo di cellula indipendentemente dalla funzionalizzazione superficiale della cellula stessa¹¹.

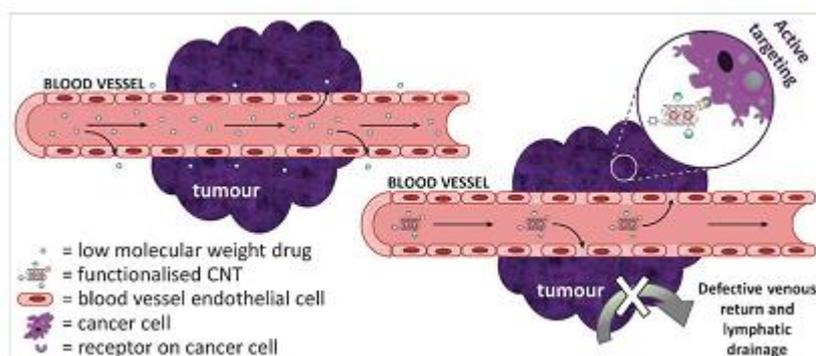


figura 10: rappresentazione schematica dell'effetto MDR

Introduzione

Ovviamente non è proprio tutto rosa e fiori il mondo dei nanomateriali e, in particolare, dei nanotubi di carbonio; infatti nonostante l'entusiasmo iniziale e le effettive potenzialità ad essi annesse, molti si sono interrogati sulla biocompatibilità del nanotubo stesso, in virtù proprio delle sue caratteristiche¹³. In definitiva uno degli scopi che la ricerca medica e chimica si è posta è stato, precisamente, rendere i nanotubi non tossici e biocompatibili¹³. Recenti studi hanno dimostrato che la funzionalizzazione della superficie del nanotubo, oltre a renderlo più disponibile in ambiente fisiologico, lo rende anche meno tossico ma soprattutto più biocompatibile e, quindi, più degradabile dagli enzimi ossidativi¹³. Nella **tabella 4** qui presente si cerca di fare un elenco compatto della relazione che intercorre tra la funzionalizzazione della superficie del nanotubo e la sua degradabilità agli enzimi ossidativi¹³:

Material ^a	Functionalisation	Biological oxidative environment ^b	Degradation	Ref.
SWCNT/ MWCNT	Pristine (no functional groups)	HRP/PSF	No	37–39
SWCNT	COOH	HRP/MPO	Yes	34, 37, 38
SWCNT	COOH/Taurine	MPO	No	43
SWCNT	COOH/Phosphatidyl serine	MPO	Yes	43
SWCNT	COOH/Phosphatidyl choline	MPO	No	43
SWCNT	COOH	PSF	Yes	39
SWCNT/ MWCNT	Aryl-sulfonation	PSF	No	39
SWCNT/ MWCNT	COOH	HRP/PSF	Yes	40
MWCNT	COOH	HRP	Yes	41
MWCNT	N-doped	HRP	Yes	41
MWCNT	CONH- (CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ -NH ₃ ⁺	HRP/PSF/MPO	Yes	— ^c
MWCNT	COOH + 1,3-dipolar cycloaddition	HRP/PSF	Yes	— ^c

^a SWCNT: single-walled carbon nanotubes; MWCNT: multi-walled carbon nanotubes.

^b HRP: horseradish peroxidase; PSF: phagolysosomal simulating fluid; MPO: myeloperoxidase.

^c Bianco, Kostarelos and Prato, *unpublished results*.

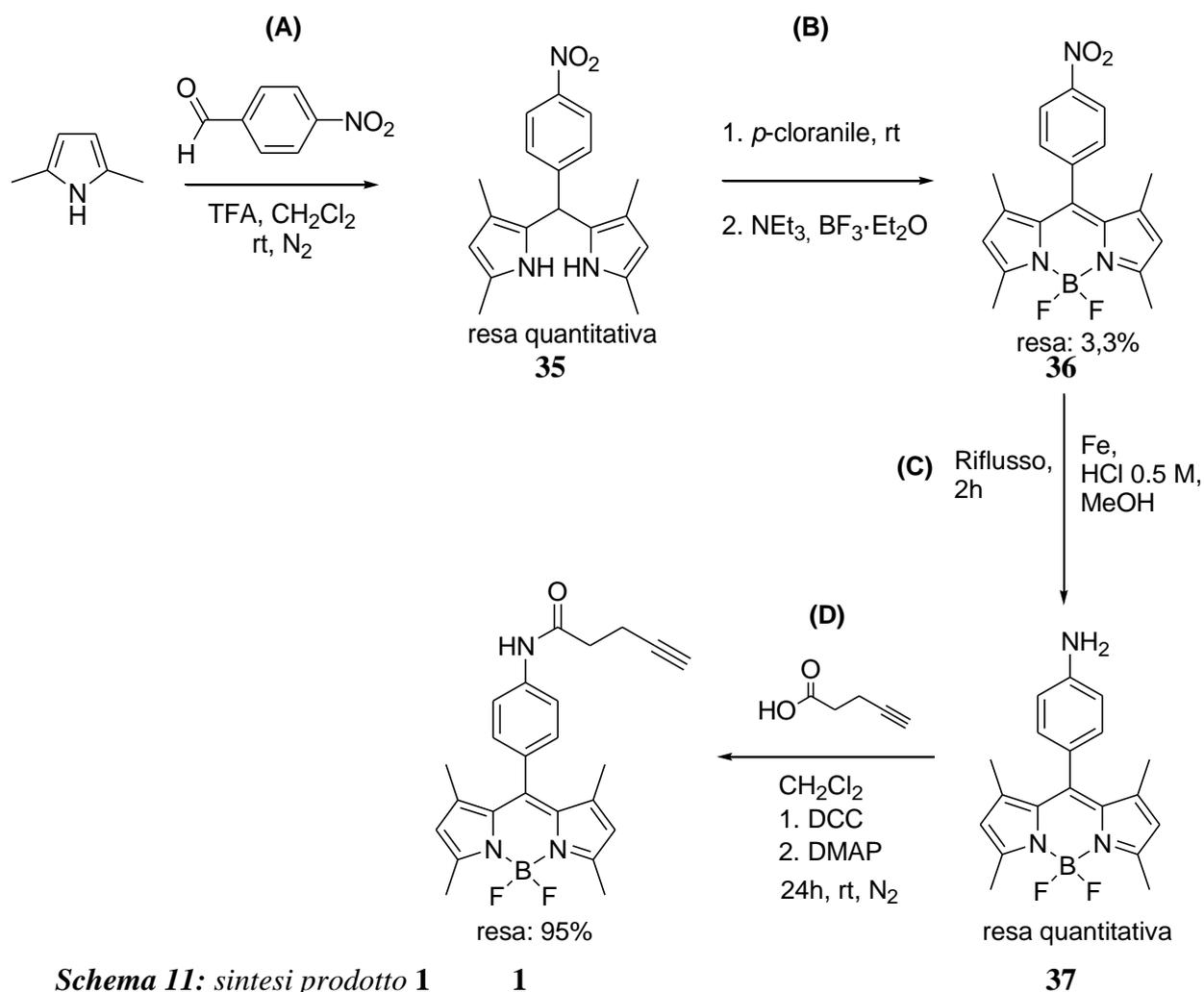
tabella 4: Effetto della funzionalizzazione superficiale del nanotubo nei confronti della degradazione ossidativa dello stesso¹³

4 Descrizione del lavoro

4.1 Sintesi del Bodipy Core

Nella prima parte del lavoro ci siamo concentrati sulla sintesi del Bodipy Core (**1**) come scheletro per le successive sonde fluorescenti.

Abbiamo seguito una procedura riportata in letteratura¹⁴, che prevede l'utilizzo come reagenti di partenza, del *p*-nitrobenzaldeide e del 2,4-dimetilpirrolo. Questa sintesi segue i principi generali espressi nella sintesi del Bodipy a partire da pirroli ed aldeidi¹. Lo step fondamentale di sintesi è l'inserimento, all'interno della struttura della molecola, del gruppo funzionale alchino-terminale (R-C≡C-H), così da rendere il Bodipy Core (**2**) e i suoi derivati, un perfetto *building block* per successive reazioni di *click chemistry*. Di seguito è riportato lo schema complessivo della sintesi (*schema 11*):



Schema 11: sintesi prodotto 1 **1**

Descrizione del lavoro

Si può notare che lo step estremamente limitante sulla resa complessiva della reazione è lo step **B**. Questo è dovuto probabilmente al *work up* della reazione, che prevede, per eliminare i sali di TEA, molteplici lavaggi con Na_2CO_3 saturo e con BRINE della fase organica. Ogni lavaggio vede la formazione di un'emulsione che complica notevolmente il riconoscimento distinto delle due fasi e ne compromette, quindi, il recupero. A causa di questa difficoltà, il *work up* della reazione risulta essere molto lungo, in quanto prevede, per migliorarne la riuscita, che ci siano delle lunghe pause tra un lavaggio e l'altro per permettere all'emulsione di rompersi e lasciar depositare sul fondo la fase organica (che essendo in DCM risulta più pesante dell'acqua). Negli spettri di controllo si può notare l'evolvere della reazione, grazie alla variazione di segnali significativi (*figura 11, 12, 13, 14*).

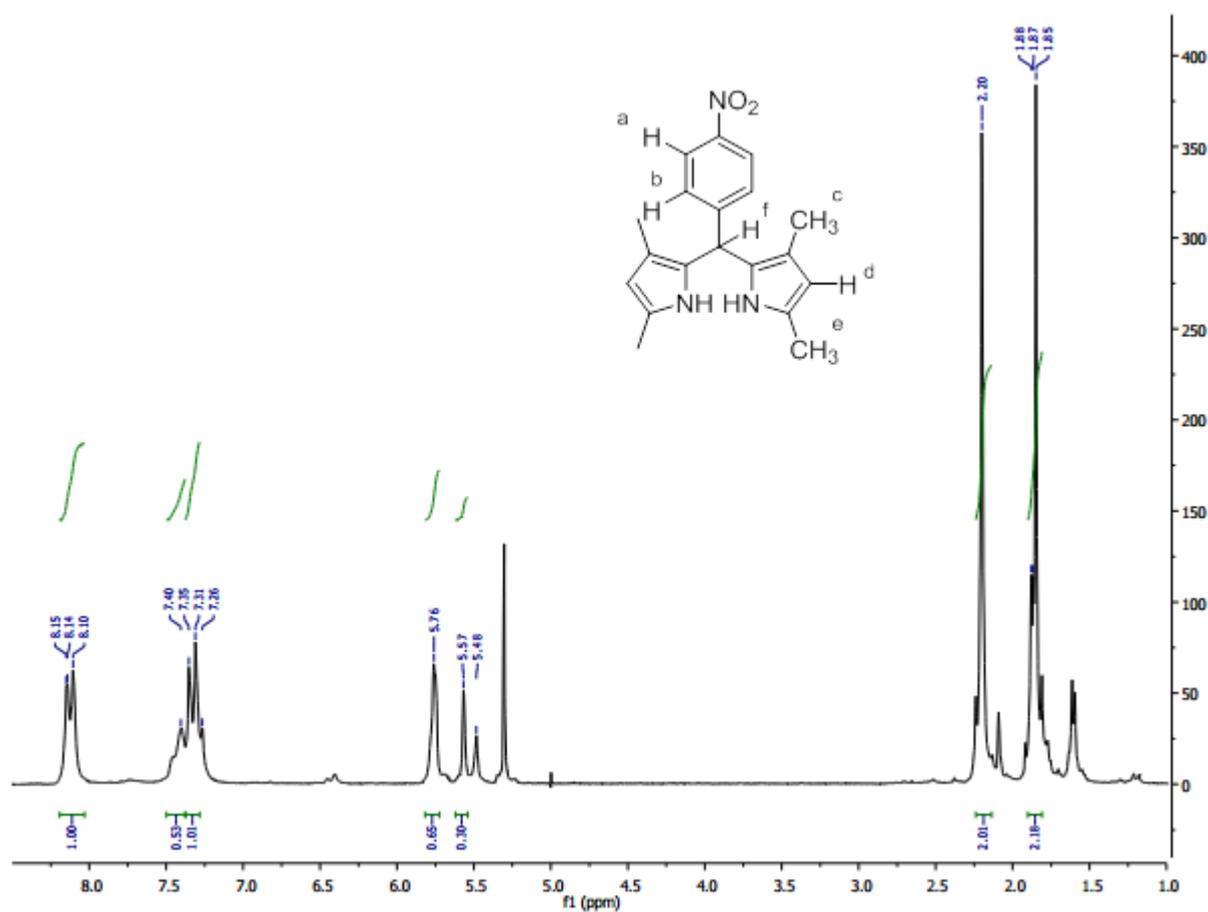


figura 11: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto 35

I segnali caratteristici di cui vogliamo tenere conto sono i segnali appartenenti agli idrogeni H_f e H_d (*figura 11, 12*);

Descrizione del lavoro

FL002_13-6-14
FL002_13-6-14

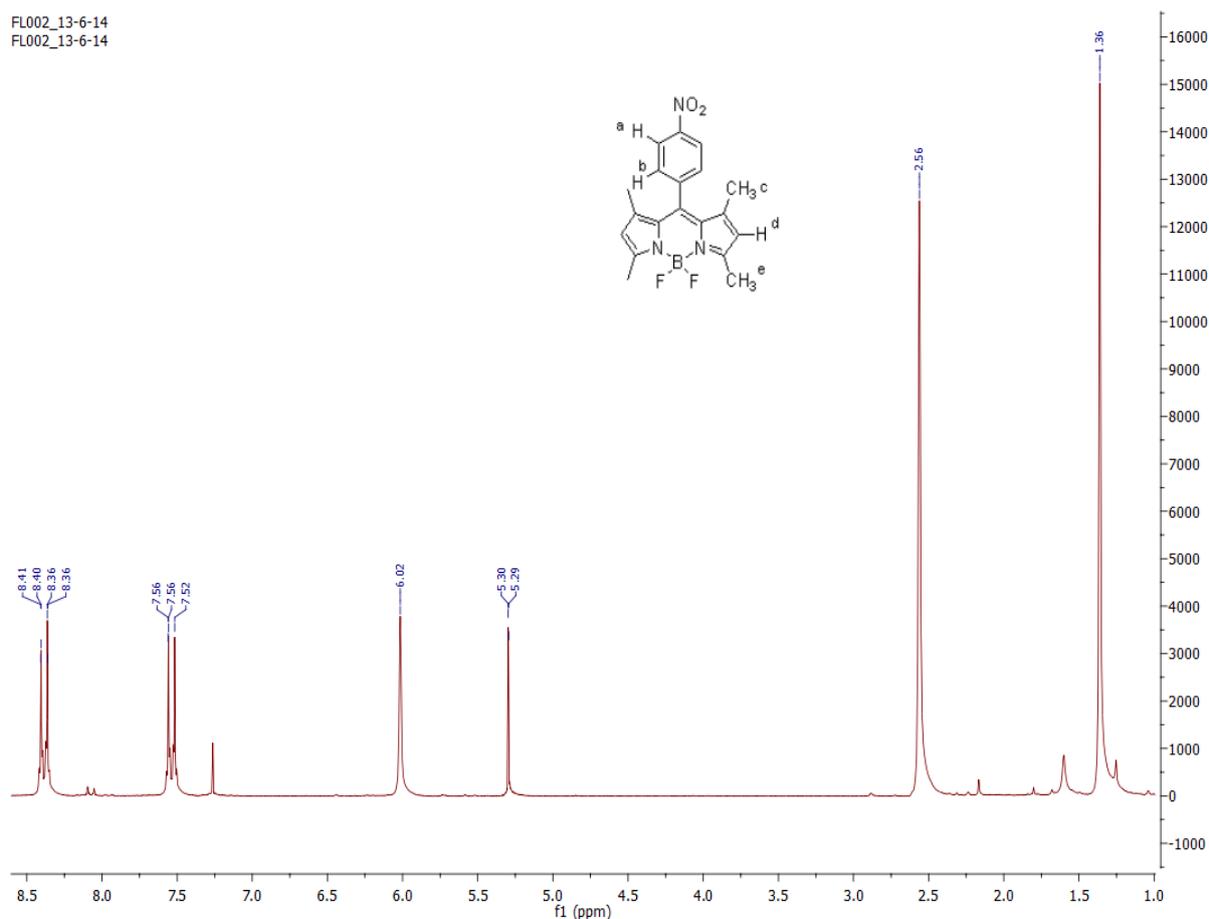


figura 12: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **36**

- si può subito notare la scomparsa del segnale di singoletto, a 5.57 ppm, appartenente all'idrogeno in posizione *meso* (H_f);
- si nota anche lo shift di segnale a frequenze maggiori, del segnale appartenente agli idrogeni pirrolici (H_d), da 5.76 ppm a 6.02 ppm, per effetto dell'aumento della coniugazione dovuto al processo di ossidazione avvenuto nel passaggio di sintesi **B**;

Negli step **C** e **D**, invece i segnali caratteristici da tenere in evidenza principalmente sono invece quelli appartenenti agli idrogeni del sistema benzenico, ovvero gli idrogeni H_a e H_b , costituenti un sistema di tipo **AA'-BB'** (**figura 13, 14**)

Descrizione del lavoro

FL003_17-6-14
FL003_17-6-14

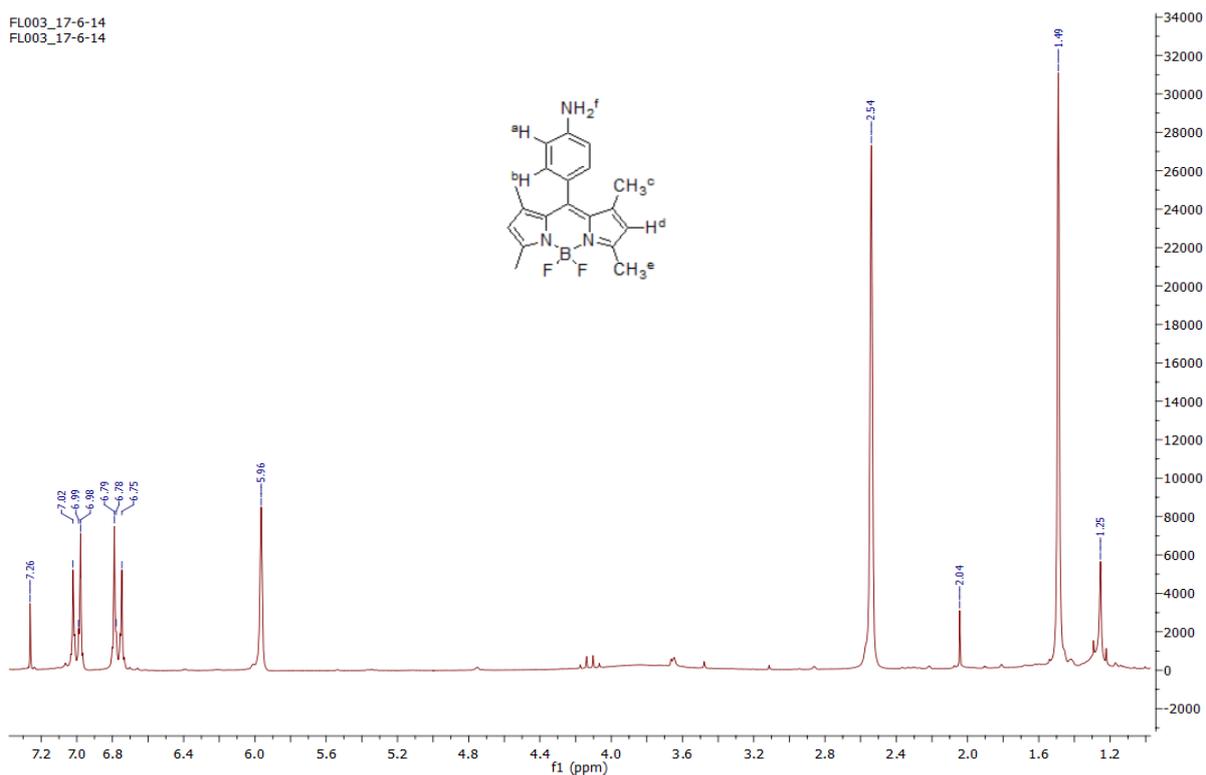


figura 13: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto 37

FL011_Bodipy-alchino_CDCl3_200MHz_30-7-14
FL011_Bodipy-alchino_CDCl3_200MHz_30-7-14

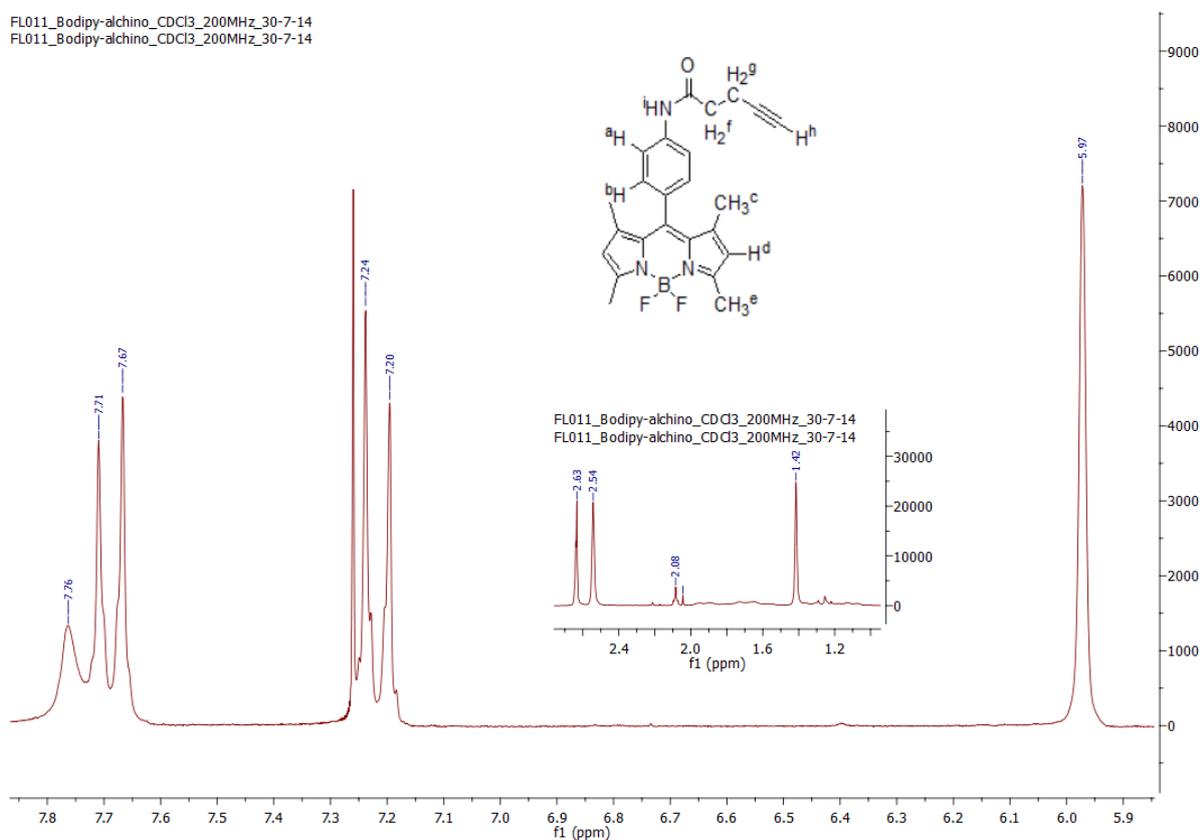


figura 14: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto 1

Descrizione del lavoro

- La sostituzione del gruppo nitro (NO₂) con il gruppo ammino (NH₂), determina uno shift importante degli idrogeni benzenici (sistema **AA'**-**BB'**); questo in virtù dell'effetto mesomero del gruppo ammino rispetto a quello del gruppo nitro. Per cui abbiamo uno shift generale a frequenze più basse ~7.00 e ~6.78 ppm (protoni più schermati) per gli idrogeni H_a e H_b;
- In particolare passando dal gruppo NO₂ al gruppo NH₂, si ha un inversione del segnale degli idrogeni del sistema **AA'**-**BB'**, in quanto per il prodotto **36** il segnale degli idrogeni H_b risulta a frequenze maggiori rispetto a quello degli idrogeni H_a; mentre per il prodotto **37** risulta esattamente il contrario (per effetto *meso* dei sostituenti), oltre allo shift generale a frequenze minori;
- Per quanto riguarda il prodotto **1** e il passaggio di sintesi **C**, si nota nuovamente l'inversione dei segnali degli idrogeni H_a e H_b, unitamente con un incremento dello shift verso frequenze maggiori, in virtù della trasformazione di un gruppo ammino (-NH₂) in uno ammidico (-RONH) aventi un effetto mesomero diverso; lo shift vede l'innalzamento delle frequenze verso i 7.70 e 7.22 ppm (protoni più deschermati).
- Fondamentale è, ovviamente, la comparsa del segnale del protone del gruppo alchino-terminale (H_h), un singoletto a 2.08 ppm;
- Inoltre compare anche il segnale appartenente ai quattro idrogeni della catena alchino-alchilica (H_f e H_g), a 2.63 ppm; risulta strano, però, che entrambi i gruppi di idrogeni diano il medesimo segnale, risultante in un segnale di singoletto integrante 4 idrogeni;

Nella **figura 15** possiamo vedere lo spettro IR:

- Segnale caratteristico dello stretching C=O (banda I dell'ammide) a 1697 cm⁻¹, mentre non è ravvisabile la banda II dell'ammide; segnale a 3392 cm⁻¹ attribuibile sia all'idrogeno terminale dell'alchino (H_h) sia allo stretching N-H ammidico;

Descrizione del lavoro

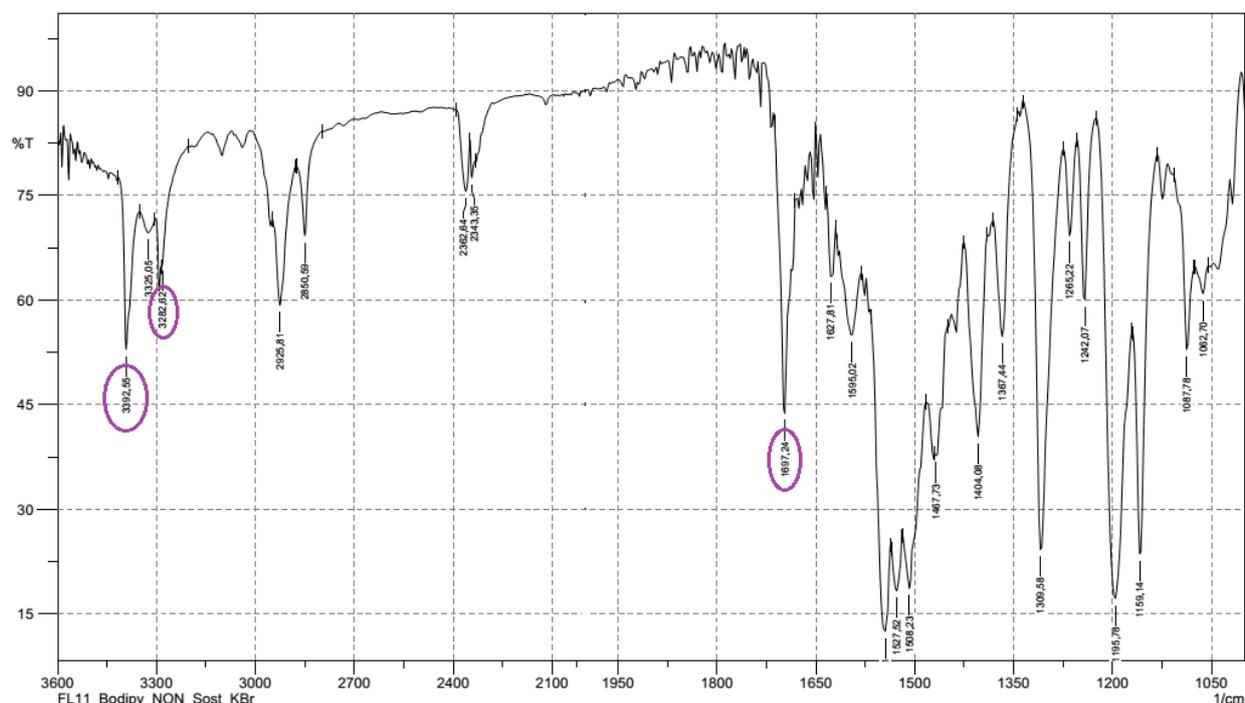


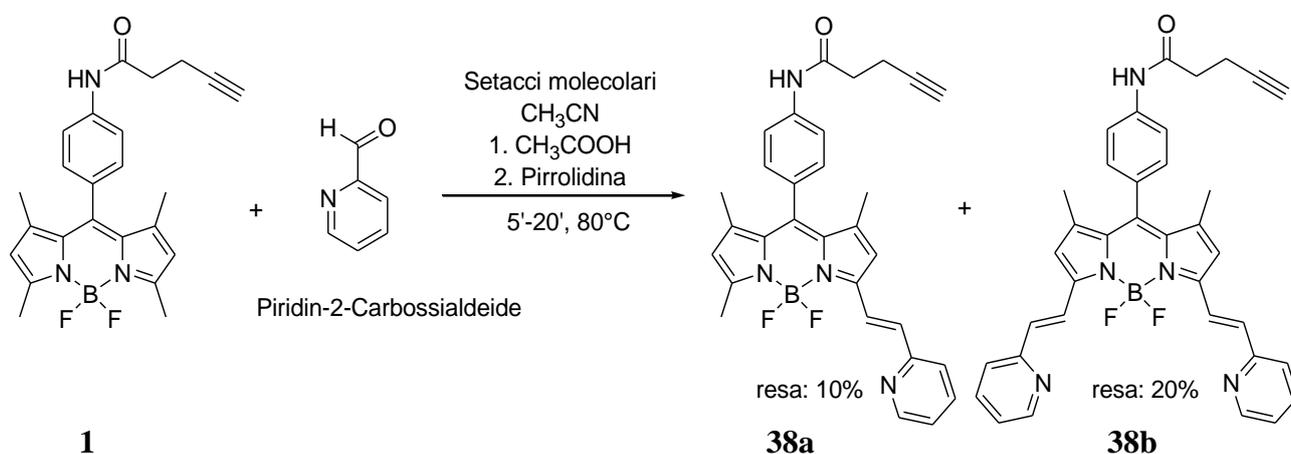
figura 15: spettro IR del composto 1 (in KBr)

Una volta sintetizzato il prodotto **1**, come già precedentemente accennato, esso è stato utilizzato come scheletro per le successive reazioni di *Knoevenagel*, per la sintesi dei suoi derivati con diverse aldeidi aromatiche.

4.2 Sintesi dei derivati del Bodipy Core

4.2.1 Con piridin-2-carbossialdeide

La prima sonda fluorescente che abbiamo sintetizzato è il derivato del Bodipy con la Piridin-2-carbossialdeide. Lo schema di reazione è riportato in seguito nello *schema 12*:

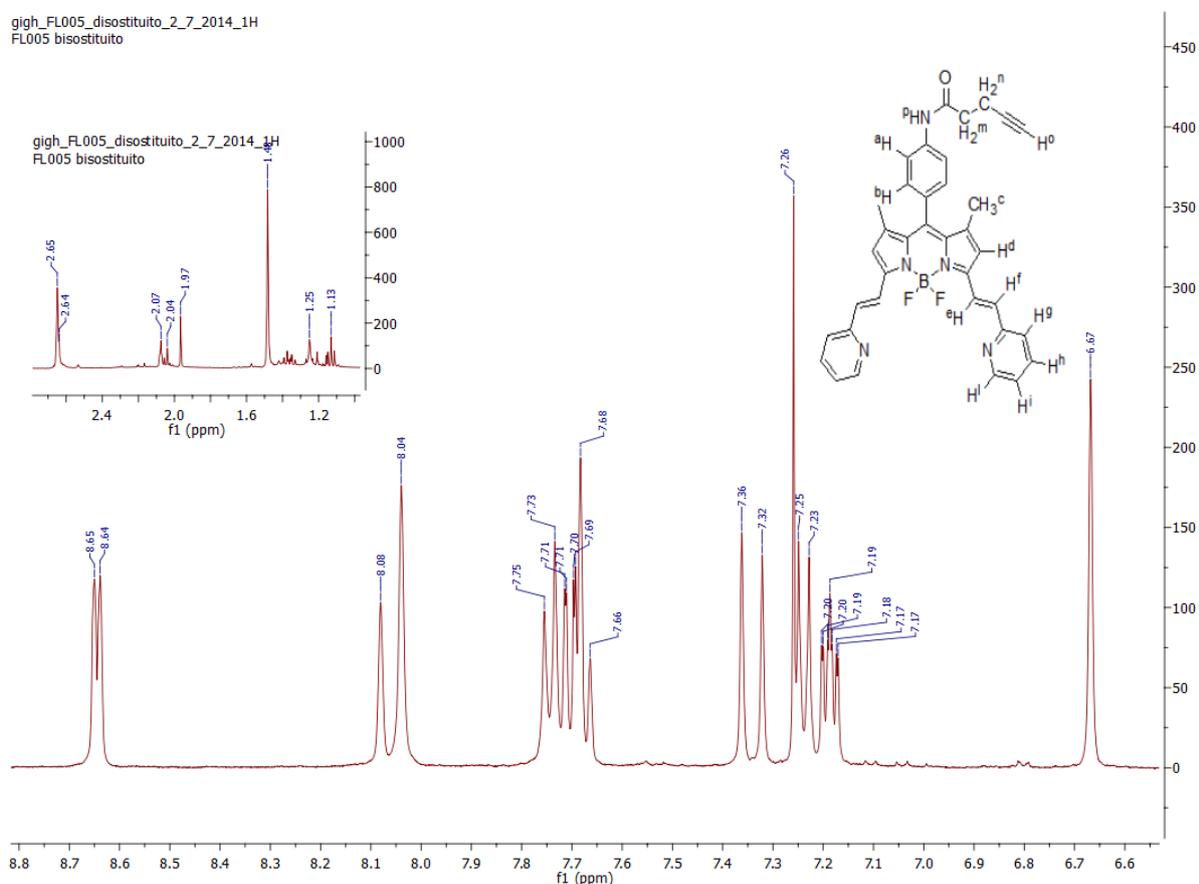


Descrizione del lavoro

Schema 12: sintesi prodotto 38a e 38b

La sintesi presenta delle difficoltà nella separazione dei prodotti, in quanto nonostante i lavaggi eseguiti, in TLC appaiono delle macchie (dovute ad impurità) immediatamente sopra la macchia del prodotto **38a** (il primo ad uscire); questo comporta spettri $^1\text{H-NMR}$ spesso più puliti per il prodotto **38b**. Dalle rese è facile intuire che la reazione non sia particolarmente spostata verso i prodotti (siano essi mono-sostituiti o di-sostituiti), ma grazie alla separazione tramite cromatografia è possibile recuperare buona parte del reagente **1** non reagito (~ 40%). Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ (**figura 16**) del prodotto disostituito **38b** si notano:

figura 16: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto disostituito **38b**



- La scomparsa dei segnali metilici in posizione 3 e 5 del Bodipy Core (**1**);
- La comparsa dei due segnali appartenenti agli idrogeni in posizione *trans* del doppio legame, H_e e H_f; in particolare i segnali sono due doppietti rispettivamente a 8.05 ppm e 7.34 ppm con costante di accoppiamento $^3J_{trans} = 16.4$ Hz;
- La comparsa dei segnali (anche se non completamente risolti) degli idrogeni piridinici H_g, H_h, H_i e H_j; rispettivamente cadono a 8.64, 7.70 (all'interno del multipletto abbiamo sia H_g che H_h), 7.21 ppm;

Descrizione del lavoro

- Lo shift a frequenze maggiori, per effetto deschermante dovuto all'aumento della coniugazione del nuovo doppio legame, dei segnali degli idrogeni pirrolici H_d (da 5.97 a 6.67 ppm);

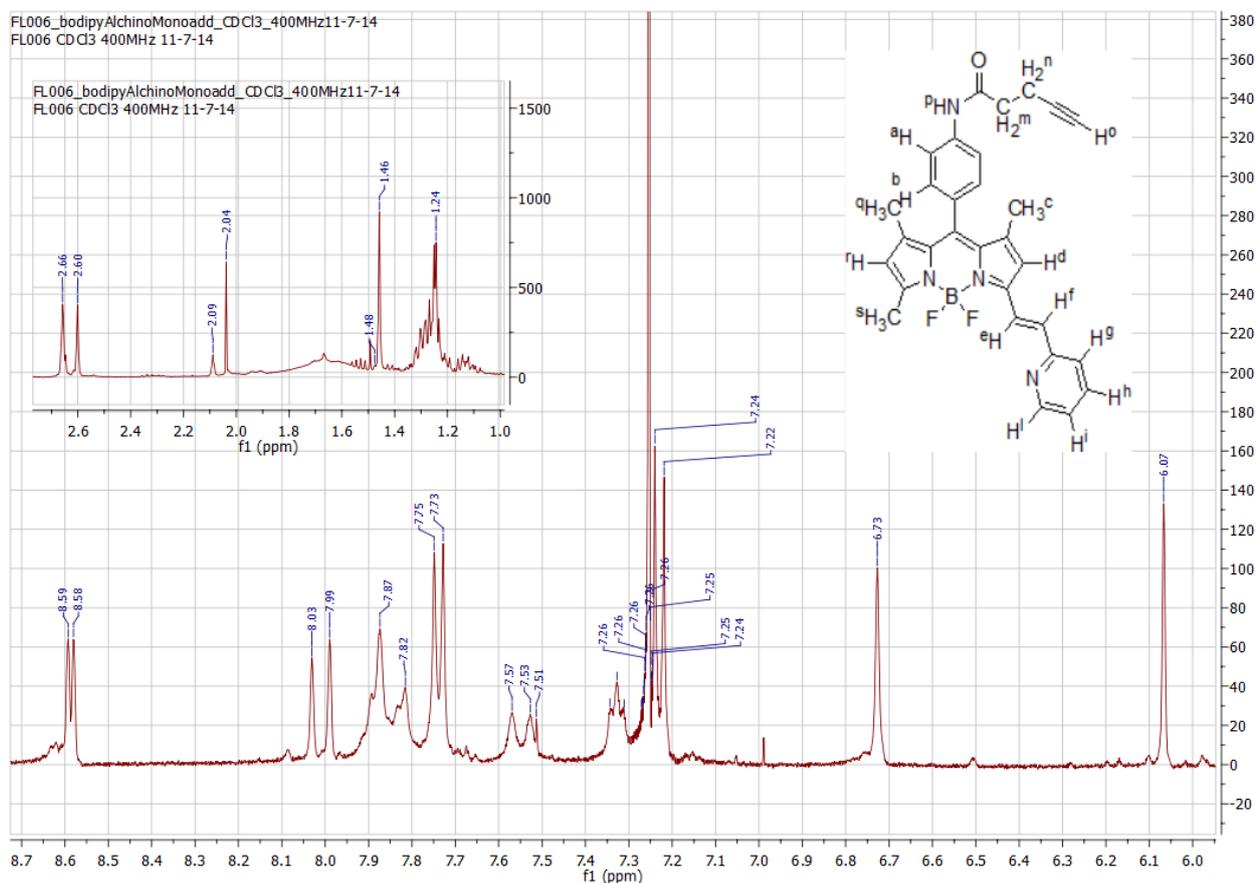


figura 17: spettro ¹H-NMR del prodotto monosostituito 38a

Lo spettro del prodotto monosostituito **38a** avendo perso la simmetria del prodotto disostituito **38b**, presenta uno spettro abbastanza più complesso e peggio risolto rispetto al precedente. Comunque si possono notare alcune caratteristiche peculiari:

- La comparsa del segnale appartenente agli idrogeni metili in posizione 3, H_s, un singoletto a 2.60 ppm;
- La diversificazione dei segnali degli idrogeni pirrolici, H_d e H_r, che ora sono due segnali distinti non essendo più equivalenti; rispettivamente i due segnali cadono a 6.73 ppm e a 6.07 ppm. Il segnale dell'idrogeno H_d, è a frequenze più alte in quanto risente dell'effetto coniugativo del doppio legame vicino, deschermandolo; il segnale di H_r, invece, cade a frequenze minori in quanto risente dell'effetto schermante del metile in posizione 3;

La reazione è stata eseguita una seconda volta nel tentativo di spingere la reazione verso il monoaddotto **38a**, lavorando in condizioni leggermente diverse; infatti abbiamo pensato che

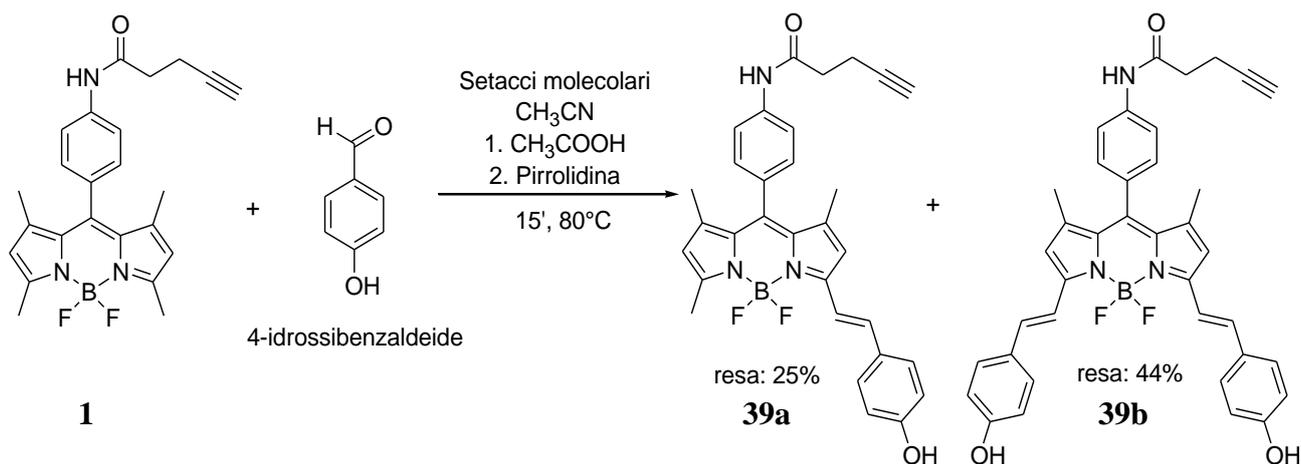
Descrizione del lavoro

lavorando in leggero difetto di Piridin-2-carbossialdeide e in condizioni più blande (60°C invece che 80°C) la reazione dovesse spingersi verso il suddetto prodotto. Purtroppo questo effetto non si è ravvisato, in quanto la resa comunque si è sempre attestata su un rapporto di 2:1 per il prodotto disostituito (8.6% : 3.7%).

La scarsa resa del prodotto, sia mono che disostituito (**38a** e **38b**) è da attribuirsi sicuramente alla quantità di reagenti utilizzati, quantità troppo piccole per permettere attraverso i lavaggi e le purificazioni di ottenere rese importanti. C'è da aggiungere che in letteratura, prodotti analoghi vengono sintetizzati con rese non superiori a circa il 60% e, comunque, spesso il prodotto principale è il prodotto disostituito che comunque risulta di più facile sintesi rispetto al monoaddotto^{15,16}.

4.2.2 Con *p*-idrossibenzaldeide

La seconda sonda fluorescente sintetizzata è il derivato del Bodipy Core (**1**) con la *p*-idrossibenzaldeide. Lo *schema 13* rappresenta la sintesi del prodotto **39a** e **39b**:



Schema 13: sintesi del prodotto 39a e 39b

La sintesi sopra descritta risulta migliore in termini di resa del prodotto, senonché anche in questo caso abbiamo operato su piccoli quantitativi di reagente iniziale ed anche qui è stato necessario procedere a più di una purificazione su colonna cromatografica. La prima per separare il prodotto monosostituito (**39a**) da quello disostituito (**39b**), la seconda per purificare meglio il prodotto monosostituito **39a**. Da tener conto che il prodotto risulta molto meno solubile in CDCl₃ in virtù della maggior polarità dovuta ai gruppi fenolici terminali. Soprattutto il di-addotto risulta praticamente insolubile in CDCl₃, tanto che abbiamo dovuto usare CD₃OD per poter eseguire gli spettri. La reazione, sebbene in letteratura sia molto veloce (~15'-20'), risulta ben più lenta, in quanto per spingere la reazione verso i prodotti abbiamo dovuto spingerci a circa 2h, eseguendo TLC di controllo

Descrizione del lavoro

per osservare l'avanzamento della reazione. Anche in questo caso gli spettri $^1\text{H-NMR}$ risultano molto utili per verificare l'avvenuta reazione (**figura 18**):

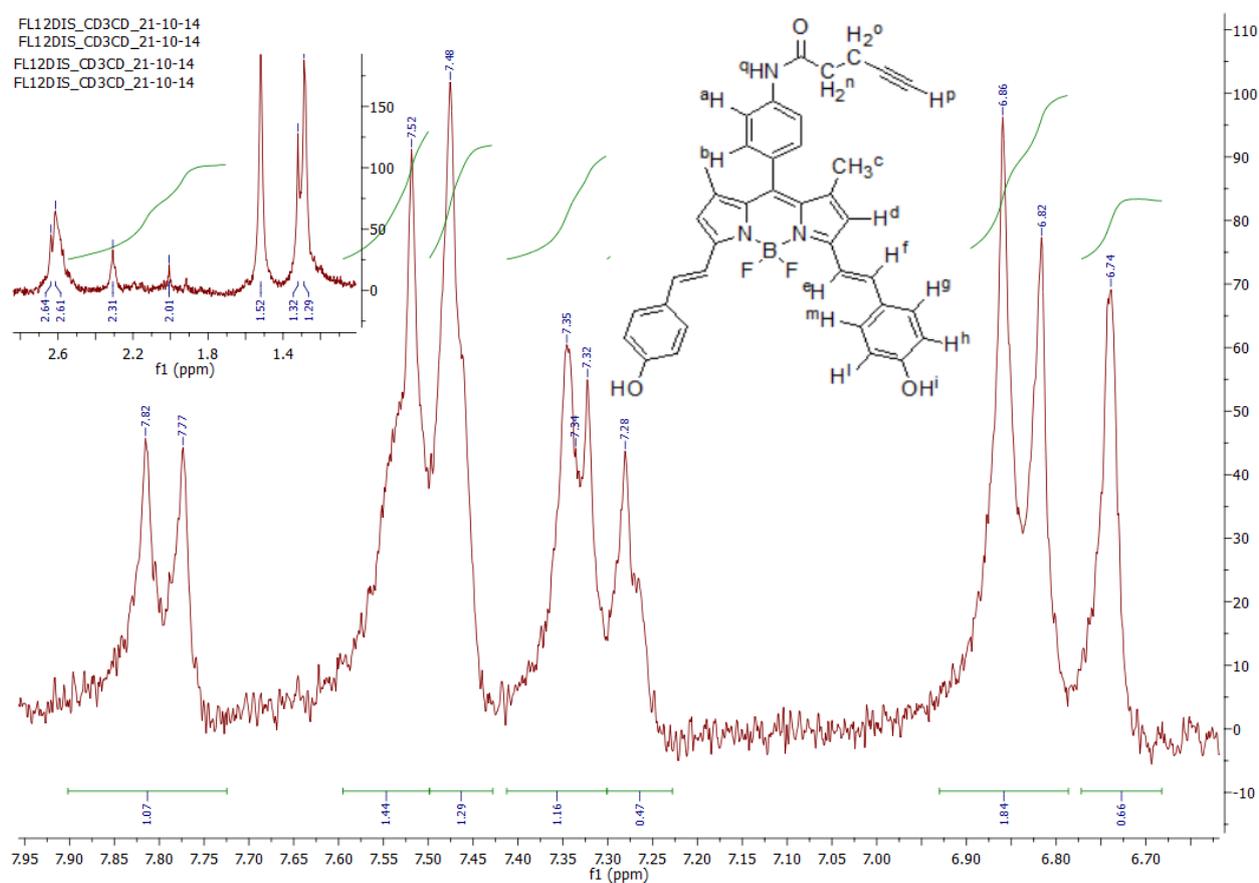


figura 18: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **39b**

- I segnali significativi sono indubbiamente quelli degli idrogeni del gruppo fenolico, facenti parte di un sistema **AA'-BB'**, come quelli del gruppo amido-fenilico del Bodipy Core; purtroppo i segnali appartenenti agli idrogeni in meta (H_g e H_m) cadono all'interno di un multipletto a ~ 7.50 ppm contenente anche il segnale dell'idrogeno H_a ; i segnali invece degli idrogeni in orto (H_h e H_i) sono a 6.84 ppm;
- Si possono notare anche i segnali di doppietto con $^3J_{trans} = 16.4$ Hz a 7.80 ppm e 7.30 ppm, appartenenti agli idrogeni, in posizione *trans*, del doppio legame formatosi a seguito della reazione di *Knoevenagel* (H_f e H_e);

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto monosostituito **39a**, non essendo simmetrico. Presenta molti segnali in più, ed essendo anche meno risolto e più sporco risulta uno spettro meno intelligibile (**figura 19**):

Descrizione del lavoro

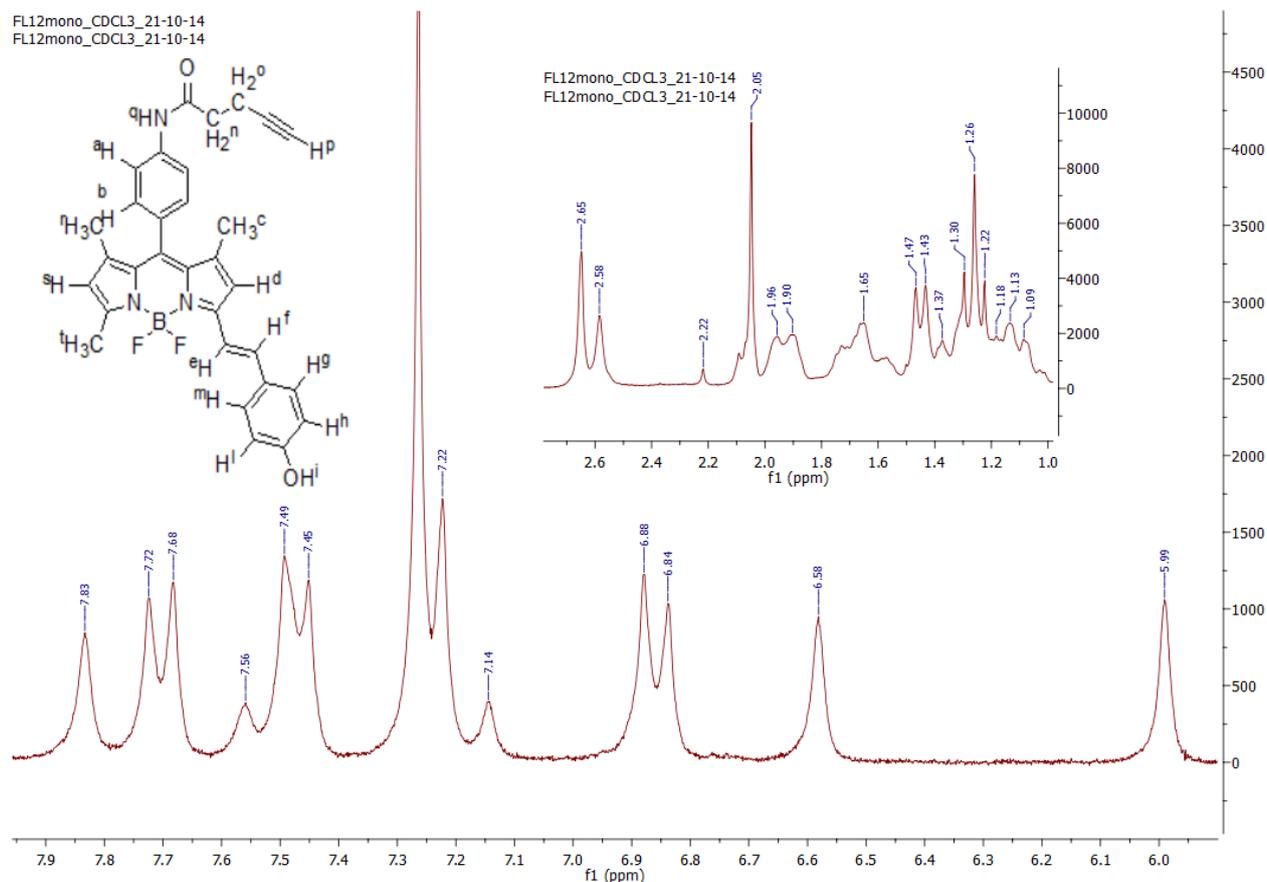


figura 19: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **39a**

- Come per lo spettro dell'addotto con la piridin-2-carbossialdeide (**38a**), i segnali caratteristici sono da ritrovarsi nella comparsa del segnale degli idrogeni metilici in posizione 3, H_t , singoletto a 2.58 ppm;
- La diversificazione nello shift degli idrogeni pirrolici. H_d e H_s , rispettivamente a 6.58 ppm e 6.00 ppm;
- Rimangono i due segnali appartenenti agli idrogeni fenolici in orto e meta, costituenti un sistema **AA'-BB'**; purtroppo dato lo spettro, il segnale degli idrogeni H_g e H_m cade all'interno di un multipletto, zona poco intelligibile da 7.83 a 7.45 ppm;
- Sempre in quel multipletto, 7.83-7.45 ppm, cadono i segnali appartenenti agli idrogeni in *trans*, H_e e H_f ;
- Di contro il segnale appartenente agli idrogeni H_h e H_i , è rilevabile a 6.86 ppm;

Nella **figura 20** e **21** possiamo osservare lo spettro IR, rispettivamente del prodotto **39a** e **39b**:

- Il segnale a 3325 cm^{-1} sarebbe attribuibile sia allo stretching del C-H alchidico terminale, sia allo stretching N-H ammidico, sia allo stretching O-H; data la natura leggermente *broad* del

Descrizione del lavoro

segnale è facile immaginare che lo stretching O-H (impegnato in legami ad idrogeno) sia determinante;

- A 1625 cm^{-1} vediamo la banda I dell'ammide, stretching C=O, ed è osservabile anche la banda II dell'ammide, a 1600 cm^{-1} , determinata principalmente dal bending N-H;

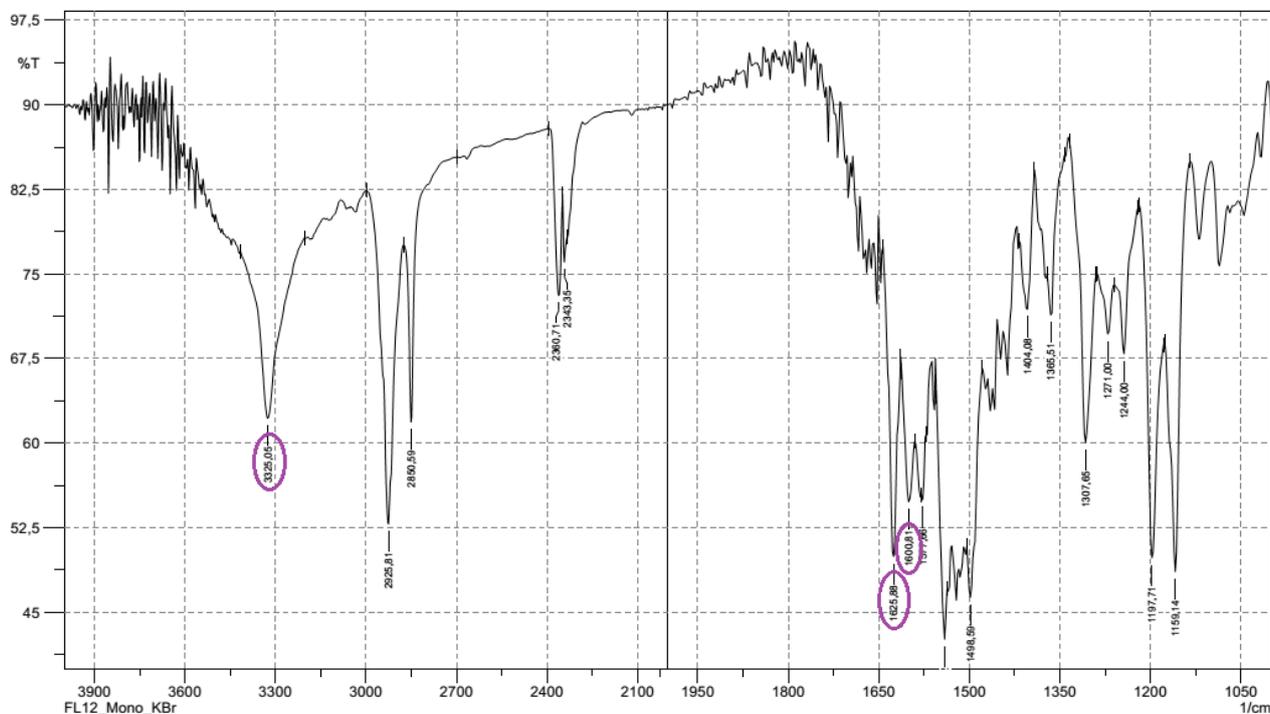


figura 20: spettro IR del prodotto **39a** (KBr)

- I segnali centrati a 3286 cm^{-1} , sono attribuibili allo stretching O-H, impegnato in legami ad idrogeno;
- E difficile ravvedere la banda I dell'ammide, visto il segnale a 1662 cm^{-1} poco chiaro; mentre è più probabile attribuire al segnale a 1598 cm^{-1} la valenza di banda II dell'ammide;

Descrizione del lavoro

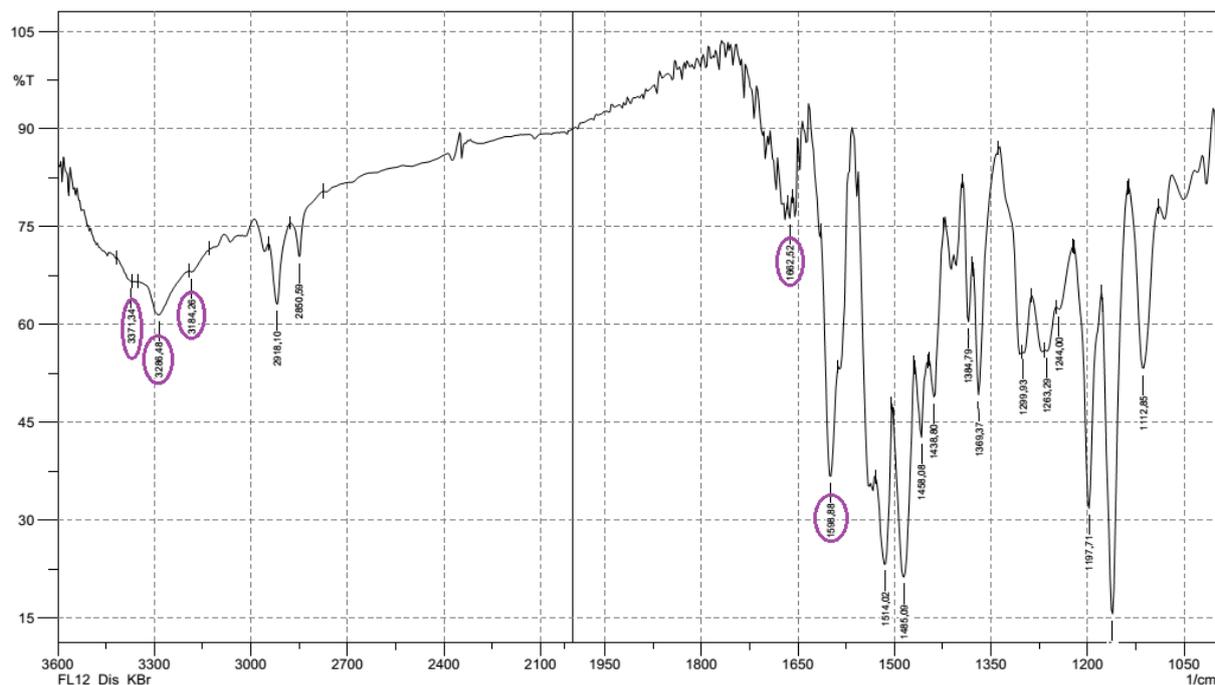
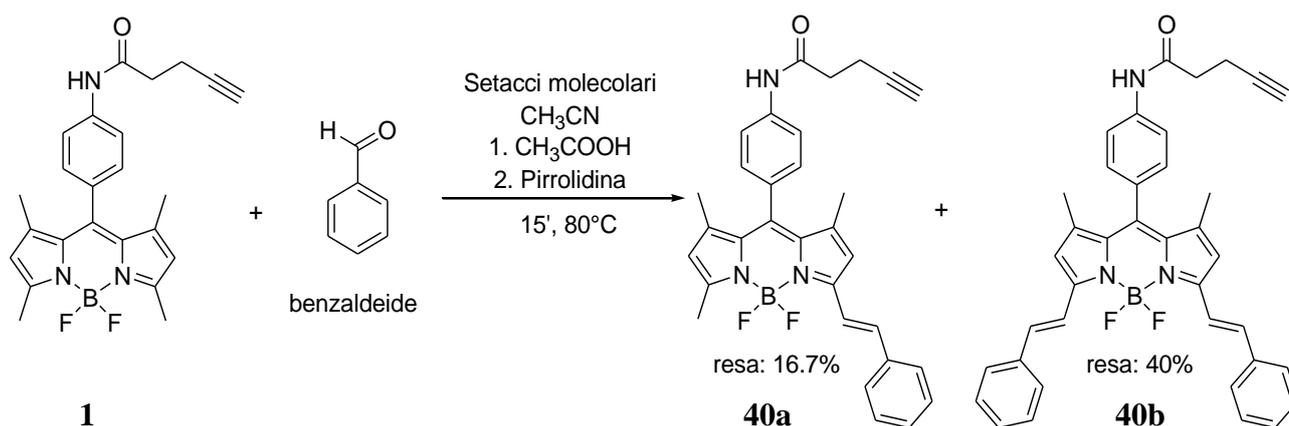


figura 21: spettro IR del prodotto 39b (KBr)

4.2.3 Con benzaldeide

La sintesi dell'addotto Bodipy con benzaldeide procede esattamente come le precedenti, ad eccezione dell'utilizzo della benzaldeide (*schema 14*):



Schema 14: sintesi del prodotto 40a e 40b

Anche in questo caso la resa della reazione è più coerente con i dati trovabili in letteratura; comunque il prodotto disostituito **40b** risulta sempre il prodotto principale di questa tipologia di sintesi, con un rapporto che si attesta spesso su 2:1 per il prodotto disostituito. Da sottolineare che durante questa sintesi il pallone contenente i prodotti si è rotto, per cui si è dovuto recuperare i prodotti, che,

Descrizione del lavoro

indubbiamente, si sono sporcati nell'operazione. Da tenere conto che anche questa volta nonostante i tempi di reazione da letteratura dichiarassero tempi tra i 15' e i 20', noi abbiamo dovuto procedere a circa 1h per spingere la reazione verso i prodotti. Anche in questo caso, inoltre, sul prodotto **40a** abbiamo dovuto procedere ad una ulteriore purificazione su colonna cromatografica al fine di "ripulire" al meglio il suddetto prodotto. Si presti attenzione al fatto il lavaggio con H₂O milli-q non ha comportato nessuna separazione di fase, tra quella acquosa e quella organica, per cui eventualmente si può anche saltare questo lavaggio.

Dagli spettri ¹H-NMR si possono ricavare alcune informazioni importanti; partiamo dal prodotto disostituito **40b** (*figura 22*):

- A 7.74 ppm si può notare il segnale di doppietto con $^3J_{trans} = 16$ Hz, dell'idrogeno H_f; questo segnale fa coppia con quello a 7.30 ppm, dell'idrogeno H_e;
- Importante la scomparsa dei segnali degli idrogeni metilici in posizione 3 e 5;
- La comparsa dei segnali appartenenti agli idrogeni fenilici, H_g, H_h, H_i, H_l, H_m;
- In particolare notiamo a 7.64 ppm, un segnale di pseudo-doppietto, appartenente agli idrogeni in *orto*, H_g e H_m;
- A 7.40 ppm troviamo invece gli idrogeni *meso*, con un segnale di pseudo-tripletto, H_h e H_i;
- Infine a all'interno del multipletto da 7.34 a 7.27 ppm, troviamo gli idrogeni *para*, H_l;

Descrizione del lavoro

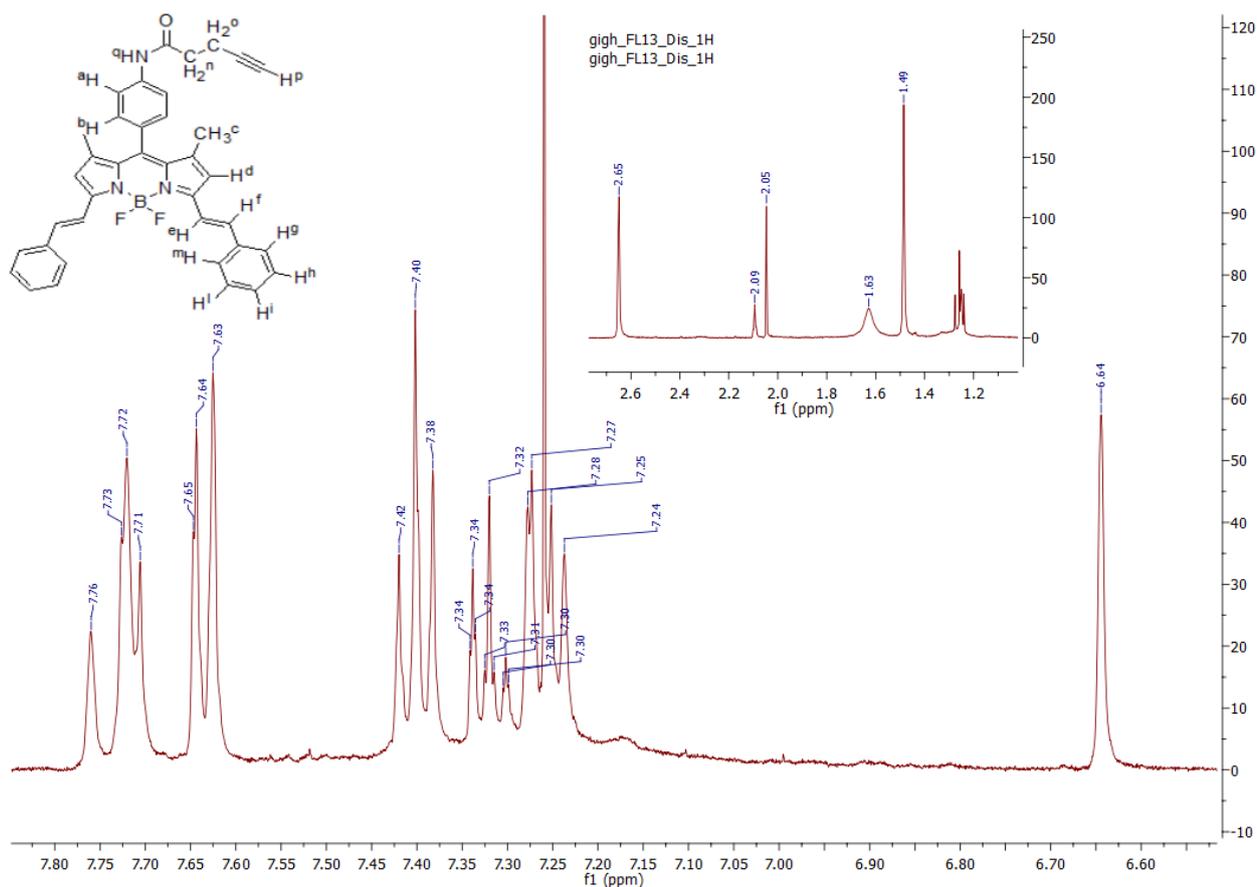


figura 22: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **40b**

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto monosostituito **40a**, in virtù della sua non simmetria, presenta uno spettro più complesso, a cui se aggiungiamo una maggior difficoltà di separazione e pulizia, ci porta ad avere uno spettro poco intelligibile (**figura 23**):

- Troviamo i segnali degli idrogeni *trans*, H_f e H_e , rispettivamente a 7.81 e 7.33 ppm (doppietto con $^3J_{trans} = 16$ Hz);
- Purtroppo i segnali appartenenti agli idrogeni fenilici, H_g , H_h , H_i , H_l e H_m , cadono all'interno di due multipletti, uno da 7.73 a 7.52 ppm e l'altro da 7.42 a 7.35 ppm;
- Abbiamo la diversificazione dello shift dei due idrogeni pirrolici, H_d e H_s ; il primo si trova a 6.55 ppm, mentre il secondo a 5.97 ppm;
- Infine importante è il segnale appartenente agli idrogeni metilici in posizione 3 o 5, H_t ; il segnale di singoletto lo troviamo a 2.22 ppm;

Descrizione del lavoro

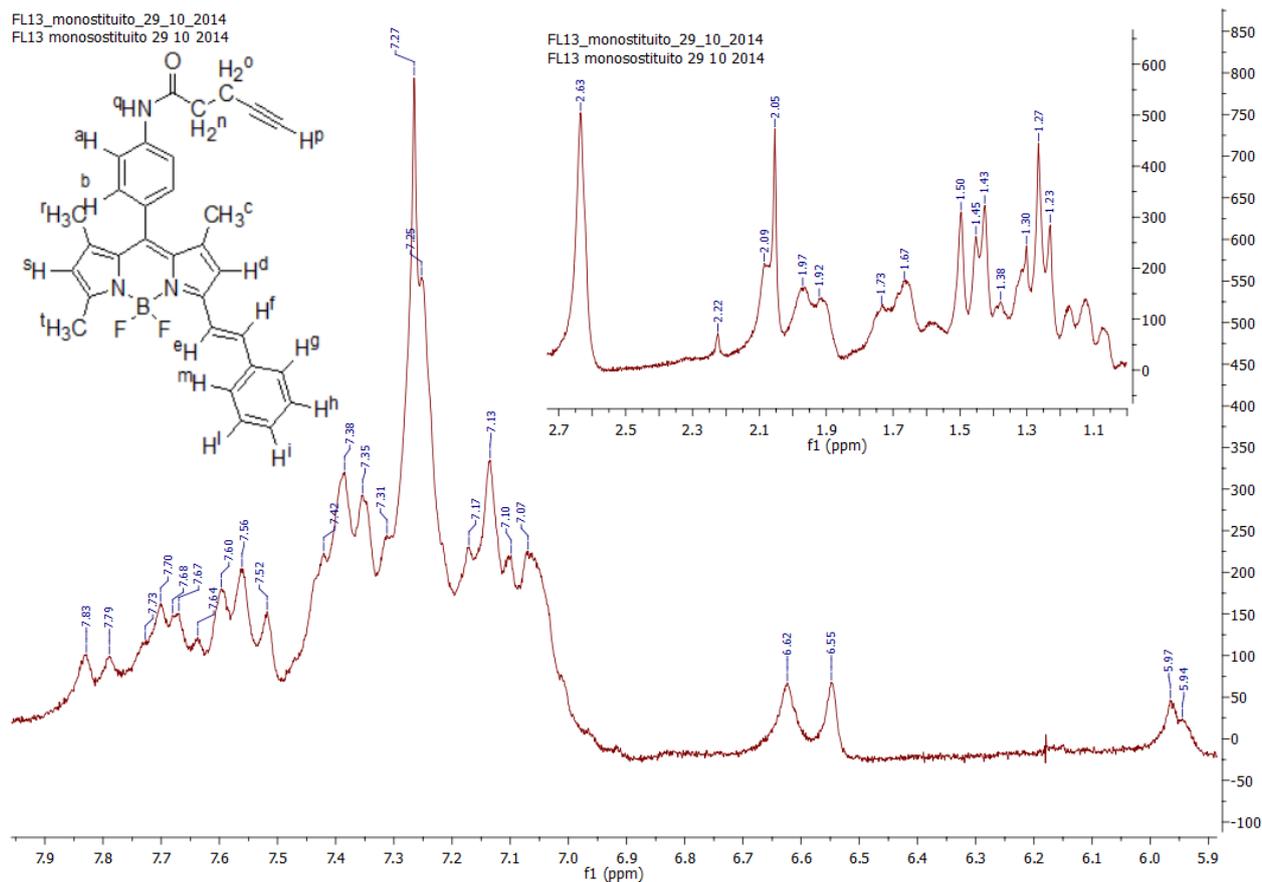


figura 23: spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **40a**

Negli spettri IR (**figura 24 e 25**, rispettivamente **40b** e **40a**), possiamo denotare:

- A 3384 e 3292 cm^{-1} , il segnale attribuibile all’N-H ammidico;
- Rispetto ai precedenti spettri IR, compaiono dei segnali a 3056 e 3026 cm^{-1} , attribuibili allo stretching sp^2 dei C-H aromatici;
- A 1683 cm^{-1} la banda I dell’ammide (stretching C=O) e a 1616 e 1595 cm^{-1} la banda II (bending N-H);

Descrizione del lavoro

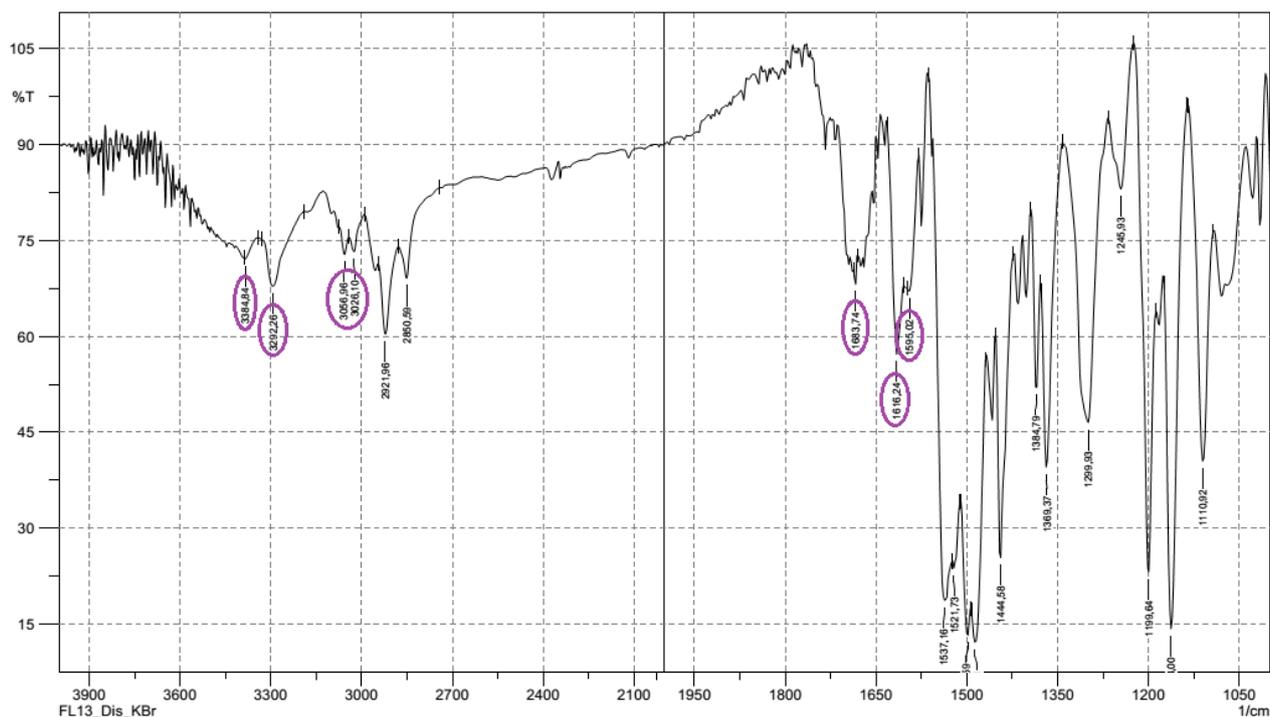


figura 24: spettro IR prodotto **40b** (KBr)

- Segnali a 3392 e 3298 cm^{-1} del gruppo NH ammidico;
- I segnali a 3056 e 3026 cm^{-1} , per lo stretching sp^2 dei C-H aromatici;
- 1600 cm^{-1} per la banda I dell'ammide (stretching C=O) e 1541 e 1506 cm^{-1} per la banda II (bending N-H);

Descrizione del lavoro

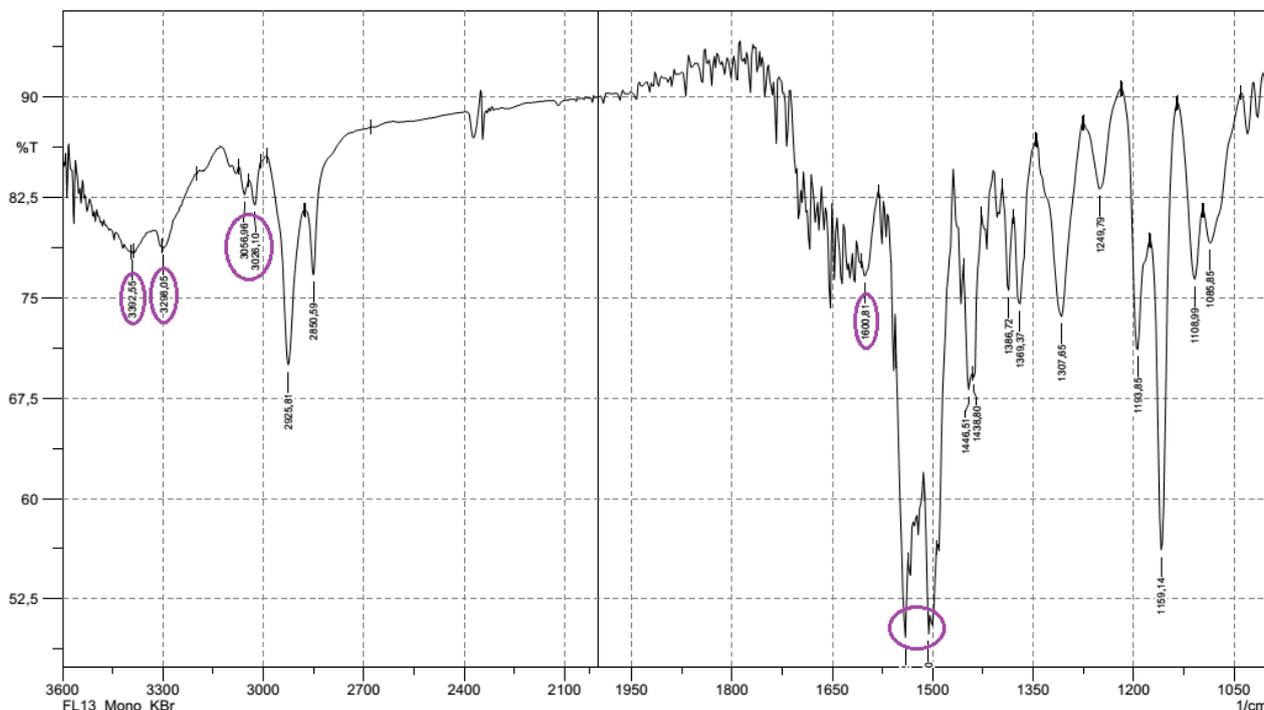
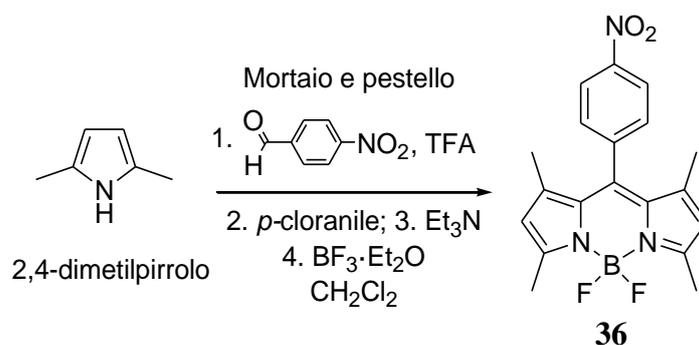


figura 25: spettro IR prodotto 40a (KBr)

4.3 Sintesi del nitro-addotto del Bodipy Core mediante nuova via sintetica

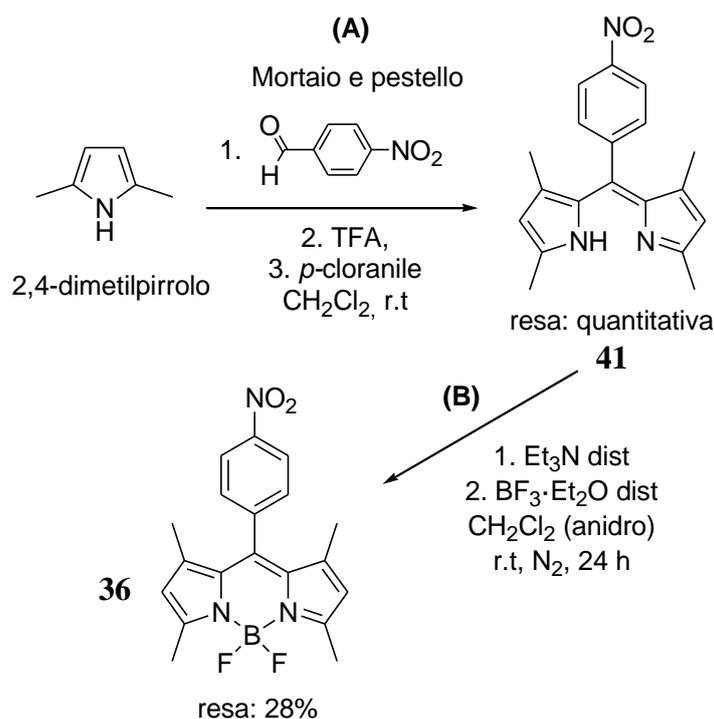
Nonostante si sia già sintetizzato il prodotto **36**, il metodo di sintesi usato risultava comunque lungo, laborioso e con una resa molto bassa. Per questo motivo abbiamo cercato in letteratura se esistesse una sintesi più veloce e con rese più elevate, nonché meno laboriosa. Ed effettivamente questa è stata trovata in una sintesi meccano-chimica¹⁷. Nonostante le ottime premesse, abbiamo in realtà incontrato alcune difficoltà ed alcune incongruenze nel metodo proposto. Secondo il metodo descritto in letteratura, aggiungendo, nell'ordine, *p*-nitrobenzaldeide e TFA, *p*-cloranile, Et₃N e infine BF₃ · Et₂O (pestando il tutto con pestello e mortaio), si dovrebbe ottenere il prodotto (**36**) Bodipy Core col gruppo nitro (NO₂), come nello *schema 15*:



Schema 15: sintesi del prodotto **36** come da letteratura¹⁷

Descrizione del lavoro

Noi invece abbiamo ravvisato che alla fine del suddetto processo, il prodotto ottenuto era in realtà il prodotto **36** senza il Boro. Per cui abbiamo proceduto mediante un'ulteriore aggiunta di $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ e TEA; dopo questo ulteriore passaggio abbiamo ravvisato che la borazione aveva avuto successo e che, quindi, avevamo ottenuto il prodotto desiderato (**36**). Riteniamo, almeno stando ai dati forniti dall'articolo, che ci sia una incongruenza nell'uso del $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ all'aria (ovvero nel mortaio); questo in quanto il passaggio che ne prevede l'uso è sempre eseguito sotto atmosfera di azoto, per quanto riguarda tutte le metodologie di sintesi da noi trovate in letteratura. Riteniamo che l'uso del $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ non sotto atmosfera d'azoto comporti una sua qualche degradazione e che, quindi, non avvenga bene il processo di borazione. Per ovviare a questo problema, in virtù anche del fatto che il secondo passaggio in $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ aveva, comunque, avuto successo, abbiamo deciso di sfruttare la sintesi meccano-chimica per arrivare al prodotto ossidato ma non ancora borato e, successivamente, procedere al passaggio di borazione in modo abituale. Lo schema complessivo è il seguente (*schema 16*):



Schema 16: schema riassuntivo della sintesi del prodotto 36 con la nuova metodologia meccano-chimica

Dagli spettri $^1\text{H-NMR}$ (*figura 26 e 12a*) si può notare l'effetto della borazione, determinante uno shift di tutti i segnali a frequenze leggermente maggiori:

Descrizione del lavoro

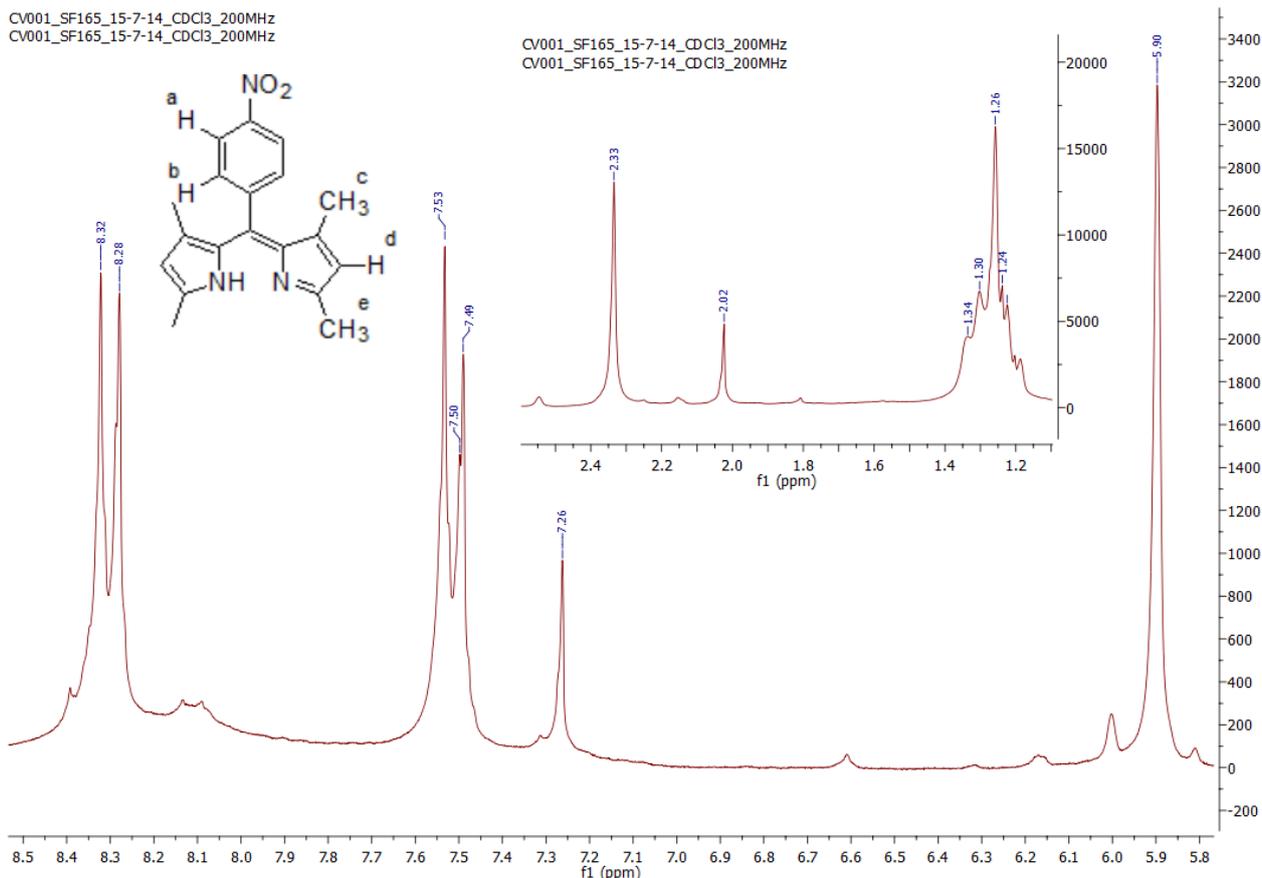


figura 26: spettro ¹H-NMR del prodotto **41**

- Rispetto al prodotto non ancora ossidato (**35**) si nota uno shift, a frequenze maggiori, di tutti i segnali, ad eccezione degli idrogeni metilici in posizione 1 e 7 (H_c) che invece scendono a frequenze minori (confrontare con lo spettro ¹H-NMR del prodotto **35** in **figura 11**);
- In particolare lo shift a frequenze maggiori è di ~15-20 ppm, mentre gli idrogeni H_c subiscono uno shift a frequenze minori di ~60 ppm;

Lo spettro di **36** viene qui ripresentato (**figura 12a**) per meglio capire l'effetto della borazione e per presentare lo spettro appartenente a questa nuova via sintetica:

- Tutti i segnali presenti subiscono uno shift a frequenze maggiori di ~10-20 ppm, ad eccezione degli idrogeni fenilici in posizione *meta* (H_b) rispetto al gruppo nitro (NO₂), che rimangono praticamente invariati (se escludiamo uno shift inferiore ai 2 ppm);

Descrizione del lavoro

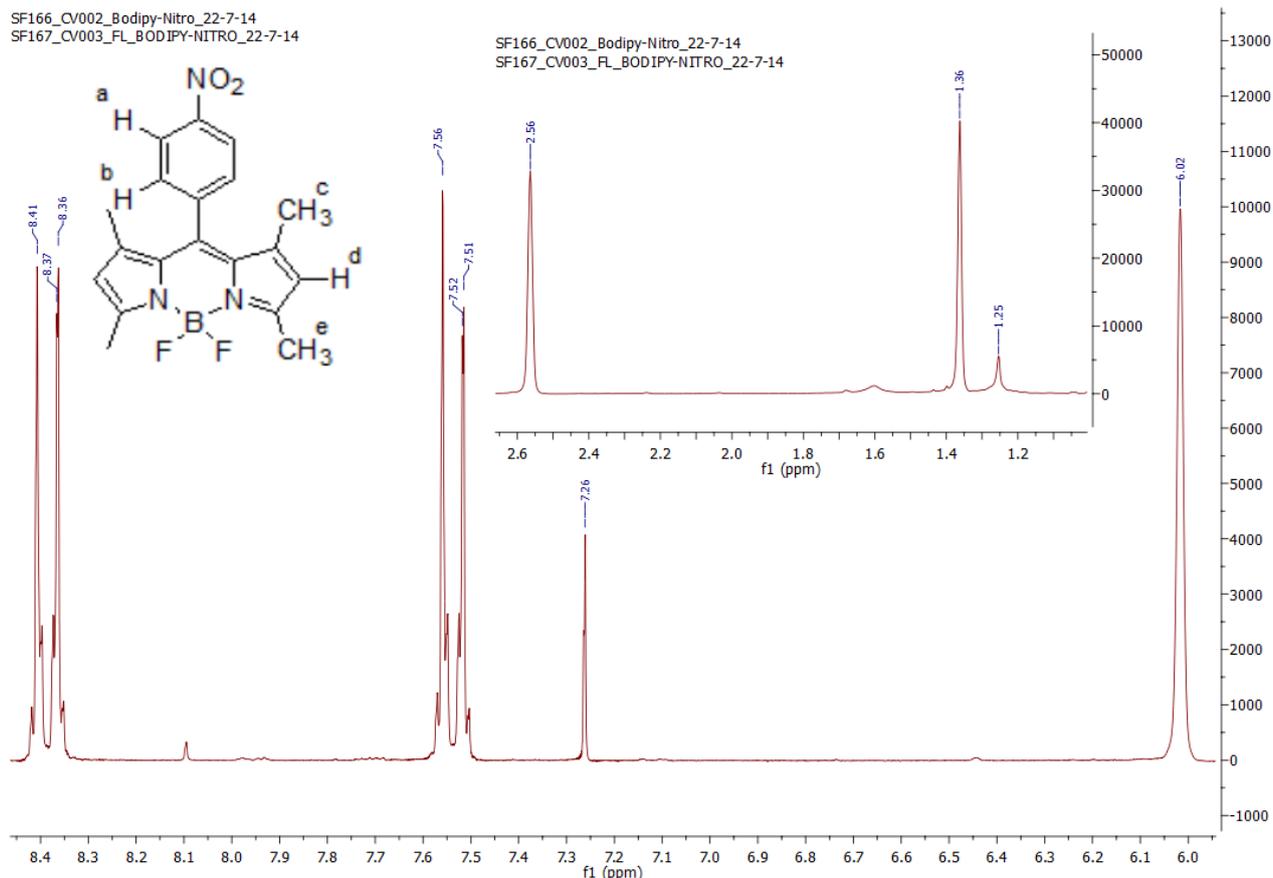


figura 12a: spettro ¹H-NMR del prodotto 36 mediante la nuova metodologia di sintesi

4.4 Preparazione dell'addotto Bodipy-piridina (38) – nanotubi di carbonio

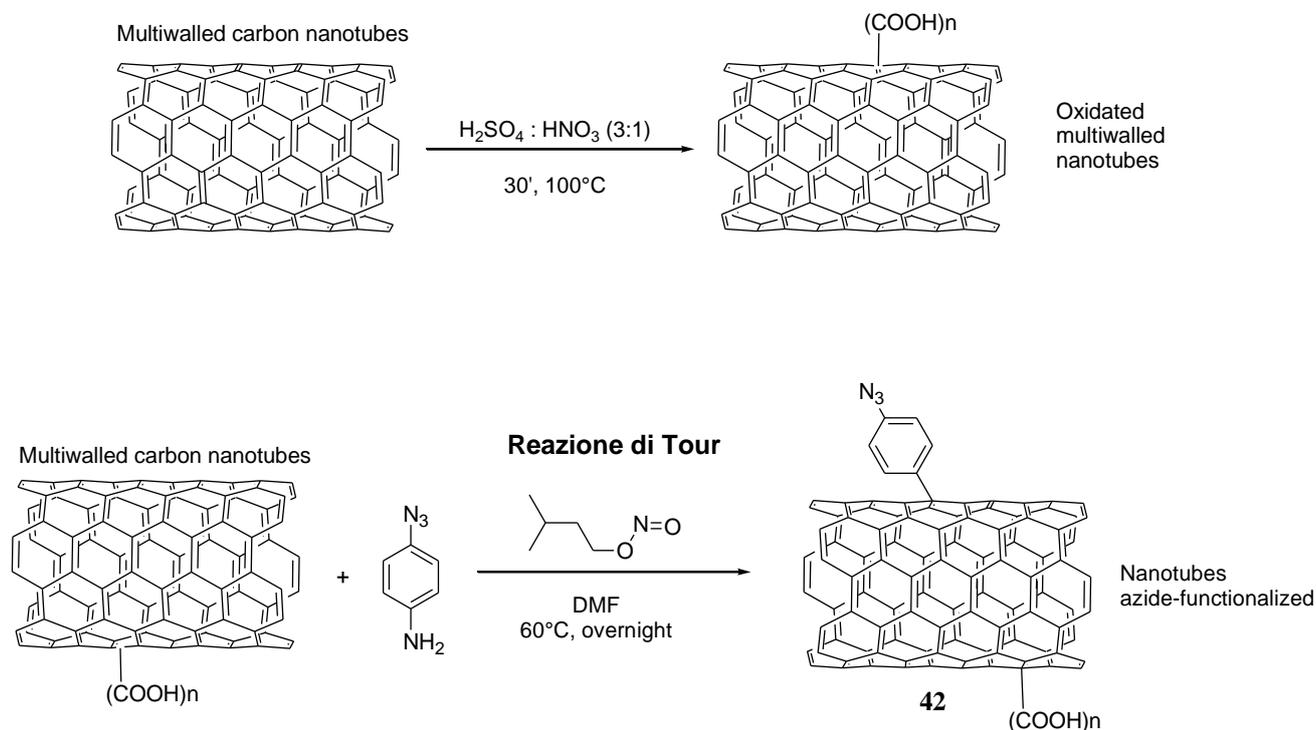
La preparazione dell' addotto tra nanotubi e il prodotto 38 è stato frutto di un lavoro congiunto con un altro lavoro di tesi. In questo lavoro ci siamo occupati della formazione dell'addotto, mentre la preparazione dei nanotubi di carbonio e gli sviluppi successivi sono stati eseguiti dal nostro gruppo di ricerca, mentre io lo seguivo in questo lavoro.

4.4.1 Preparazione dei nanotubi di carbonio (Ossidazione)

Il primo passaggio da effettuare prima della sintesi dell'addotto Bodipy-nanotubi, è preparare quest'ultimi per le reazioni successive. Quindi il primo passaggio prevede l'ossidazione di nanotubi *pristine* con gruppi carbossilici e carbonilici, mediante reazione con miscela solfonitrica a 100°C per 30'. In seguito bisogna funzionalizzare il nanotubo stesso con un gruppo azido-terminale (-N₃); nel

Descrizione del lavoro

nostro caso abbiamo scelto la *p*-azidoanilina, che mediante reazione di Tour viene attaccata ai nanotubi. Lo schema complessivo lo si può osservare di seguito (*schema 17*):



Schema 17: Ossidazione e reazione di Tour sui nanotubi di carbonio

I nanotubi ossidati presentano una dispersibilità elevata in acqua, 5 mg/mL (come si può osservare in *figura 27*) e in solventi organici (tipo etanolo), 2.5 mg/mL, a differenza dei CNTs *pristine*. Questo può essere attribuito al fatto che la presenza dei gruppi carbossilici diminuisca le interazione tra nanotubi stessi e, di conseguenza, la loro tendenza a formare aggregati. Per ottenere, comunque, una buona solubilità è bene eseguire un breve processo di sonicazione.



A

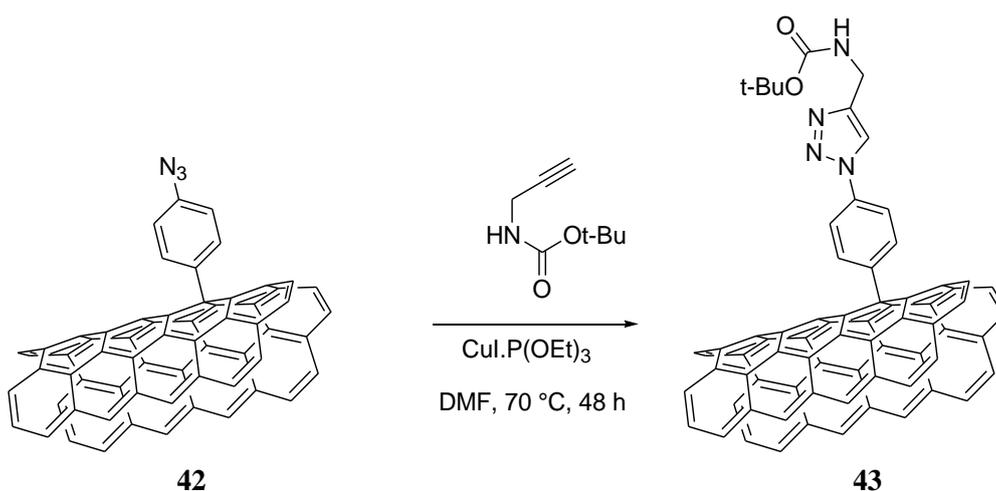
B

*figura 27: grado di solubilità dei nanotubi *pristine* (A) rispetto a quello dei nanotubi ossidati (B), pari a 5 mg/mL*

Descrizione del lavoro

Al termine della reazione di Tour, per evitare filtrazioni che risulterebbero molto lunghe, si eseguono 5 cicli di centrifugazione, utilizzando come solvente isopropil etero ($i\text{-Pr}$)₂O, così da separare i CNTs sia dal materiale non reagito che dal solvente di reazione. I nanotubi così recuperati mostrano una solubilità estremamente simile a quella dei CNTs ossidati, ottenuti precedentemente. Molto importante è determinare il grado di funzionalizzazione dei nanotubi. Per ottenere questa informazione ci si affida all'analisi termogravimetrica (TGA) e all'analisi elementare. Tramite analisi elementare siamo andati a determinare la quantità di azoto presente nel campione e, di conseguenza, i gruppi azide ($-\text{N}_3$) presenti. Con la TGA, invece, andiamo a determinare la perdita di peso dei nanotubi prima e dopo la funzionalizzazione, fornendoci un dato quantitativo circa il grado di funzionalizzazione degli stessi (per differenza tra i pesi si risale alla quantità di materiale legato alla superficie del nanotubo). Per TGA sono state effettuate due analisi:

- La prima è andata a misurare la quantità di $-\text{N}_3$ rilasciata dal campione **42**;
- La seconda invece si è avvalsa prima di una reazione ulteriore, una reazione di *click* con N-Boc-propargilammina (*schema 18*); poi, si è andati a valutare la quantità in peso di isobutene rilasciata, essendo essa direttamente proporzionale al numero di gruppi $-\text{N}_3$ reagiti con N-Boc propargilammina;



Schema 18: Reazione di *click* tra **42** e N-Boc propargilammina

I risultati ottenuti tramite le tre analisi sono coerenti tra loro, permettendoci di compararli e di poter definire che il grado di funzionalizzazione è circa il 3%, che vuol

Descrizione del lavoro

dire che il gruppo $-N_3$ è legato a circa il 3% di atomi carboni totali, come riportato in *tabella 5*:

Composto	Quantità di gruppi N_3 calcolati attraverso analisi elementare	Quantità di gruppi N_3 calcolati attraverso analisi TGA	Quantità di isobutene calcolata attraverso analisi TGA
42	3.21 %	3.55%	-
43	-	-	3.09%

tabella 5: Grado di funzionalizzazione dei CNTs-azide

4.5 Test biologici e caratteristiche spettrofotometriche

Dopo aver preparato le sonde fluorescenti (Bodipy) e i nanotubi di carbonio, si procede alle analisi spettrofotometriche per verificarne l'effettiva utilizzabilità.

Le sonde preparate devono avere determinate caratteristiche spettroscopiche in quanto sono state e saranno utilizzate per test biologici al microscopio confocale.

4.5.1 Microscopio confocale

Il microscopio confocale è un tipo di microscopio ottico la cui tecnologia determina un aumento sensibile della risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato. Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ed è schematicamente costituito da un normale microscopio a trasmissione a cui viene sovrapposto un apparato che si occupa di illuminare e rilevare l'immagine di un campione illuminato con una scansione punto a punto.

Esistono diverse tecniche per ottenere questo risultato: la più diffusa è denominato CLSM, acronimo di *Confocal Laser Scanning Microscope*, è un evoluto microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo. La sua sorgente luminosa è costituita da uno o più laser, generalmente a semiconduttore, per ogni diversa frequenza di eccitazione richiesta.

Descrizione del lavoro

Per il microscopio confocale usato da noi le lunghezze d'onda di eccitazione possibili sono 458, 476, 488, 514, 543 e 633 nm; i nostri prodotti devono quindi assorbire a quelle determinate lunghezze d'onda.

4.5.2 Sonda fluorescenti

La scelta di usare il Bodipy Core (**1**) come sistema base per lo sviluppo delle successive sonde fluorescenti, è dovuto al fatto che esso stesso presenta un massimo di assorbimento a 501 nm per emettere il massimo di fluorescenza a 511 nm (eccitando ad una lunghezza d'onda di 488 nm) (*figura 28 e 29*).

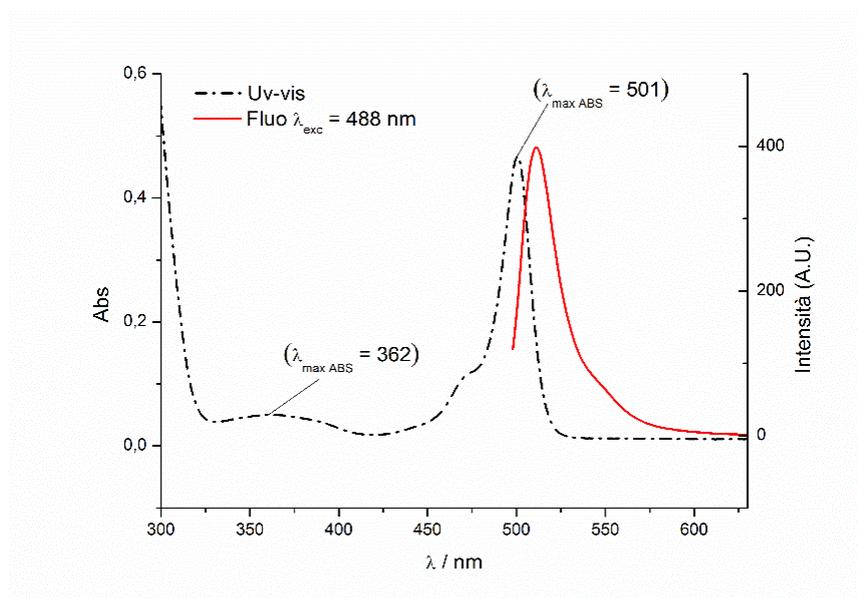


figura 28: spettro Uv-vis e di fluorescenza del prodotto 1

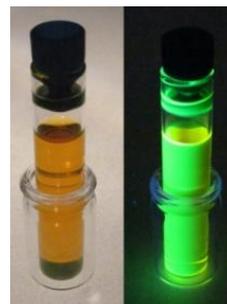


figura 29: Assorbimento (sinistra); Emissione (destra)

Questo determina che già il Bodipy Core (**1**) potrebbe essere utilizzabile come sonda fluorescente da attaccare ai nanotubi. Nonostante questo il test al microscopio confocale non ha dato risultati buoni. Motivo in più per cercare derivati del Bodipy Core che emettano a lunghezze d'onda ed intensità maggiori.

Le successive sonde preparate, effettivamente, si dimostrano migliori del Bodipy Core. Partendo dal primo derivato preparato, il prodotto **38**, vediamo che questo presenta un picco di assorbimento Uv-vis a 572 e 623 nm, per il prodotto disostituito **38b**, mentre il prodotto monosostituito **38a** li ha a 521 e 559 nm; eccitando a 572 nm, il prodotto **38b** ha il massimo di emissione a 629 nm, mentre il prodotto **38a** presenta il massimo a 566 nm, eccitando a 514 nm (*figura 30 e 31*).

Descrizione del lavoro

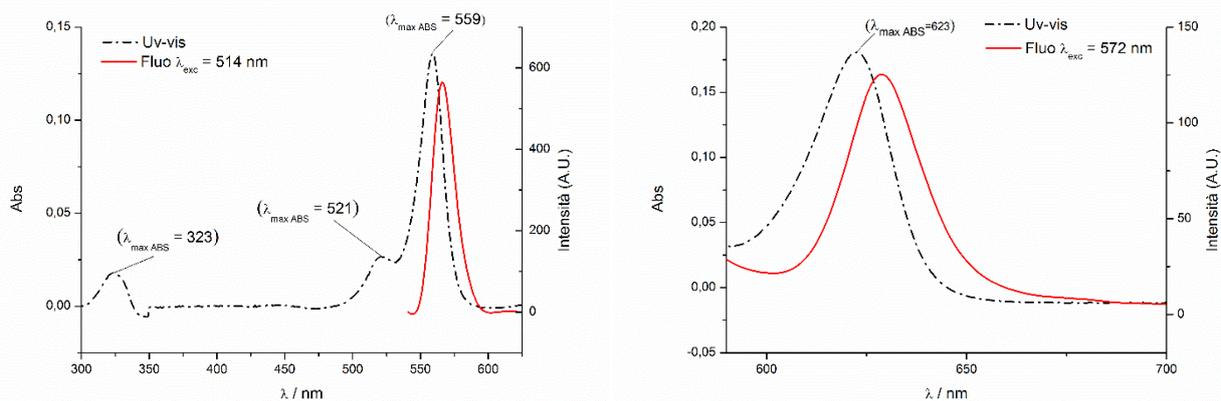


figura 30: spettro Uv-vis e di fluorescenza di **38a** (sinistra) e **38b** (destra)

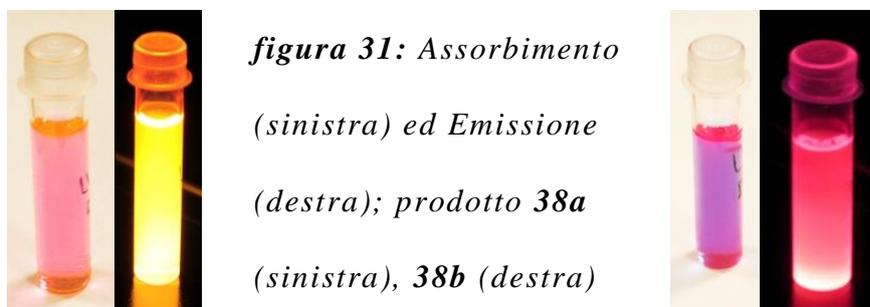


figura 31: Assorbimento (sinistra) ed Emissione (destra); prodotto **38a** (sinistra), **38b** (destra)

Per le sonde **39a** e **39b** vediamo i massimi d'assorbimento, Uv-vis, rispettivamente, a 547, 574 nm e a 599, 650 nm. I massimi di emissione sono a 594 nm (**39a**) e a 594, 667 nm (**39b**), con λ di eccitazione pari a 543 nm; per il prodotto disostituito (**39b**) è stato eseguito un'ulteriore spettro con λ di eccitazione di 633 nm, ottenendo un massimo di emissione univoco a 667 nm (figura 32). In particolare, per il prodotto **39b**, cambiando la λ di eccitazione cambia anche l'intensità di fluorescenza dei massimi di emissione:

- l'intensità maggiore, per la λ di eccitazione a 543 nm, equivale al picco di emissione a 594 nm;
- l'intensità maggiore, per la λ di eccitazione a 633 nm, equivale al picco di emissione a 667 nm (ovviamente il picco a 594 nm non è presente);

Descrizione del lavoro

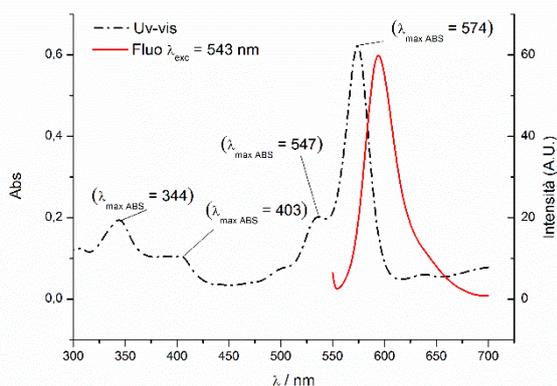
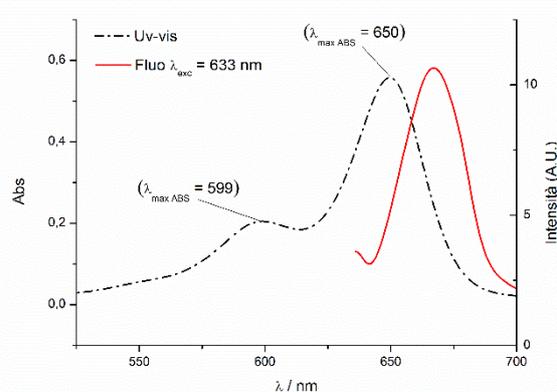
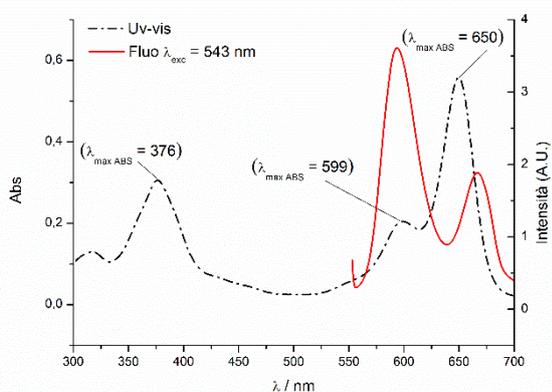


figura 32: spettro Uv-vis prodotto 39a (A), 39b (B e C)

A



B

C

Per la sonda **40a** e **40b**, abbiamo invece i massimi d'assorbimento a 547 e 574 nm (**40a**) e a 575 e 624 nm (**40b**). I massimi d'emissione, con λ di eccitazione pari a 543 nm, sono a 629 nm per il prodotto **40a** e a 576 e 637 nm per il prodotto **40b** (figura 33).

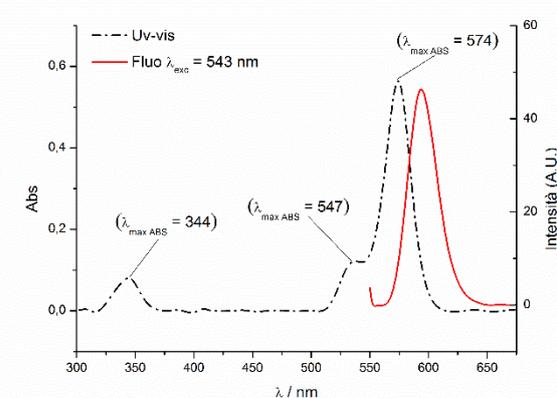
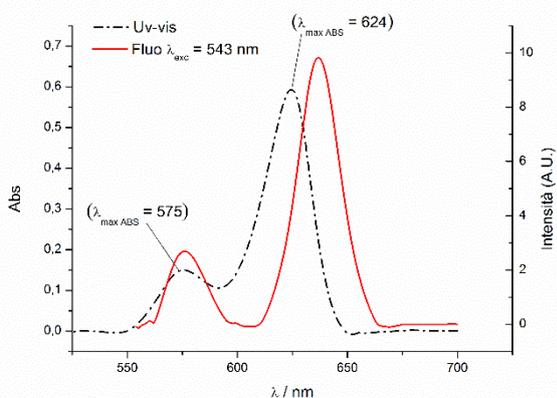


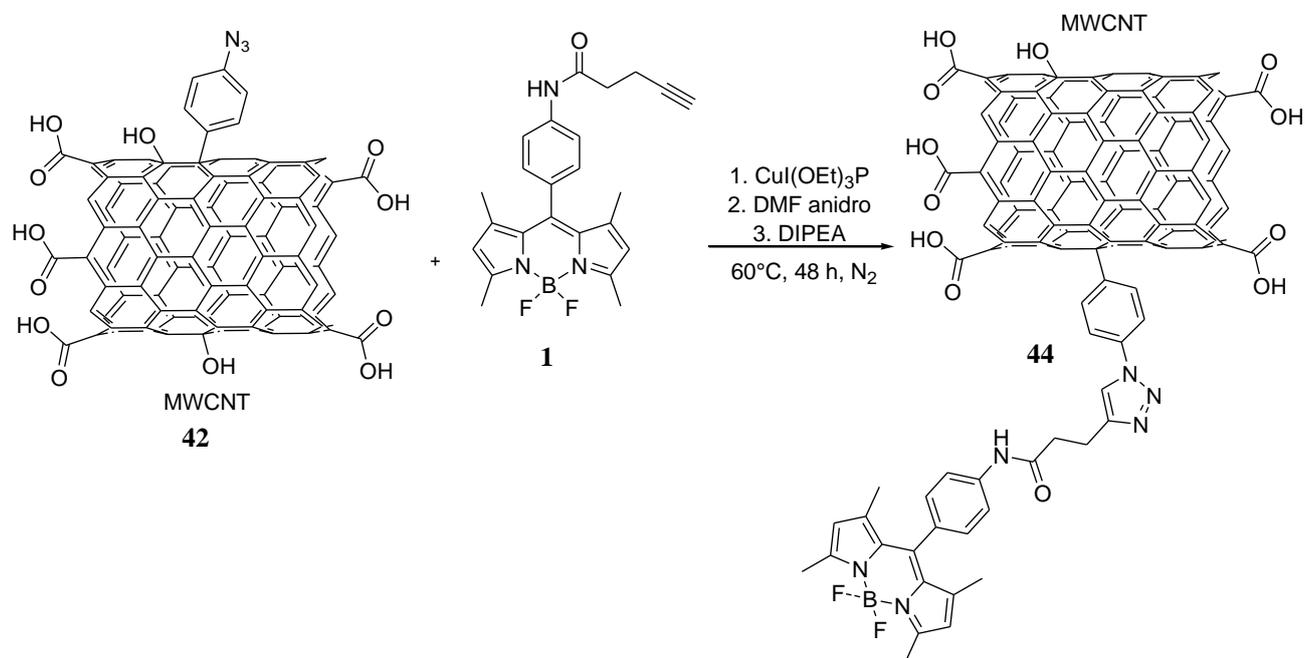
figura 33: spettro Uv-vis e di fluorescenza prodotto 40a (sinistra) e 40b (destra)

Descrizione del lavoro

4.6 Addotti con i nanotubi

4.6.1 Con Bodipy Core

Le reazioni di *click* (*schema 19*) per procedere necessitano di un catalizzatore a base di Cu, nel nostro caso il $\text{CuI}(\text{OEt})_3\text{P}$, ma, nonostante l'uso del catalizzatore, la reazione procede lentamente; i tempi di reazione raggiungono infatti le 48 ore. Una volta terminata la reazione si separano i CNTs dal materiale non reagito. Questa operazione può essere effettuata tramite filtrazione o centrifugazione, la prima richiede tempi di esercizio molto lunghi ed è possibile perdere un po' di prodotto, mentre con le centrifugazioni si riesce ad abbreviare i tempi di lavoro e a limitare le perdite di prodotto. Le centrifugazioni vengono svolte utilizzando come solvente $(i\text{-Pr})_2\text{O}$ dato che è un buon solvente per il Bodipy e il catalizzatore ma non scioglie altrettanto bene i CNTs che si andranno a depositare sul fondo durante la centrifugazione. Si ripetono le centrifugazioni per altre 4 volte, nelle quali si toglie il surnatante e si aggiunge nuovo solvente; si interrompono le centrifugazioni quando si osserva che il surnatante non è più fluorescente, e, quindi, la fluorescenza dei CNTs sarà dovuta esclusivamente al Bodipy legatovi sopra.



Schema 19: sintesi dell'addotto 44

Dallo spettro UV-Vis si può vedere che oltre all'assorbimento di fondo dei CNTs, è presente un picco di assorbimento a 501 nm che corrisponde esattamente al segnale del

Descrizione del lavoro

Bodipy da noi utilizzato (**1**). Per quanto riguarda lo spettro in fluorescenza, registrato eccitando il campione a 488 nm, si osserva un segnale di emissione a 511 nm anche questo presente nello spettro del solo Bodipy (vedi *figura 34*). Le analisi spettroscopiche confermano che il Bodipy si è legato ai CNTs, per cui abbiamo misurato il grado di funzionalizzazione raggiunto attraverso l'analisi ICP del campione andando a quantificare il boro presente. Questo elemento è presente nel campione poiché ogni molecola di Bodipy possiede un atomo di boro. I risultati dell'ICP sono mostrati nella *tabella 6*.

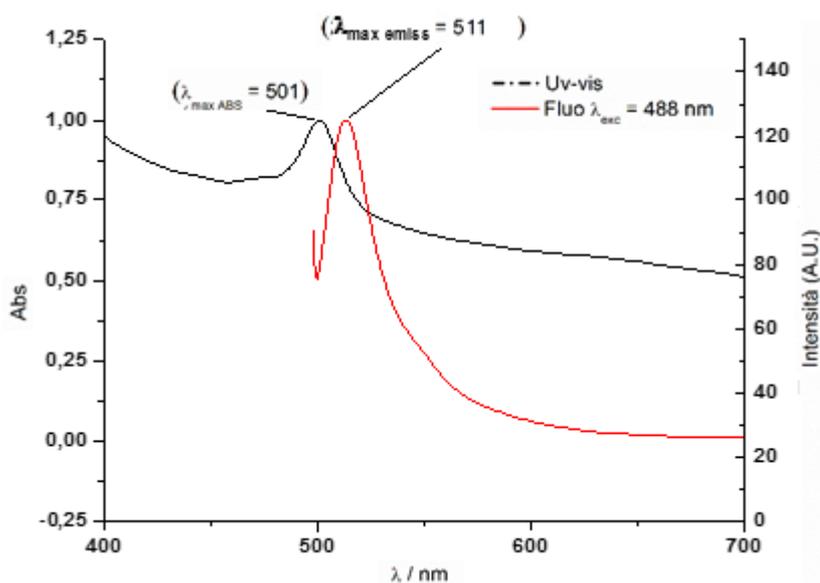


figura 34: spettro di assorbimento Uv-vis e di fluorescenza dell'addotto 44

Composto	Boro (mg/g)	Boro (mmoli/g)	Grado funz. rispetto al C
10	8,246	0,763	1,26%

tabella 6: Risultati analisi ICP prodotto 44

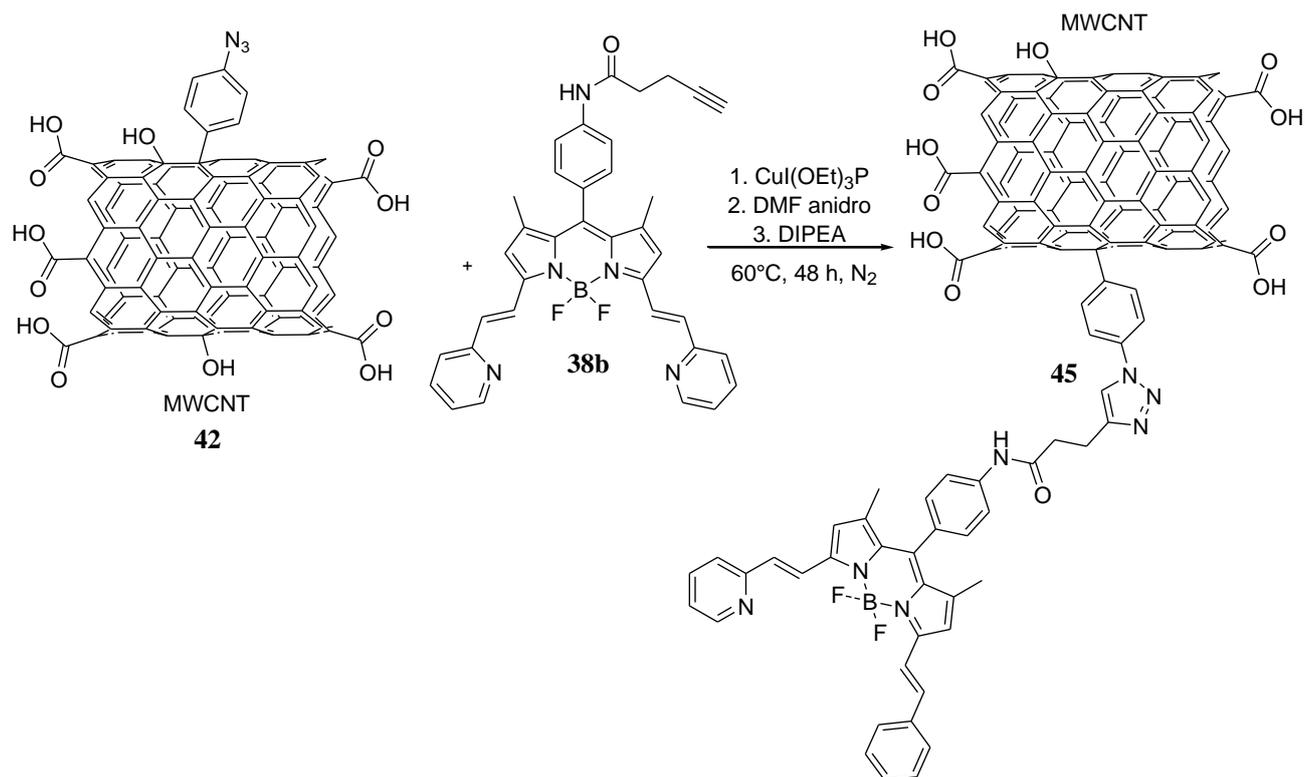
Dall'analisi ICP si ricava che l'1.26% degli atomi di carbonio sono funzionalizzati con molecole di Bodipy.

L'addotto sintetizzato risulta non visibile al microscopio confocale.

4.6.2 Con Bodipy-piridina

Sempre utilizzando la reazione di *click*, abbiamo legato ai CNTs una molecola fluorescente diversa, cioè il Bodipy disostituito (**38b**). I CNTs utilizzati sono gli stessi utilizzati per le reazioni precedenti e anche le condizioni di reazione sono quelle già ottimizzate nelle precedenti reazioni (*schema 20*).

Descrizione del lavoro



Schema 20: sintesi addotto 45

La separazione dei CNTs dal materiale non reagito, è avvenuta attraverso centrifugazione utilizzando come solvente (*i*-Pr)₂O. In questo caso, nonostante si siano fatti 5 cicli di centrifugazioni, il surnatante rimosso dall'ultimo lavaggio mostrava una leggera colorazione rossa se osservato in fluorescenza, mentre nel visibile appare incolore. Date le caratteristiche del Bodipy è possibile che la quantità di Bodipy nelle acque di centrifugazione sia bassa in caso contrario si sarebbe osservato una colorazione blu anche semplicemente osservando le acque di filtrazione alla luce visibile.

Nello spettro UV-Vis di *figura 35* si può osservare la presenza di due picchi, uno a 572 nm e il secondo a 623 nm. Entrambi i segnali appartengono al Bodipy da noi utilizzato (**38b**) nella reazione di *click*. Inoltre paragonando questo spettro con quello del prodotto **44** (CNTs-Bodipy Core) si osserva una maggiore intensità dei picchi il che è dovuto principalmente alla migliore resa quantica di questo Bodipy rispetto al precedente. Questo supporta positivamente la scelta di utilizzare il composto **38b** come sonda fluorescente piuttosto che **1**. Il buon esito della reazione di funzionalizzazione dei CNTs è confermato dallo spettro in fluorescenza; in questo caso si eccita il

Descrizione del lavoro

campione con una radiazione con lunghezza d'onda di 600 nm e si osserva il segnale di emissione a 630 nm, stessa cosa che si osserva nello spettro del solo Bodipy (**38b**).

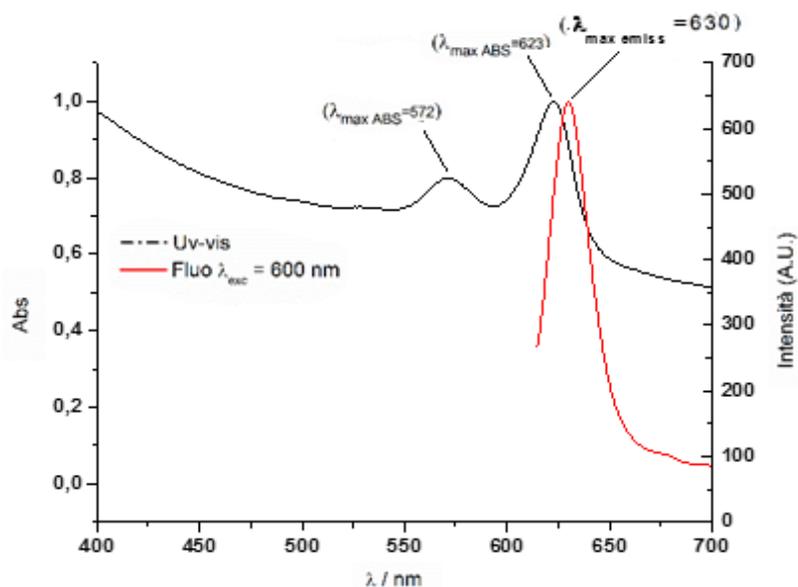


figura 35: spettro Uv-vis e di fluorescenza prodotto 45

4.7 Test biologici e analisi al microscopio confocale

Sintetizzati tutti gli addotti coi nanotubi, abbiamo proceduto alle analisi sia di tipo biologico (citofluorimetria), sia di microscopia ottica (microscopia confocale).

4.7.1 Citofluorimetria

Una volta realizzato il sistema Bodipy-CNT si sono effettuati test biologici *in vitro* per capire se i nanotubi funzionalizzati fossero tossici e se riuscissero ad entrare in cellula. Il campione **44** è stato testato attraverso citofluorimetria ottica. La citofluorimetria consente di determinare le caratteristiche fisiche e chimiche delle cellule mentre fluiscono in un mezzo liquido. I segnali registrati sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I test sono stati effettuati su due diverse linee cellulari:

- MCF-7 cellule derivate da un carcinoma mammario
- DU145 cellule del cancro della prostata.

Descrizione del lavoro

Queste cellule sono state incubate in presenza di 10 µg/ml di nanotubi **44** a 37°C, in atmosfera contenente 5% CO₂, per 3 ore. Poi il terreno è stato rimosso e le cellule lavate 4 volte con 2 ml di PBS (Phosphate Saline Buffer). Le cellule sono state, quindi, tripsinizzate, recuperate per centrifugazione, lavate con PBS, e poi analizzate al citofluorimetro. L'esperimento è stato ottimizzato considerando la fluorescenza in un intervallo che ci permette di sottrarre l'autofluorescenza delle cellule.

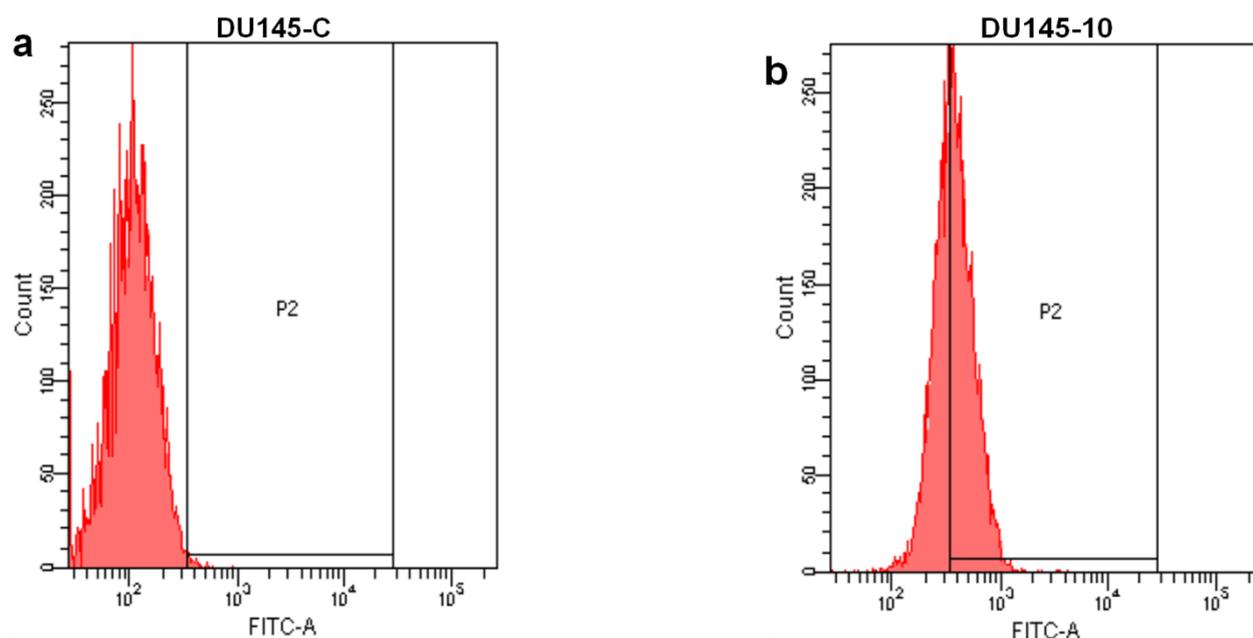


figura 36: citofluorimetria su cellule DU145: (a) Controllo, (b) prodotto 44

Cellule	Prodotto	Controllo	Test A	Test B
DU145	10	0.6%	58.2%	57.9%

tabella 7: risultati test di citofluorimetria

Come si può vedere dalla *figura 36* (immagine a sinistra, “a”) e dalla *tabella 7*, nel range di fluorescenza selezionato (area con la sigla P2) rientra solo lo 0.6% della fluorescenza totale delle cellule. Sempre in *figura 36* (immagine a destra, “b”) invece si osserva che nello stesso intervallo si ha un sensibile aumento della fluorescenza, questo comportamento è dovuto all’incubazione del prodotto **44** con le cellule analizzate. Nello specifico si osserva che il prodotto **44** possiede il 58% della propria fluorescenza all’interno del intervallo considerato. Una volta provato che i due sistemi realizzati entrano in cellula si controlla la loro tossicità attraverso il saggio MTT: questo è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell’attività degli

Descrizione del lavoro

enzimi che riducono l'MTT o bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. L'attività enzimatica è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 595 nm. I test sono eseguiti incubando le cellule con i CNTs per 24 ore, lavate 4 volte con PBS e, a questo punto, si aggiunge la soluzione di MTT a concentrazione di 0.5 mg/mL. Dopo un'ora dall'aggiunta di MTT si lavano le cellule con PBS e si aggiunge DMSO che riesce a lisare le cellule e a solubilizzare i cristalli di formazano generati dalle cellule sopravvissute.

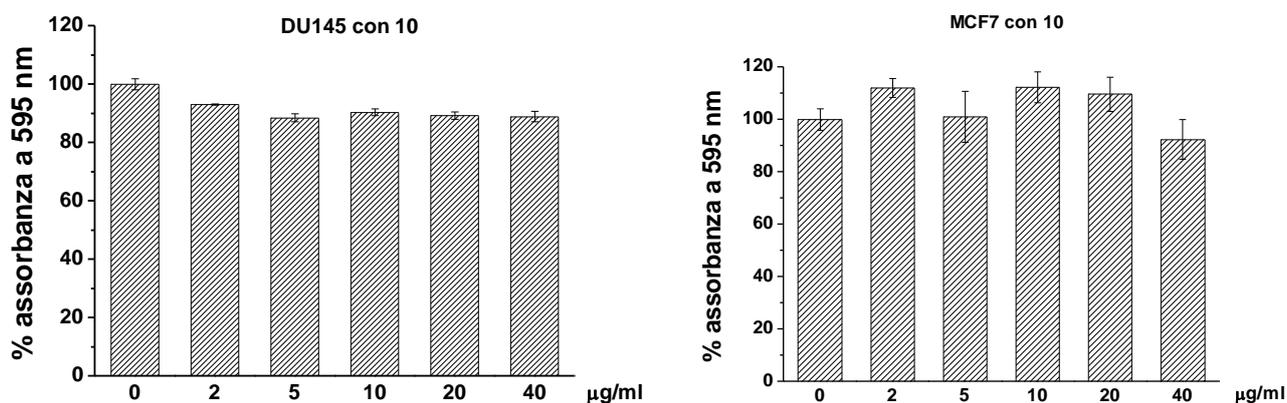


figura 37: test di tossicità di 44 su DU145 e MCF7

I test su entrambe le linee cellulari mostrano che il sistema realizzato non è tossico, a meno di una leggera tossicità osservabile solo a concentrazioni particolarmente elevate (40µg/mL). Attraverso il test di tossicità e la citofluorimetria si è riusciti a dimostrare che il sistema realizzato riesce ad entrare in cellula e, allo stesso tempo, non è tossico. Il passo successivo è stato valutare il grado di internalizzazione dei nanotubi. Si è incubato il sistema Bodipy-CNT con cellule MCF-7 per 24 ore, dopo di che le cellule sono state contate con un'apposita strumentazione e, successivamente, analizzate attraverso analisi elementare, andando a misurare la quantità di boro presente. Quantificando tale elemento è possibile risalire alla concentrazione dei CNTs all'interno delle cellule. I risultati dell'analisi elementare sono mostrati in *tabella 8*.

Descrizione del lavoro

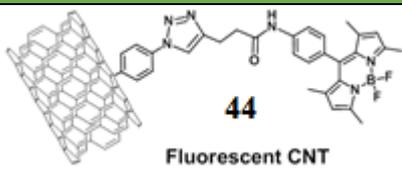
Grado di internalizzazione (basato sul Boro)		
	mg B/cell	mg CNT/cell
 <p>44 Fluorescent CNT</p>	3,5 E-11	4,3 E-09

tabella 8: Grado di internalizzazione di 44

4.7.2 Microscopia confocale

All'analisi al microscopio confocale si sono utilizzati i derivati, sia monosostituito che disostituito, del Bodipy con la piridin-2-carbossialdeide (**38a** e **38b**).

Prima di osservare i CNTs in cellula abbiamo incubato con cellule MCF-7 una quantità crescente del prodotto **45** e **44**, e, successivamente, abbiamo catturato le immagini delle cellule (vedi *figure 38 e 39*).

Dalle immagini si può chiaramente vedere che i CNTs da noi realizzati riescono a penetrare all'interno delle cellule, dato che queste sono fluorescenti. Inoltre si nota una dipendenza diretta tra la fluorescenza mostrata dalle cellule e la concentrazione dei CNTs incubati, dato che utilizzando una quantità inferiore di CNTs anche la fluorescenza decresce. Dall'analisi al microscopio confocale si può capire dove si accumulano i CNTs una volta entrati in cellula: guardando la fluorescenza dei CNTs si può vedere che questi tendono ad accumularsi nel citoplasma e che, quindi, non riescono ad attraversare la barriera nucleare. Per cui possiamo concludere che la nuova sonda fluorescente utilizzata permette l'osservazione dei CNTs all'interno delle cellule utilizzando il microscopio confocale.

Descrizione del lavoro

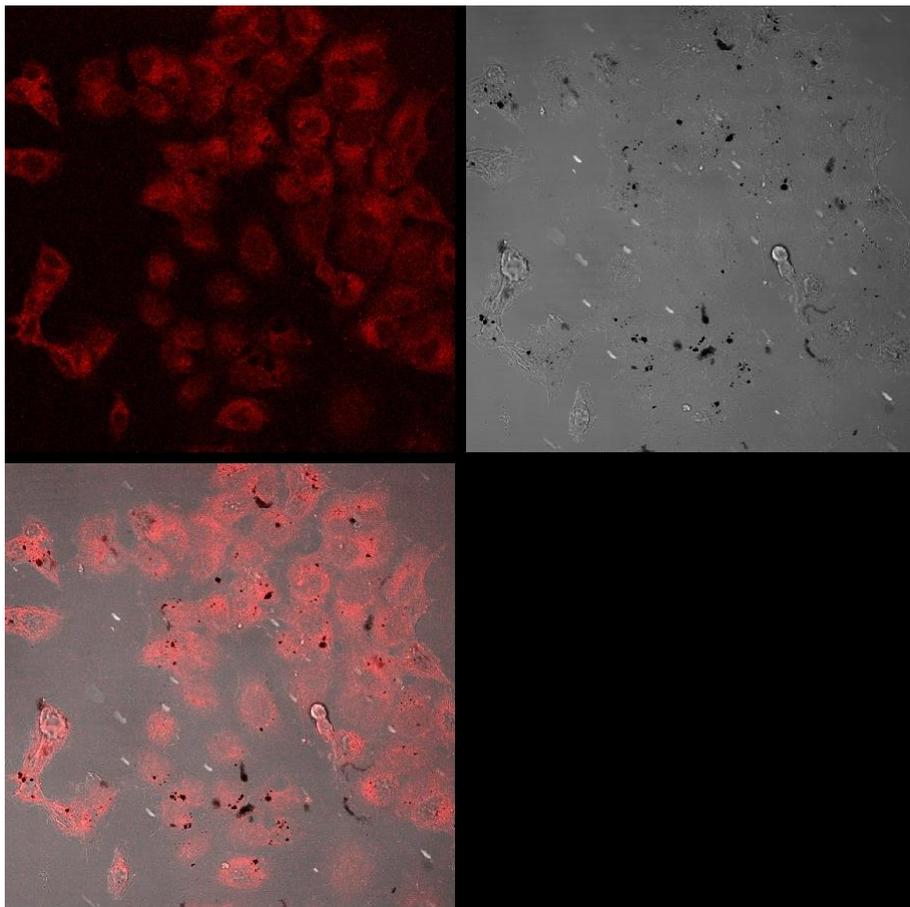


figura 38: Analisi al microscopio confocale di cellule MCF-7 dopo 24 ore di incubazione con 10 µg/ml di MWCNTs 45

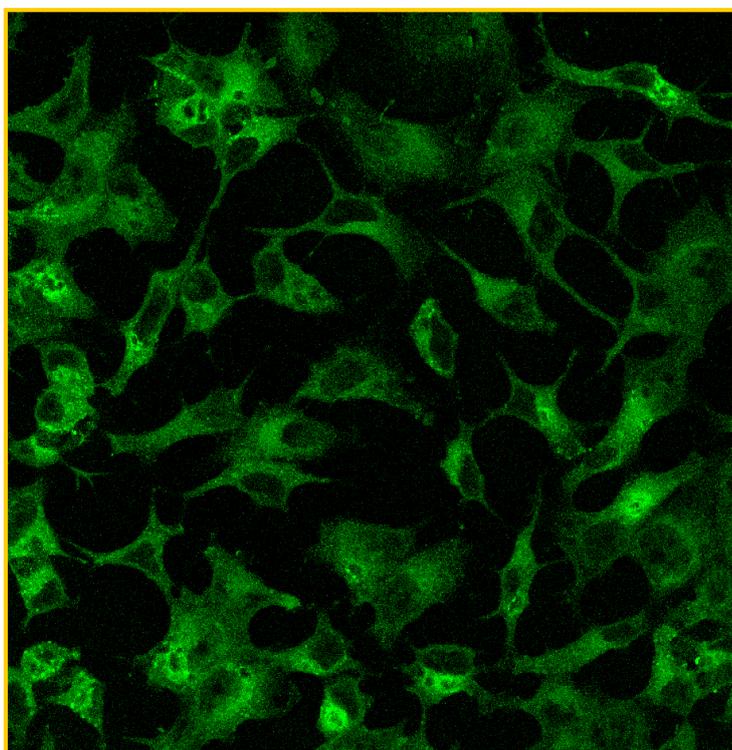


figura 39: Analisi al microscopio confocale di cellule MCF-7 dopo 24 ore di incubazione con 20 µg/ml di MWCNTs 44

Conclusioni

5 Conclusioni

Il nostro lavoro ha prodotto, inizialmente, una serie di derivati Bodipy, funzionalizzati tramite reazione di *Knoevenagel*; questa classe di composti sintetizzati si è dimostrata compatibile con gli obiettivi da noi prefissati dal punto di vista spettrofotometrico, avendo i massimi di assorbimento Uv-vis nel range di lunghezze d'onda utili alla successiva analisi al microscopio confocale; inoltre le loro proprietà d'emissione di fluorescenza sono coerenti con ciò che volevamo, ovvero intensità elevata di fluorescenza e lunghezze d'onda di emissione tendenti al vis/NIR. Queste proprietà conferiscono alla classe di molecole sintetizzate l'utilizzabilità nella funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio, seconda parte del nostro lavoro. La funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio è avvenuta mediante reazione di *click chemistry*. Questi CNTs funzionalizzati hanno dimostrato di avere proprietà spettrofotometriche adeguate ai test biologici *in vitro* e alle analisi al microscopio confocale, effettuati successivamente, confermando che la classe di composti fluorescenti da noi preparati è stata, almeno parzialmente, un successo (in quanto non tutte le sonde fluorescenti da noi preparate sono state testate). I test biologici *in vitro* e le analisi al microscopio confocale, effettuate sui nanotubi funzionalizzati, hanno dato esito positivo, in quanto hanno confermato l'effettiva fluorescenza dei nanotubi stessi (in virtù proprio delle sonde ad essi legati) e la loro internalizzazione nelle cellule.

6 Sviluppi futuri

In base al nostro lavoro e alle ricerche effettuate in letteratura, si possono determinare tre aree di sviluppo:

- I. Ottimizzazione della sintesi del Bodipy Core e dei suoi derivati al fine di ottenere rese più elevate con processi di sintesi meno lunghi e laboriosi;**

- II. Sviluppo di nuove sonde fluorescenti e nuove funzionalizzazioni dei nanotubi al fine di ottenere sonde e nanotubi con una risposta spettrofotometrica migliore;**

- III. L'uso della classe di composti Bodipy (e suoi derivati) come *photosensitizers* nella terapia *fotodinamica* (PTD), grazie alle caratteristiche note ed esplorate della classe di molecole Bodipy**

7 Parte sperimentale

7.1 Reagenti e strumentazione

I reagenti utilizzati di cui non è riportata la sintesi sono commercialmente disponibili (Aldrich, Fluka) e, se non specificato, sono stati impiegati senza ulteriore purificazione.

I valori di R_f sono riferiti a TLC su lastre di alluminio di gel di silice di spessore 0.25 mm (Merck F254).

Gli spettri NMR sono stati acquisiti con una strumentazione Varian Gemini 200MHz o Varian Mercury 400MHz, utilizzando vari solventi deuterati ($CDCl_3$, CD_3OD). I valori di chemical shift sono espressi in δ (ppm) rispetto al riferimento tetrametilsilano (TMS). Le notazioni s, d, t, dd, pd, pt, m, bs (riferite alla molteplicità del segnale) indicano rispettivamente:

singoletto, doppietto, tripletto, doppietto di doppietti, pseudodoppietto, pseudotripletto, multipletto e segnale allargato (broad signal).

Gli spettri di massa ESI sono stati acquisiti con una strumentazione LCQ-Fleet Thermo Scientific Electron Spray Ionization. Se non specificato tutti gli spettri sono stati registrati con campioni aventi concentrazioni tra 10^{-4} M e 10^{-5} M in HPLC grade MeOH del composto sottoposto all'analisi.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR 881. Le frequenze di assorbimento sono espresse in numero d'onda ω (cm^{-1}). Le notazioni w, m, s (riferite all'intensità di banda) indicano rispettivamente debole, media, forte.

Gli spettri UV-Visibile sono stati acquisiti con una strumentazione Varian Cary 4000 Uv-vis impiegando cuvette dallo spessore di 1 cm.

Gli spettri di Fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro FP750 distribuito dalla Jasco, impiegando cuvette dello spessore di 1 cm.

Le misure di analisi termogravimetrica (TGA) sono state effettuate con un analizzatore termogravimetrico EXSTAR (TG/DTA) Seiko 6200 sotto atmosfera di N_2 (50 mL/min) accoppiato con un ThermoStarTM GSD 301 T (TGA-MS) per analisi MS in fase gassosa di specie volatili.

Parte sperimentale

Le analisi elementari sono state eseguite con un analizzatore Perkin-Elmer 240.

7.2 Acronimi e formule utilizzate

DCM: diclorometano,

TFA: acido trifluoroacetico,

NaOH: idrossido di sodio,

Na₂SO₄: solfato di sodio,

MeOH: metanolo,

TEA: trietilammina,

BF₃ · OEt₂: trifluoruro di boro dietil eterato,

Na₂CO₃: carbonato di sodio,

NaHCO₃: idrogenocarbonato di sodio,

DIPEA: diisopropiletilammina,

(*i*-Pr)₂O : isopropiletere

DMF: N,N-dimetilformammide,

DMAP: 4-dimetilamminopiridina,

DCC: N,N'-dicicloesilcarbodiimmide,

AcOEt: acetato di etile,

Et.P.: etere di petrolio,

Et₂O: etere etilico,

CH₃CN: acetonitrile,

BRINE: soluzione satura di NaCl,

CDCl₃: cloroformio deuterato,

DMSO: dimetilsolfossido,

Parte sperimentale

CD₃OD: metanolo deuterato,

r.t.: temperatura ambiente,

TLC: Thin Layer Chromatography,

ppm: parts per milion,

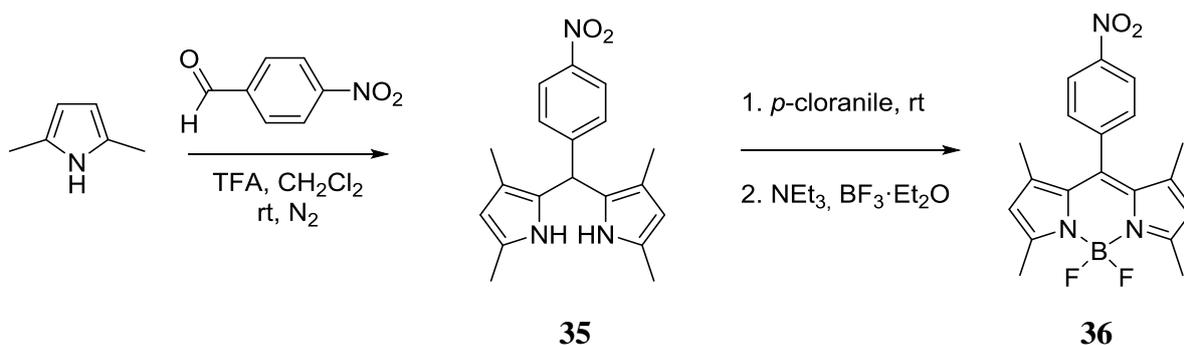
N₂: flusso di azoto,

ESI: Electron Ionization Spray,

RPM: Round Per Minute (giri al minuto),

7.3 Sintesi effettuate

7.3.1 Sintesi del composto 8-(4-nitrofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (36)

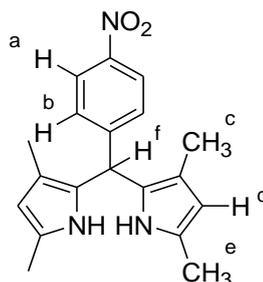


Composto 35

2,4-dimetilpirrolo (1.3 mL, 12.4 mmol, 2 eq.) viene disciolto in DCM (600 mL) con 4-nitrobenzaldeide (0.935 g, 6.2 mmol, 1 eq.) e acido trifluoroacetico (90 μ L, 1.2 mmol, 0.2 eq.). La reazione avviene sotto agitazione magnetica, in atmosfera di azoto e a temperatura ambiente per 2 ore. Successivamente la fase organica viene trattata con una soluzione di Na₂CO₃ saturo (2 x 100ml). Dopo il primo lavaggio si nota un intenso schiarimento della fase organica passando da un colore giallo mielato ad un colore giallo acceso. La fase organica viene poi trattata con BRINE (100 mL), anidrificata su Na₂SO₄ anidro e filtrata su cotone. Si evapora il solvente e si essicca sotto vuoto. Si ottiene il prodotto **35** senza ulteriore purificazione come un solido scaglioso di colore ambrato (2.09 g, resa quantitativa). Il prodotto è utilizzato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

- ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm): 8.14 (Parte **AA'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_a); 7.36 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_b); 5.76 (s, 2H, H_d); 5.58 (s, 1H, H_f); 2.21 (s, 6H, H_e); 1.87 (s, 6H, H_c) (vedi *figura 40*);

figura 40



Parte sperimentale

- formula bruta : C₁₉H₂₁N₃O₂; peso molecolare : 323.36 g/mol.

Composto 36

Si scioglie il composto **35** in DCM (50mL), si lascia agitare in atmosfera di N₂ per qualche minuto, si aggiunge *p*-cloranile (1.522 g, 6.19 mmol, 1 eq.). Dopo 15-20 minuti, si aggiunge la TEA (4 mL, 0.03 mmol) e, dopo altri 15-20 minuti, il BF₃ · OEt₂ (2.5 mL, 0.02 mmol). La reazione viene monitorata via TLC (silice, DCM/Et.P. 1:1). Dopo 2 ore si osserva la comparsa del prodotto (R_f = 0.30, macchia di colore arancio). Si procede alla separazione tramite aggiunta di 150 mL di H₂O; il risultato è un liquido nero abbastanza viscoso da cui risulta molto difficile separare le due fasi (organica e acquosa). Si procede all'aggiunta di ulteriori 400 mL di H₂O seguiti da 200 mL di DCM; le due fasi rimangono molto difficili da separare per cui procediamo trasportando tutto in imbuto più grande (2L) e all'aggiunta di ulteriori 800 mL di H₂O. La fase organica viene filtrata su buchner e, successivamente, continuata a diluire e separare tramite aggiunte di 50 mL di DCM. La fase organica viene lavata quindi con BRINE (800 mL) per eliminare i sali della TEA ma il risultato ottenuto è nuovamente una fase omogenea, difficilmente separabile; si procede, quindi, a lasciar riposare la soluzione suddetta per circa 2 ore; quindi si eseguono successive aggiunte ed estrazioni con circa 50 mL di DCM. La fase organica ottenuta viene ulteriormente rilavata con 1.2 L di BRINE e successivamente anidrificata su Na₂SO₄ anidro, quindi filtrata su cotone. Si evapora il solvente e si essicca sotto vuoto. Il prodotto viene purificato tramite cromatografia flash, eluente iniziale DCM/Et.P. 2:5, poi DCM/Et.P. 5:11. Il prodotto è raccolto nella prima frazione e, in parte, in una seconda. Via ¹H-NMR si osserva della "sporczia" nella seconda frazione, mentre la prima presenta soltanto il prodotto. Il solvente viene evaporato e il prodotto è seccato sotto vuoto (75 mg, resa 3.27%).

- ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ(ppm): 8.39 (Parte **AA'** di un sistema **AA'-BB'**, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_a); 7.54 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_b); 6.02 (s, 2H, H_d); 2.56 (s, 6H, H_c); 1.36 (s, 6H, H_e) (vedi *figura 41*);

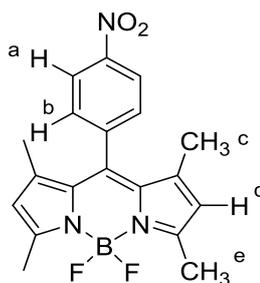
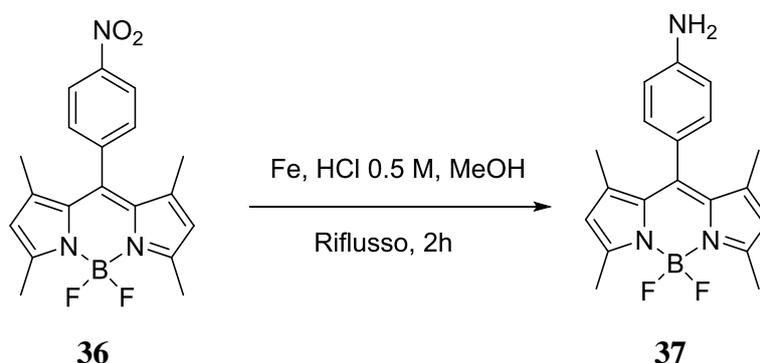


figura 41

Parte sperimentale

- Formula bruta : C₁₉H₁₈BF₂N₃O₂; peso molecolare : 371.43 g/mol

7.3.2 Sintesi del composto 8-(4-amminofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a,-diazas-indacene (37)



Si solubilizza il prodotto **36** (75 mg, 0.2 mmol) in MeOH (3.1 mL), si aggiunge H₂O (1.25 mL) e polvere di Fe (184.9 mg, 3.31 mmol), si scalda la miscela fino alla temperatura di riflusso (~ 80 °C). Si aggiunge HCl 0.5 M in MeOH (0.41 mL di HCl al 37% in 10 mL di MeOH) e si lascia a riflusso per 2 h. Si filtra su cotone la miscela per eliminare il Fe residuo. Si evapora il solvente e risciolge il prodotto di reazione in DCM. Si lava la fase organica con una soluzione di Na₂CO₃ 0.2 M (3x100 mL) e con BRINE (2x80 mL). Si evapora il solvente e si anidifica con Na₂SO₄ anidro e si essicca il prodotto sotto vuoto. Il prodotto viene ottenuto senza ulteriore purificazione (74 mg, resa quantitativa).

- ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ(ppm): 7.00 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, J = 8.8 Hz, 2H, H_b); 6.77 (Parte **AA'** di un sistema **AA'-BB'**, J = 8.8 Hz, 2H, H_a); 5.96 (s, 2H, H_d); 2.54 (s, 6H, H_e); 1.49 (s, 6H, H_c) (vedi *figura 42*).

Parte sperimentale

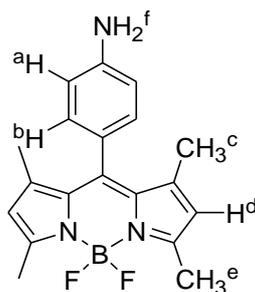
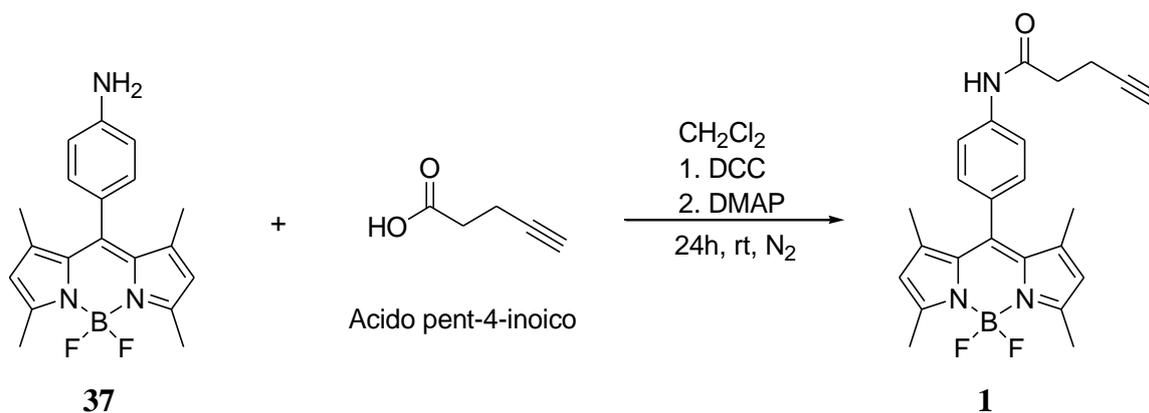


figura 42

- Formula bruta : $C_{19}H_{20}BF_2N_3$; peso molecolare : 339.19 g/mol

7.3.3 Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a,-diazas-indacene (1)



Si solubilizza il prodotto **37** (163 mg, 0.5 mmol, 1 eq.) in DMC anidro (10 mL) e si prepara una soluzione 0.3 M di DCC in DMC anidro (154.8 mg, 0.75 mmol, 1.55 eq. di DCC in 2.5 mL di DMC anidro). A quest'ultima soluzione si aggiunge l'acido pent-4-inoico (47 mg, 0.5 mmol, 1 eq.). Si introduce la soluzione di DCC in quella contenente il prodotto **37**; si aggiunge una quantità catalitica di DMAP (10-20%, 6.1 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq.) quindi a temperatura ambiente si lascia sotto agitazione per 24 h. Si esegue una TLC di controllo (silice, DMC, $R_f = 0.30$, macchia color arancio) a reazione terminata. Si solubilizza tramite Ac.OEt e si eseguono i seguenti lavaggi: H_2O demi (2x50 mL); HCl 0.5 M (2x50 mL); $NaHCO_3$ sat. (2x40mL); infine BRINE (2x50 mL). Sulle acque di recupero dei lavaggi con H_2O e HCl si eseguono degli ulteriori lavaggi con Na_2CO_3 sat. (1x80 mL) e BRINE (2x60 mL) prima di riunirle alla frazione principale. Si anidrifica con Na_2SO_4 . Si evapora il solvente e si secca sotto vuoto. Il prodotto viene ottenuto senza ulteriore purificazione (261 mg, resa

Parte sperimentale

95.4%). Si esegue uno spettro $^1\text{H-NMR}$ sul grezzo per determinare la presenza dei segnali significativi come i metili pirrolidin-terminali e l'idrogeno alchिनico.

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 7.67 (Parte **AA'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_a); 7.21 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_b); 5.97 (s, 2H, H_d); 2.63 (s, 4H, $\text{H}_f + \text{H}_g$); 2.54 (s, 6H, H_e); 2.08 (s, 1H, H_h); 1.41 (s, 6H, H_c) (vedi **figura 43**).

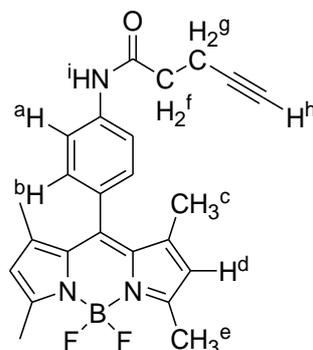


Figura 43

- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 169.4, 155.4, 143.1, 141.2, 138.7, 131.6, 130.6, 128.7, 121.7, 120.0, 82.8, 69.8, 53.4, 49.3, 36.3, 33.9, 25.5, 24.9, 14.6
- **UV-Vis** (DMF), $\lambda_{\text{MAX ABS}}$ (nm): 362, 501; **Fluorescenza** (DMF), $\lambda_{\text{MAX EMISS}}$ (nm): 511 (vedi **figura 44**);

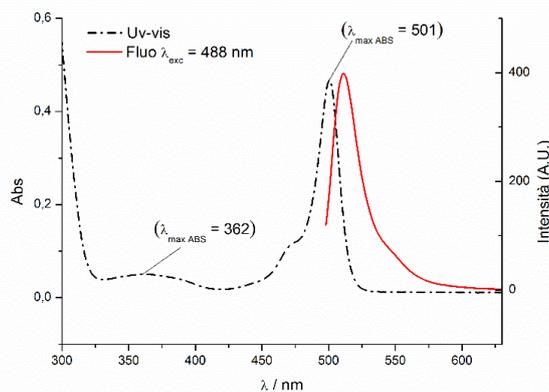
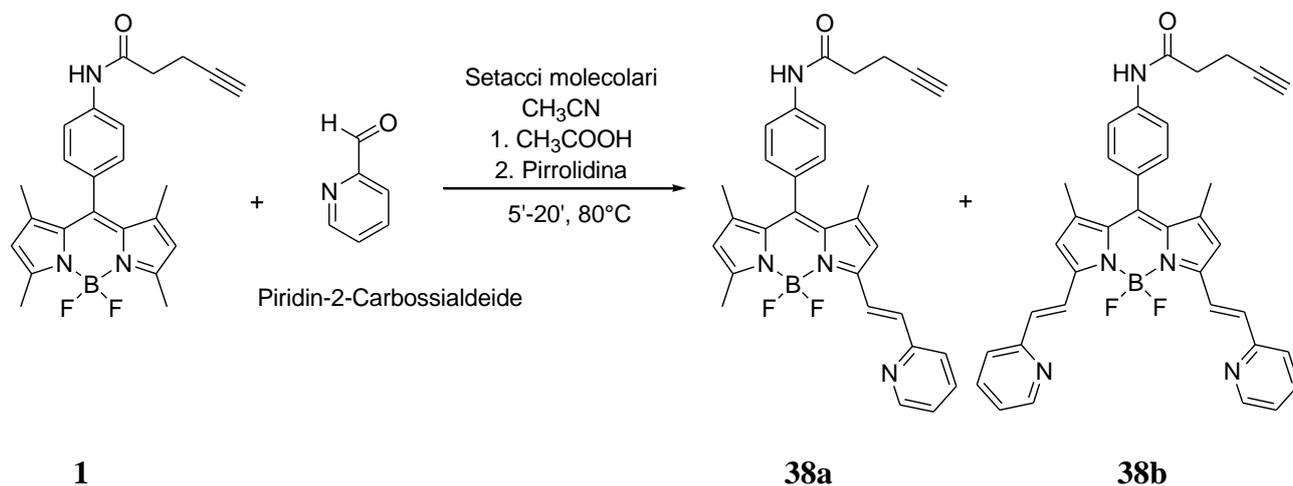


figura 44: Spettro Uv-vis e di fluorescenza del prodotto 1

- **IR** (KBr) $\text{wn}(\text{cm}^{-1})$: 3392, 3325, 3282, 2925, 2850, 1697, 1627, 1595, 1547, 1527, 1508, 1467, 1404, 1367;
- **Formula bruta** : $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$; **peso molecolare** : 419.28 g/mol

Parte sperimentale

7.3.4 Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(piridin-2-il)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (38)



Si attivano i settacci molecolari (circa 20) e si solubilizza il prodotto **1** (46 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) in CH_3CN anidro (3 mL); si scalda il bagno ad olio fino a 80°C . Si aggiunge quindi nell'ordine CH_3COOH (36 μL , 0.62 mmol, 6 eq.), Pirrolidina (52 μL , 0.62 mmol, 6 eq.), Piridin-2-Carbossilaldeide (15 mg, 13 μL , 0.14 mmol, 1.3 eq.). Si lascia sotto agitazione per 5'-20' eseguendo TLC di controllo ogni 3'-4' (Allumina, eluente DCM, macchie di colore rosa, **38a**, $R_f = 0.48$, e blu scuro, **38b**, $R_f = 0.34$). Si nota un graduale viraggio dal rosso mattone al porpora per finire al blu. Si solubilizza con Ac.OEt (soluzione che assume una colorazione rosso scuro) e si eseguono i lavaggi con NaHCO_3 sat (3x40 mL), H_2O Milli-q (2x30 mL), BRINE (2x50 mL). Si anidrifca con Na_2SO_4 , si evapora il solvente e si porta a secco sotto vuoto. Si procede ad una purificazione tramite cromatografia flash (Al_2O_3 Brockmann III, eluente iniziale DMC/Et.P 5:2, poi DCM/Et.P 7:2, DCM/Et.P 10:1, DCM/MeOH 10:1); i prodotti sono raccolti in due frazioni, la prima con il prodotto **1** non reagito e la seconda con i prodotti **38a** e **38b**. Si esegue una seconda cromatografia flash solo sulla seconda frazione (**38a**, **38b**) (Silice, eluente iniziale Et.P/Ac.OEt 5:4 + 1% NEt_3 , poi Et.P/Ac.OEt 1:1 + 1% NEt_3 , Et.P/Ac.OEt 4:5 + 1% NEt_3 , Et.P/Ac.OEt 2:3 + 1% NEt_3); si raccoglie il prodotto **38a** nella prima frazione e il prodotto **38b** in una seconda. Si evapora il solvente e si portano a secco sotto vuoto tutte e tre le frazioni (prodotto **38a**, 6.1 mg, 0.01 mmol, resa 10%; prodotto **38b**, 10 mg, 0.02 mmol, resa 20%; prodotto **1**, 15 mg, 0.04 mmol). Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **38a** risulta molto sporco e di difficile interpretazione, mentre quello del prodotto **38b** e **1** risulta molto pulito. Si procede anche ad eseguire lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ e g-COSY del prodotto **38b**. La frazione

Parte sperimentale

contenente il prodotto **38a** viene ulteriormente purificata in mini colonna cromatografica con esito negativo in quanto il successivo spettro $^1\text{H-NMR}$ risulta altrettanto non intelligibile.

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.64 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, H_i); 8.05 (d, $J = 16.4$ Hz, 2H, H_e); 7.70 (m, 6H, $\text{H}_a + \text{H}_g + \text{H}_h$); 7.34 (d, $J = 16.4$ Hz, 2H, H_f); 7.21 (m, 4H, $\text{H}_b + \text{H}_i$); 6.66 (s, 2H, H_d); 2.64 (m, 4H, $\text{H}_m + \text{H}_n$); 2.07 (s, 1H, H_o); 1.48 (s, 6H, H_c) (vedi **figura 45**).

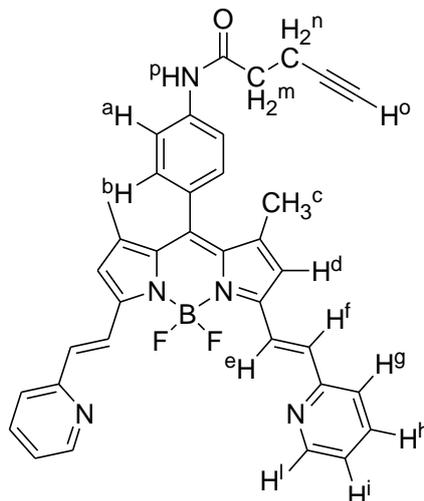


figura 45

- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 169.5, 155.1, 152.2, 149.9, 142.7, 139.9, 139.0, 136.4, 135.9, 134.1, 130.2, 128.9, 122.8, 122.1, 120.0, 118.6, 82.8, 69.7, 36.2, 29.7, 14.9, 14.5
- **UV-Vis** (DMF), $\lambda_{\text{MAX ABS}}$ (nm): 349, 500, 572, 623; **Fluorescenza** (DMF), $\lambda_{\text{MAX EMISS}}$ (nm): 629 (vedi **figura 46**);

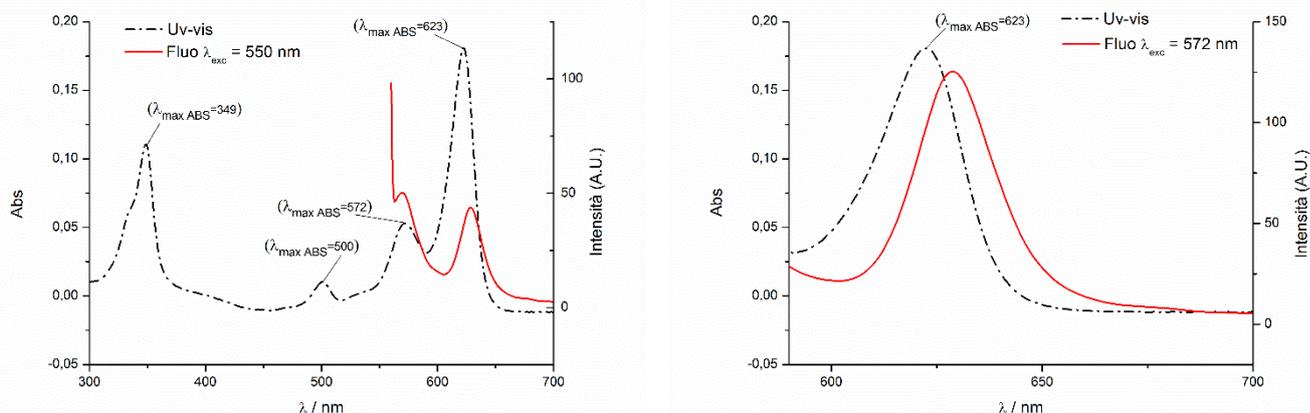
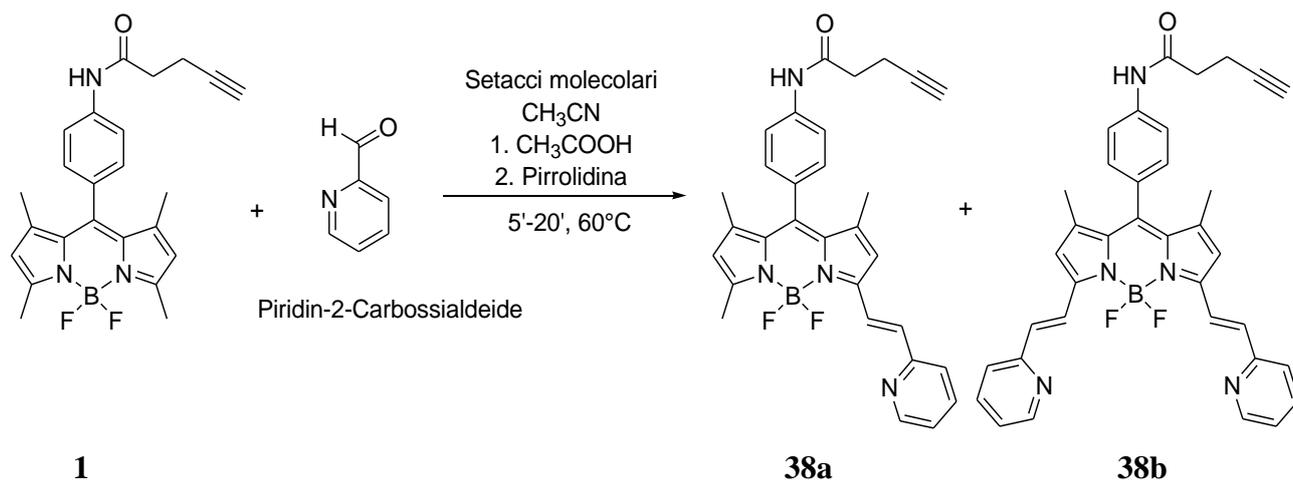


figura 46: spettri Uv-vis e di fluorescenza del composto 38b

- **Formula bruta** : $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}$ (**38b**), $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}$ (**38a**); **peso molecolare** : 599.50 g/mol (**38b**), 510.40 g/mol (**38a**)

7.3.5 Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(piridin-2-il)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (38)



Si attivano i settacci molecolari (circa 20) e si solubilizza il prodotto **1** (30 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) in CH_3CN anidro (6 mL); si scalda il bagno ad olio fino a 60°C . Si aggiunge quindi nell'ordine CH_3COOH (25 μL , 0.43 mmol, 6 eq.), Pirrolidina (36 μL , 0.43 mmol, 6 eq.), Piridin-2-Carbossialdeide (7 mg, 6.2 μL , 0.06 mmol, 0.9 eq.). Si lascia sotto agitazione per 15' eseguendo TLC di controllo ogni 5' (Silice, Et.P/Ac.OEt 1:1, macchie di colore rosa, **38a**, $R_f = 0.24$, e blu scuro, **38b**, $R_f = 0.08$). Si nota un graduale viraggio dal rosso mattone al porpora per finire al blu. Si solubilizza con Ac.OEt (soluzione che assume una colorazione rosso scuro) e si eseguono i lavaggi con H_2O Milli-q (2x30 mL), NaHCO_3 sat (3x40 mL), Na_2CO_3 sat. (2x40 mL), BRINE (2x50 mL). Si anidrifica con Na_2SO_4 , si evapora il solvente e si porta a secco sotto vuoto. Si procede ad una purificazione tramite cromatografia flash (Al_2O_3 brockmann III, eluente iniziale Et.P/Ac.OEt 2:1, poi Et.P/Ac.OEt 3:2, Et.P/Ac.OEt 5:4); i prodotti sono raccolti in tre frazioni, la prima con il prodotto **1** non reagito, la seconda con il prodotto **38a** e la terza con il prodotto **38b**. Si evapora il solvente e si portano a secco sotto vuoto tutte e tre le frazioni (prodotto **38a**, 1.7 mg, 0.003 mmol, resa 4.3%; prodotto **38b**, 3.7 mg, 0.006 mmol, resa 8.6%; prodotto **1**, 13.7 mg, 0.033 mmol, resa 47.1%). Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **38a** risulta sporco e di non facile interpretazione, mentre lo spettro del prodotto **38b** non è determinante.

- $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.59 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H_1); 8.01 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H,

Parte sperimentale

H_e); 7.88 (m, 2H, H_g + H_h); 7.74 (Parte AA' di un sistema AA'-BB', J = 8 Hz, 2H, H_a); 7.55 (d, J = 16.4 Hz, 1H, H_f); 7.33 (t, J = 8 Hz, 1H, H_i); 7.23 (Parte BB' di un sistema AA'-BB', J = 8.4 Hz, 2H, H_b); 6.73 (s, 1H, H_d); 6.07 (s, 1H, H_r); 2.66 (s, 4H, H_m + H_n); 2.60 (s, 3H, H_s); 2.09 (s, 1H, H_o); 1.46 (s, 6H, H_c + H_q) (vedi *figura 47*).

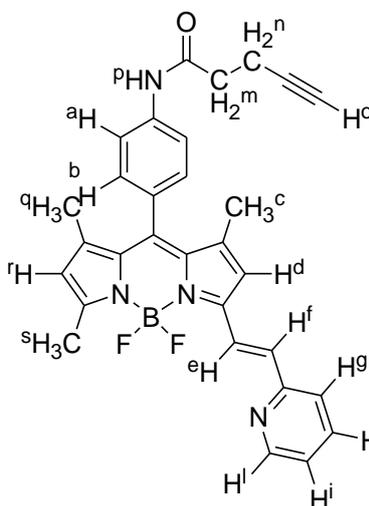


figura 47

- **UV-Vis** (DMF), $\lambda_{\text{MAX ABS}}$ (nm): 323, 521, 559; **Fluorescenza** (DMF), $\lambda_{\text{MAX EMISS}}$ (nm): 566 (vedi *figura 48*);

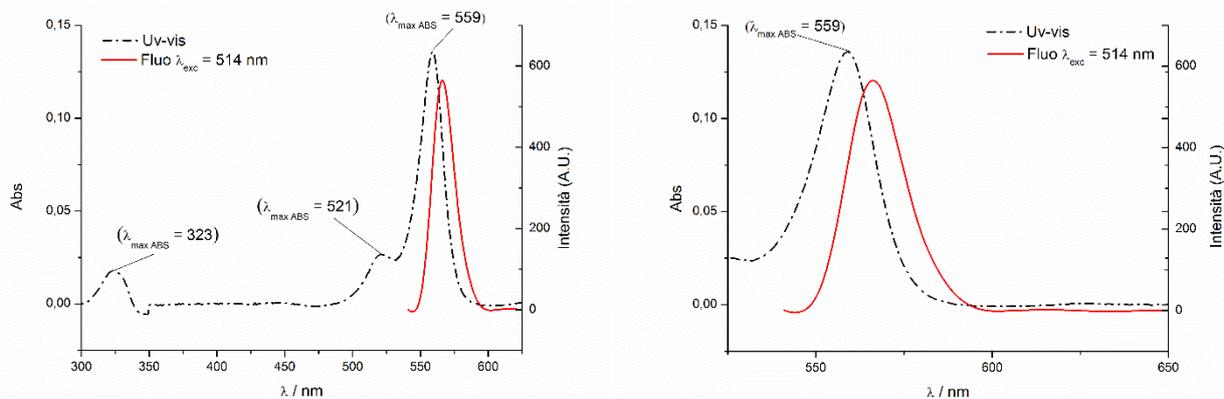
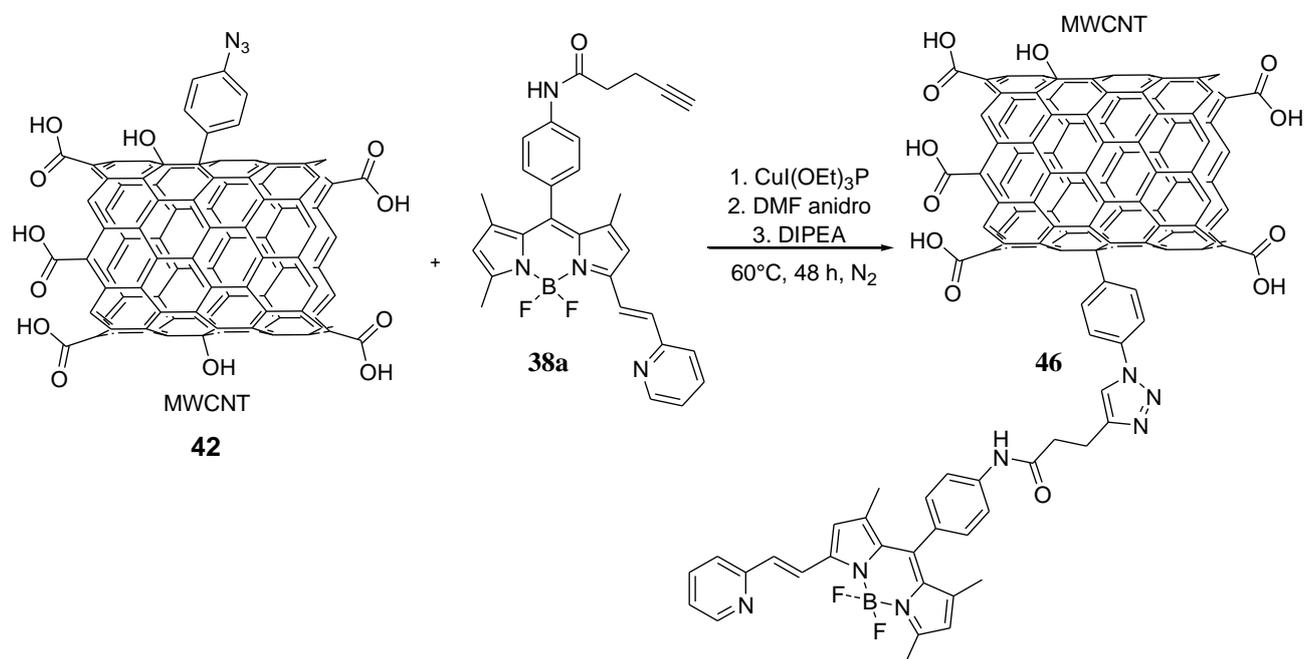


figura 48: spettri Uv-vis e di fluorescenza del composto 38a

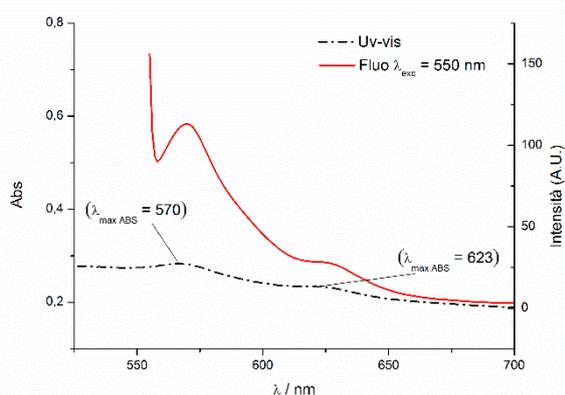
7.3.6 Sintesi dell'addotto 46



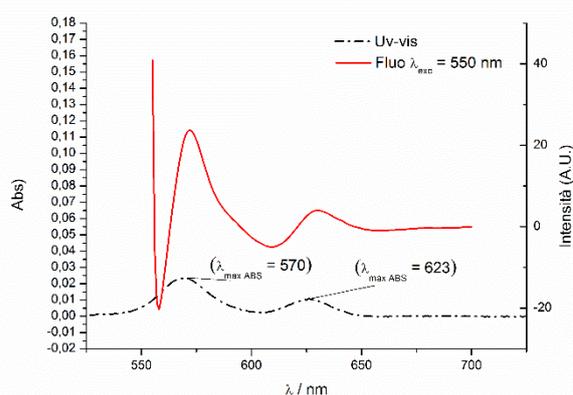
Si scalda il bagno d'olio a 60°C . In provetta si aggiunge il composto **42** (1.75 mg), il prodotto **38a** (1.70 mg, $3.3 \cdot 10^{-3}$ mmol, 1 eq.), $\text{CuI}(\text{OEt})_3\text{P}$ (1 mg, $2.8 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0.2 eq.), DMF anidro (2 mL). Si procede a sonicazione per 5', quindi si aggiunge DIPEA (4.3 mg, $3 \cdot 10^{-2}$ mmol, 5.8 μL , 2.9 eq.). Dopo 24 h si ferma l'agitazione e si sonica per 5', quindi si ripone in bagno ad olio come in precedenza. Al termine delle 48 h si trasferisce tutto in provetta da centrifuga e si esegue un primo lavaggio con $(i\text{-Pr})_2\text{O}$ (1x10 mL); si osserva la formazione di un precipitato. Si sonica per 5' e si centrifuga per 5' a 1400 rpm. Si ha precipitazione. Quindi si procede ad estrazione del surnatante tramite pasteur. Si ridisperde quindi in $(i\text{-Pr})_2\text{O}$ (10 mL). Si ripete la precedente procedura per quattro volte. Si dissolve, quindi, in acetone e si porta a secco il prodotto **46** (1.5 mg). Si eseguono gli spettri Uv-vis e di fluorimetria.

- UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MAX ABS}}$ (nm): 570, 623; Fluorescenza (DMF), $\lambda_{\text{MAX EMISS}}$ (nm): 572, 631 (vedi *figura 48*);

Parte sperimentale



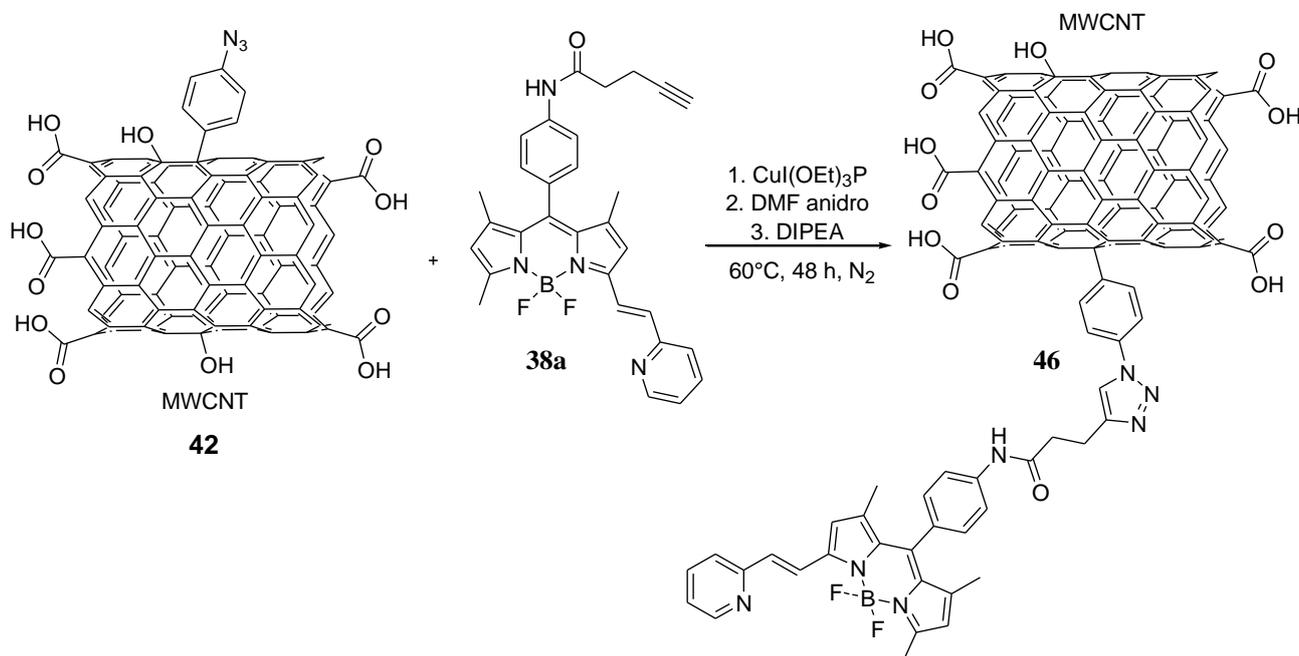
48a



48b

figura 48a e 48b : spettro Uv-vis e di fluorescenza del prodotto **46**. La figura 48b presenta la sottrazione della linea di base

7.3.7 Sintesi dell'addotto **46**



Si scalda il bagno d'olio a 60°C. In provetta si aggiunge il composto **42** (5 mg), il prodotto **38a** (5.2 mg, 0.01 mmol, 1 eq.), CuI(OEt)₃P (1 mg, 2.8 · 10⁻³ mmol, 0.2 eq.), DMF anidro (3.5 mL). Si procede a sonicazione per 5', quindi si aggiunge DIPEA (4.3 mg, 3 · 10⁻² mmol, 5.8 μL, 2.9 eq.). Dopo 24 h si ferma l'agitazione e si sonica per 5', quindi si ripone in bagno ad olio come in precedenza. Al termine delle 48 h si trasferisce tutto in provetta da centrifuga e si esegue un primo lavaggio con (*i-*

Parte sperimentale

$(Pr)_2O$ (1x10 mL); si osserva la formazione di un precipitato. Si sonica per 5' e si centrifuga per 5' a 1400 rpm. Si ha precipitazione. Quindi si procede ad estrazione del surnatante tramite pasteur. Si ridisperde quindi in $(i-Pr)_2O$ (10 mL). Si ripete la precedente procedura per quattro volte. Si dissolve, quindi, in acetone e si porta a secco il prodotto **46**. Si eseguono gli spettri Uv-vis e di fluorimetria.

- UV-Vis (DMF), $\lambda_{MAX\ ABS}$ (nm): 348, 571, 623; Fluorescenza (DMF), $\lambda_{MAX\ EMISS}$ (nm): 570, 630 (vedi *figura 49*);

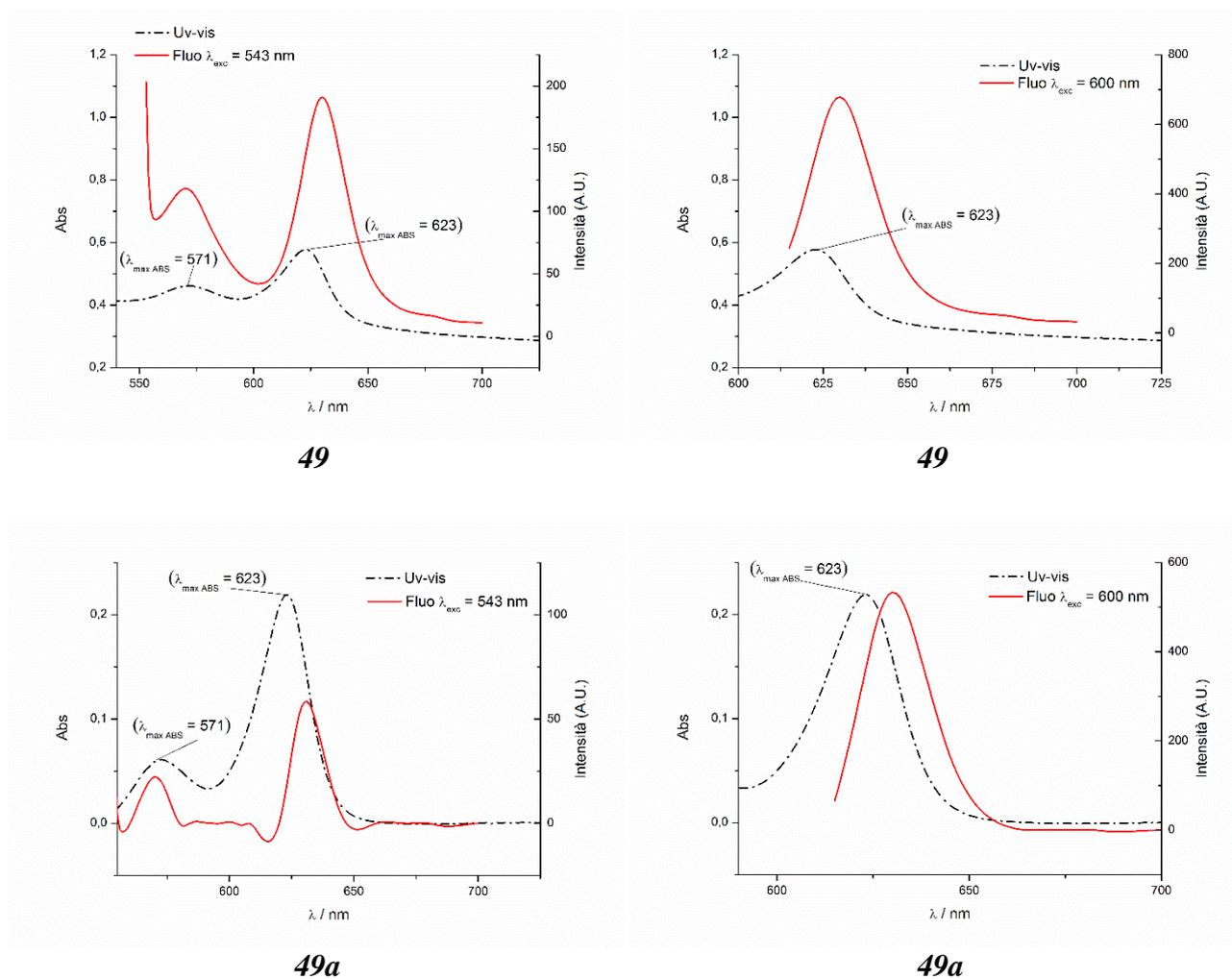
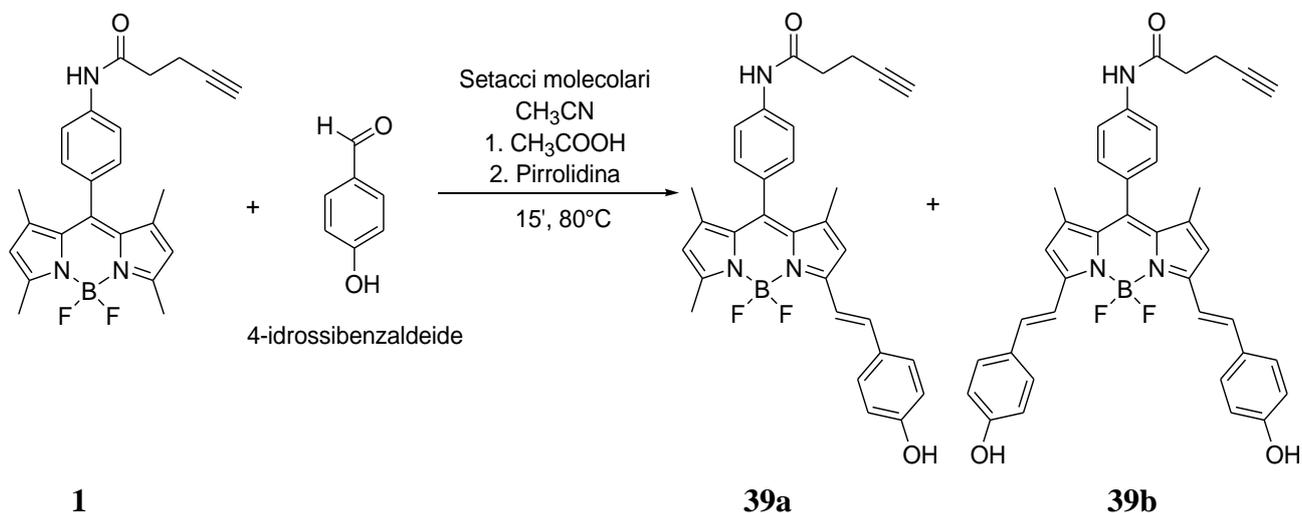


figura 49: Spettri Uv-vis e di fluorescenza del prodotto 46. Le figure 49a presentano la sottrazione della linea di base

Parte sperimentale

7.3.8 Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(4-fenolil)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (39)



Si attivano i settacci molecolari (circa 20) e si solubilizza il prodotto **1** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) in CH₃CN anidro (10 mL); si scalda il bagno ad olio fino a 80°C. Si aggiunge quindi nell'ordine CH₃COOH (42 µL, 0.72 mmol, 6 eq.), Pirrolidina (60 µL, 0.72 mmol, 6 eq.), 4-idrossibenzaldeide (88 mg, 0.72 mmol, 6 eq.). Si lascia sotto agitazione per 15' eseguendo TLC di controllo ogni 5' (Silice, eluente Et.P/Ac.OEt 1:1, macchie di colore rosa, R_f = 0.61, **39a**, e blu scuro, R_f = 0.35, **39b**). Si nota che la reazione è lenta nei confronti della formazione del prodotto disostituito, **39b**. Si decide di procedere con la reazione per intervalli di 1 h con TLC di controllo. Dopo 2 h si interrompe la reazione. Si solubilizza con Ac.OEt e gocce di metanolo in quanto il prodotto risulta poco solubile. Si eseguono i lavaggi con H₂O demi (2x50 mL), NaHCO₃ sat (2x50 mL), NaCO₃ sat. (2x50 mL), BRINE (3x60 mL). Si presti attenzione al lavaggio con NaHCO₃ sat. a causa di una possibile formazione dei sali sodici dovuti alla presenza del gruppo idrossi-terminale; verificarne la presenza tramite work up acido (HCl) sulle acque di recupero. Si anidrifca con Na₂SO₄, si evapora il solvente e si porta a secco sotto vuoto. Si procede ad una purificazione tramite cromatografia flash (Silice, eluente iniziale Ac.OEt/Et.P 2:3, poi Ac.OEt /Et.P 1:1); i prodotti sono raccolti in tre frazioni, la prima con il prodotto **1** non reagito, la seconda con il prodotto **39a** e la terza con il prodotto **39b**. Si procede ad una seconda colonna cromatografica sulla seconda frazione (Silice, eluente Ac.OEt/Et.P 3:2). Si raccolgono ulteriori tre frazioni contenenti, rispettivamente, i prodotti **1**, **39a**, **39b**. Si evapora il solvente e si portano a secco sotto vuoto tutte e tre le frazioni, dopo averle riunite con le rispettive precedenti (prodotto **39a**, 16 mg, 0.04 mmol, resa 25%; prodotto **39b**, 33.5 mg, 0.053 mmol, resa

Parte sperimentale

44%). Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto **39a** risulta poco pulito, al contrario di quello del prodotto **39b**. Si procede anche ad eseguire lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ e g-COSY del prodotto **39a**.

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 7.83-7.45 (m, 8H, $\text{H}_a + \text{H}_b + \text{H}_e + \text{H}_f + \text{H}_g + \text{H}_m$); 7.21 (m, 4H, $\text{H}_a + \text{H}_i$); 6.86 (Parte AA' di un sistema AA'-BB', $J = 8$ Hz, 4H, $\text{H}_h + \text{H}_l$); 6.58 (s, 1H, H_d); 6.00 (s, 1H, H_s); 2.66 (s, 4H, $\text{H}_n + \text{H}_o$); 2.59 (s, 3H, H_t); 2.11 (s, 1H, H_p); 1.46 (m, 6H, $\text{H}_c + \text{H}_r$); (vedi *figura 50a*).
- $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 7.80 (d, $J = 16.4$ Hz, 2H, H_f); 7.56-7.51 (m, 6H, $\text{H}_a + \text{H}_g + \text{H}_m$); 7.35 (Parte AA' di un sistema AA'-BB', $J = 8$ Hz, 2H, H_b); 7.30 (d, $J = 16.4$ Hz, 2H, H_e); 6.84 (Parte AA' di un sistema AA'-BB', $J = 8$ Hz, 4H, $\text{H}_h + \text{H}_l$); 6.74 (s, 2H, H_d); 2.63 (m, 4H, $\text{H}_n + \text{H}_o$); 2.32 (s, 1H, H_p); 1.53 (s, 6H, H_c) (vedi *figura 50b*).

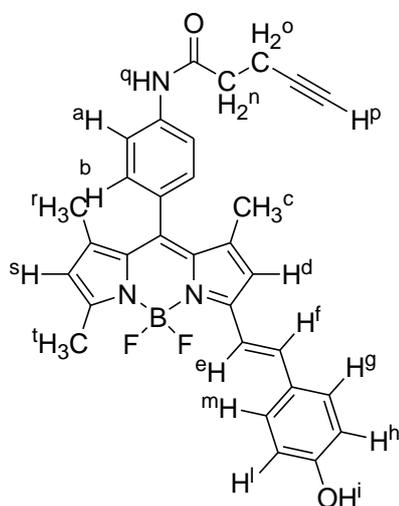


figura 50a

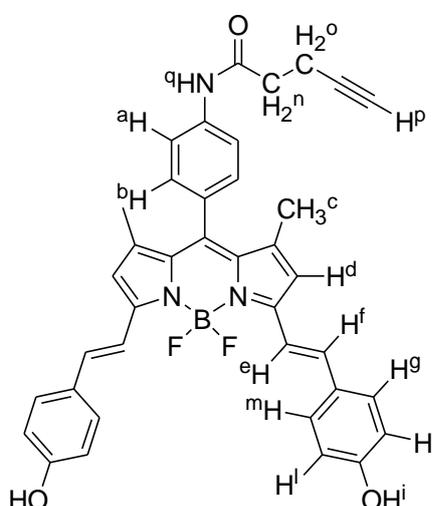
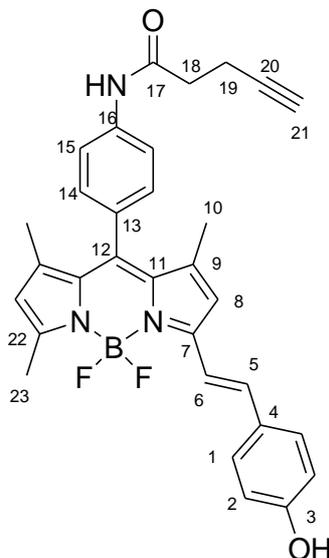


figura 50b

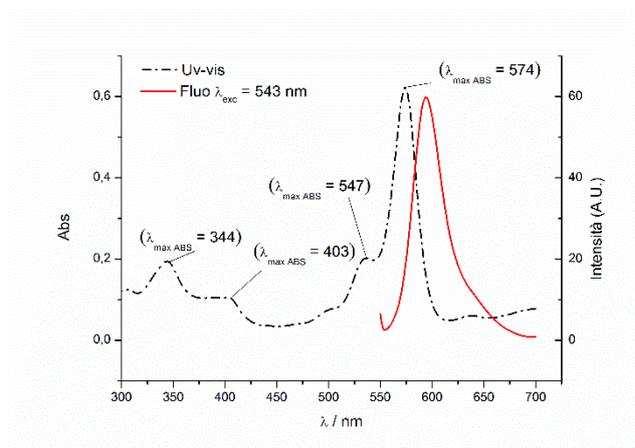
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): C_{17} 169.28, C_7 156.69, C_3 154.70, C_{16} 142.54, C_9 142.21, C_{12} 138.45, C_5 136.12, C_{11} 135.58, C_{22} 130.86, C_{13} 130.41, C_4 129.37, C_1 129.22, C_{14} 125.04, C_6 121.10, C_{15} 119.90, C_8 117.48, C_2 115.77, C_{20} 82.75, C_{21} 69.92, C_{18} 33.79, C_{10} 24.86, C_{19} 14.93, C_{23} 14.68 (vedi *figura 51*).

Parte sperimentale

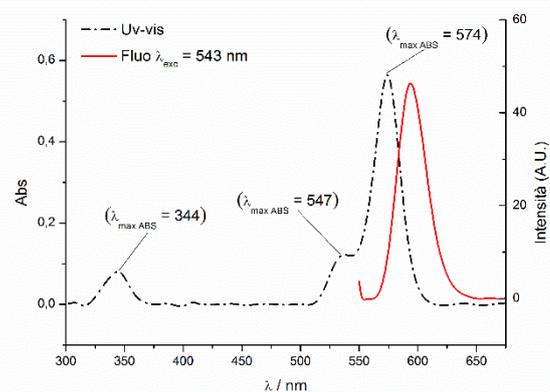
figura 51



- UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MAX ABS}}$ (nm): 344, 547, 574 (**39a**); 376, 599, 650 (**39b**); Fluorescenza (DMF), $\lambda_{\text{MAX EMISS}}$ (nm): 594, (**39a**), 594, 667 (**39b**) (vedi *figura 52*);

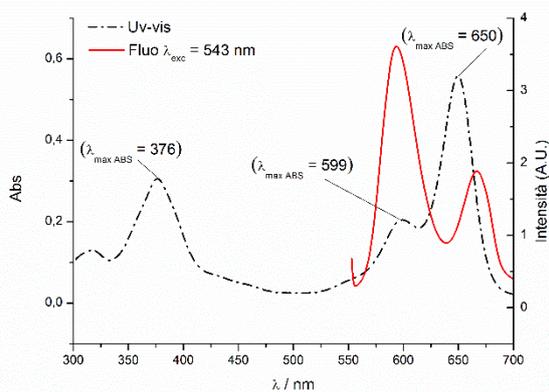


39a

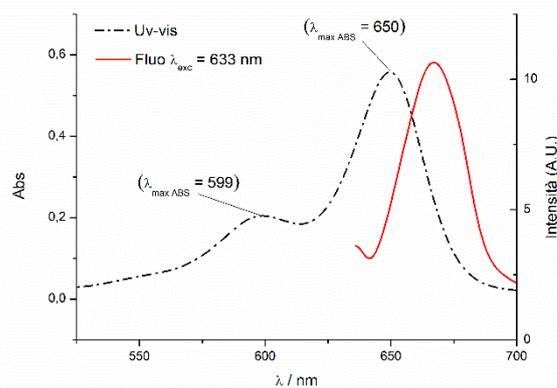


39a Normalizzato

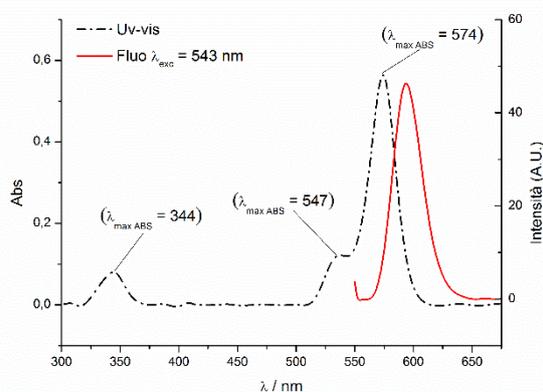
Parte sperimentale



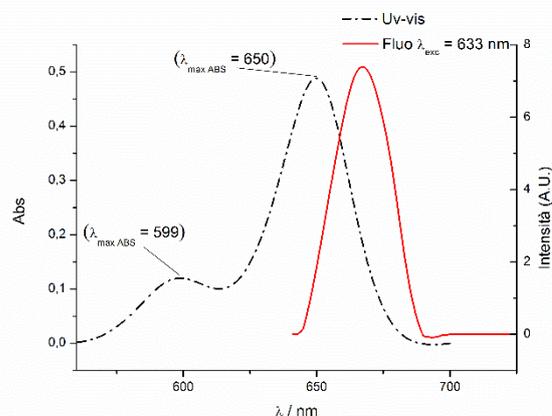
39b



39b



39b Normalizzato



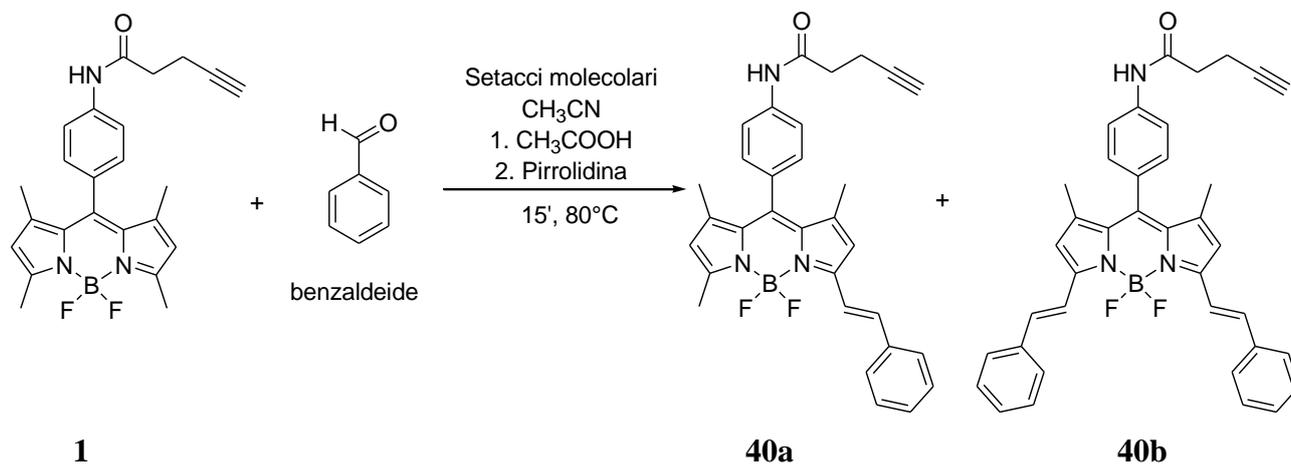
39b Normalizzato

figura 52: Spettri Uv-vis e di fluorescenza del prodotto **39**. Le figure “Normalizzate” presentano la sottrazione della linea di base

- **IR** (KBr) $\text{wn}(\text{cm}^{-1})$: 3325, 2925, 2850, 1625, 1600, 1577, 1541, 1498, 1404, 1365, 1307 (**39a**); 3371, 3286, 3184, 2918, 2850, 1662, 1598, 1514, 1485, 1458, 1438, 1384, 1369, 1299 (**39b**);
- **Formula bruta**: $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_3$ (**39b**), $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2$ (**39a**); **peso molecolare**: 627.50 g/mol (**39b**), 523.39 g/mol (**39a**)

Parte sperimentale

7.3.9 Sintesi del composto 8-(4-pent-4-inammidofenil)-1,7-dimetil-3,5-bis-[2-(4-fenilil)etenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (40)



Si attivano i settacci molecolari (circa 20) e si solubilizza il prodotto **1** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) in CH₃CN anidro (10 mL); si scalda il bagno ad olio fino a 80°C. Si aggiunge quindi nell'ordine CH₃COOH (42 µL, 0.72 mmol, 6 eq.), Pirrolidina (60 µL, 0.72 mmol, 6 eq.), benzaldeide (76 mg, 0.72 mmol, 6 eq.). Si lascia sotto agitazione per 15' eseguendo TLC di controllo ogni 5' (Silice, eluente Et.P/Ac.OEt 3:2, macchie di colore rosa, **40a**, R_f = 0.40, e blu scuro, **40b**, R_f = 0.45). Si nota che la reazione è lenta nei confronti della formazione del prodotto disostituito, **40b**. Si decide di procedere con la reazione per intervalli di 1 h con TLC di controllo. Dopo 1 h si interrompe la reazione. Si solubilizza con Ac.OEt. Si eseguono i lavaggi con H₂O Milli-q (1x50 mL), NaHCO₃ sat (2x50 mL), NaCO₃ sat. (3x50 mL), BRINE (2x50 mL). Si anidrifica con Na₂SO₄, si evapora il solvente e si porta a secco sotto vuoto. Si procede ad una purificazione tramite cromatografia flash (Silice, eluente iniziale DCM, poi Ac.OEt /Et.P 2:3); i prodotti sono raccolti in due frazioni, la prima con il prodotto **40b**, la seconda con il prodotto **40a**. Si procede ad una seconda colonna cromatografica sulla seconda frazione (Silice, eluente Ac.OEt). Si raccoglie una frazione. Si evapora il solvente e si portano a secco sotto vuoto (prodotto **40a**, 10.6 mg, 0.02 mmol, resa 16.7%; prodotto **40b**, 28.6 mg, 0.048 mmol, resa 40%). Lo spettro ¹H-NMR del prodotto **40a** risulta un po' sporco, quello del prodotto **40b** è pulito. Si procede anche ad eseguire lo spettro ¹³C-NMR e g-COSY del prodotto **40a**.

- ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm): 7.81 (d, J = 16 Hz, 1H, H_f); 7.73-7.52 (m, 4H, H_a + H_g + H_m); 7.42-7.35 (m, 3H, H_h + H_i + H_j); 7.33 (d, J = 16 Hz, 1H, H_e); 7.26 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, J = 8 Hz, 2H, H_b); 6.55 (s, 1H, H_d); 5.97 (s, 1H, H_s); 2.63 (s, 4H, H_n + H_o);

Parte sperimentale

2.22 (s, 3H, H_t); 2.09 (m, 1H, H_p); 1.50-1.43 (m, 6H, H_c + H_r) (vedi *figura 53a*).

- ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.74 (d, J = 16 Hz, 2H, H_f); 7.72 (Parte AA' di un sistema AA'-BB', J = 8 Hz, 2H, H_a); 7.64 (pd, J = 7.6 Hz, 4H, H_g + H_m); 7.40 (pt, J = 8 Hz, 4H, H_h + H_i); 7.34-7.27 (m, 2H, H_i); 7.30 (d, J = 16 Hz, 2H, H_e); 7.25 (Parte BB' di un sistema AA'-BB', J = 8 Hz, 2H, H_b); 6.64 (s, 2H, H_d); 2.65 (s, 4H, H_n + H_o); 2.09 (pt, 1H, H_p); 1.49 (s, 6H, H_c) (vedi *figura 53b*).

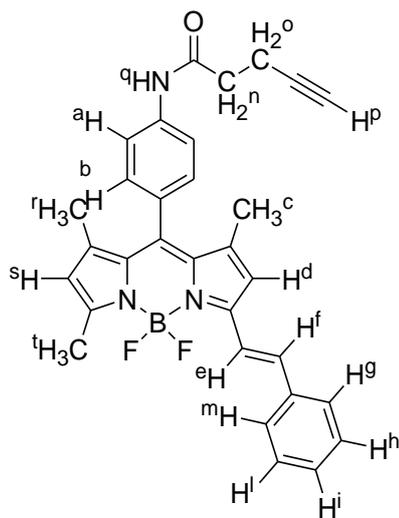


figura 53a

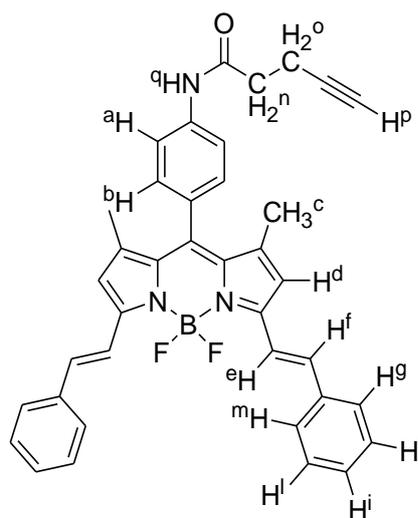


figura 53b

- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): C₁₇ 169.33, C₇ 152.60, C₁₆ 142.15, C₁₁ 138.64, C₁₂ 138.56, C₄ 136.51, C₉ 136.27, C₅ 133.51, C₁₃ 130.69, C₁₄ 129.16, C₂ 128.95, C₃ 128.77, C₁ 127.54, C₁₅ 119.90, C₆ 119.21, C₈ 117.83, C₂₀ 82.29, C₂₁ 69.85, C₁₈ 36.31, C₁₀ 29.70, C₁₉ 14.94 (vedi *figura 54*);

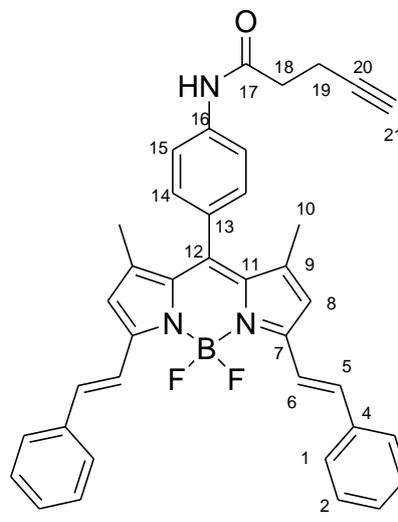
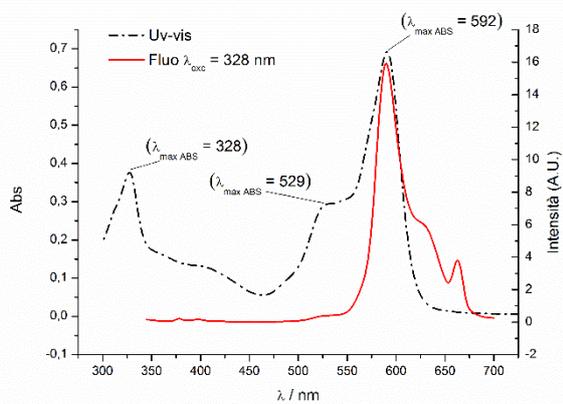


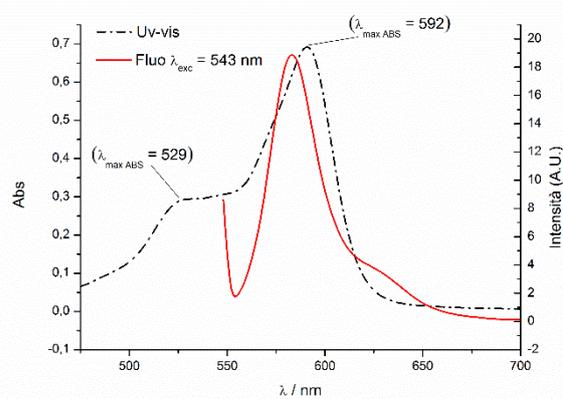
figura 54

Parte sperimentale

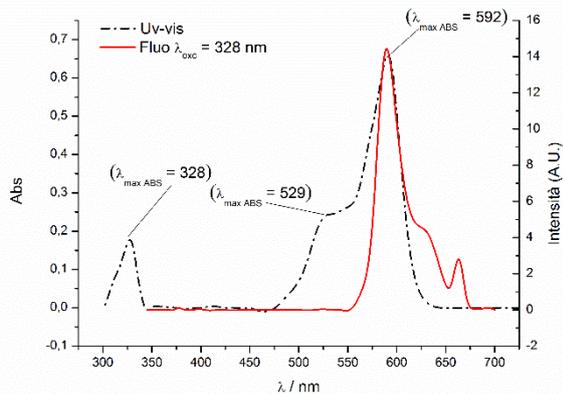
- UV-Vis (DMF), $\lambda_{\text{MAX ABS}}$ (nm): 328, 529, 592 (**40a**); 346, 575, 624 (**40b**); Fluorescenza (DMF), $\lambda_{\text{MAX EMISS}}$ (nm): 583, 590, 629, 663 (**40a**), 576, 637 (**40b**) (vedi *figura 55*)



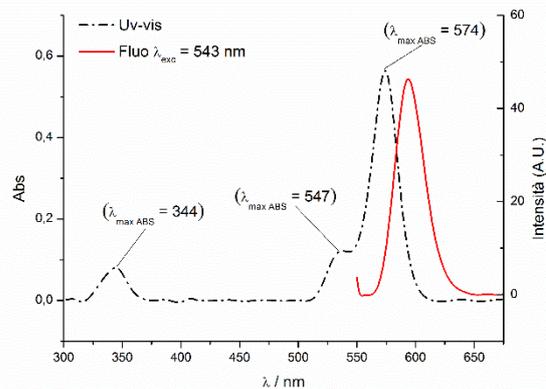
40a



40a

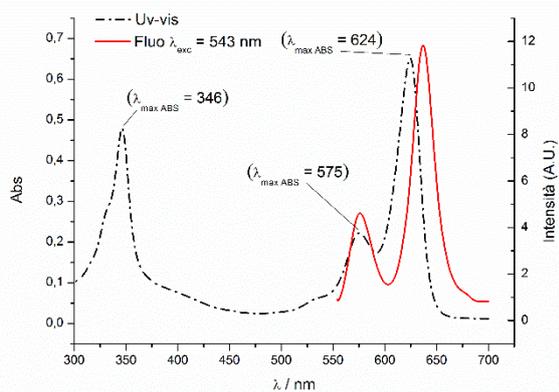


40a Normalizzato

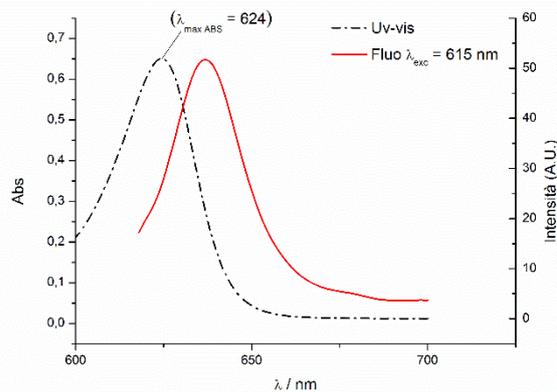


40a Normalizzato

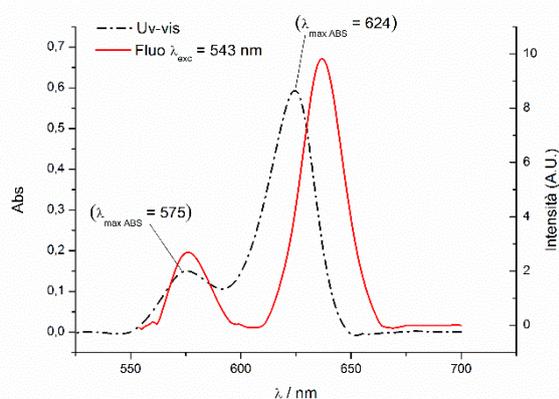
Parte sperimentale



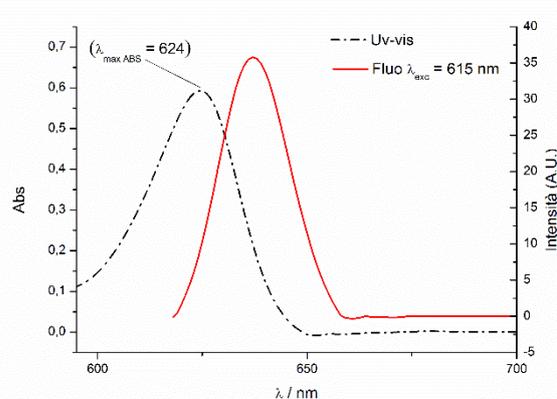
40b



40b



40b Normalizzato



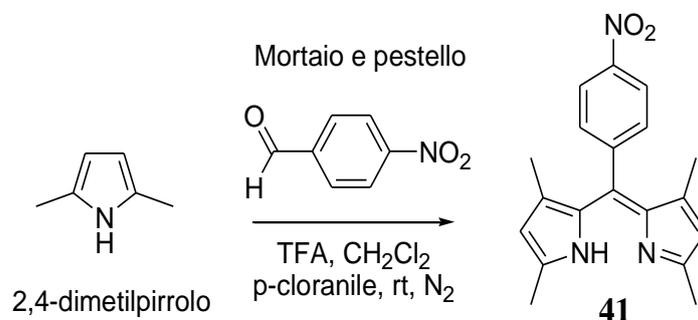
40b Normalizzato

Figura 50: Spettri Uv-vis e di fluorescenza del prodotto **40**. Le figure “Normalizzate” presentano la sottrazione della linea di base

- **IR** (KBr) $\text{wn}(\text{cm}^{-1})$: 3392, 3298, 3056, 3026, 2925, 2850, 1600, 1541, 1506, 1446, 1438 (**40a**); 3384, 3292, 3056, 3026, 2921, 2850, 1683, 1616, 1595, 1537, 1521 (**40b**);
- **Formula bruta**: $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ (**40a**), $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ (**40b**); **peso molecolare**: 507.39 g/mol (**40a**), 595.50 g/mol (**40b**)

Parte sperimentale

7.3.10 Sintesi del composto 8-(4-nitrofenil)-1,3,5,7-tetrametil-3a,4a-diaza-s-indacene (41)



Si prepara mortaio e pestello. Si aggiunge p-nitrobenzaldeide (378 mg, 2.5 mmol, 1 eq.), 2,4-dimetilpirrolo (0.51 mL, 476 mg, 5 mmol, 2 eq.) e si inizia ad amalgamare con il pestello. Si aggiunge, goccia a goccia, TFA (5 gocce), e si continua ad amalgamare per 1'-2'. Si aggiunge DCM (quanto basta per mantenere l'amalgama il più liquida possibile). Si prosegue con l'aggiunta del p-cloranile (900 mg, 3.7 mmol, 1.5 eq.) continuando ad amalgamare fintanto che non sia omogenea. Si estrae quindi in DCM e si prosegue con i seguenti lavaggi: Na_2CO_3 sat. (3x250 mL), BRINE (2x200 mL). Si anidrifica con Na_2SO_4 , si evapora il solvente e si porta a secco sotto vuoto. Il prodotto **41** non viene ulteriormente purificato (803.45 mg, resa quantitativa).

- $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 8.30 (Parte **AA'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_a); 7.51 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_b); 5.90 (s, 2H, H_d); 2.33 (s, 6H, H_c); 1.26 (m, 6H, H_e) (vedi *figura 51*);

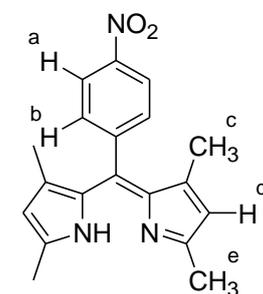
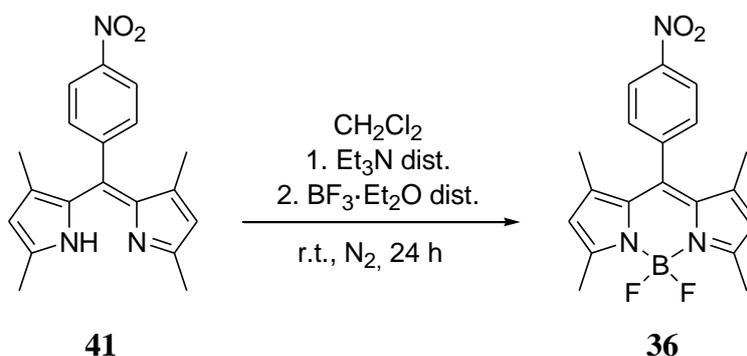


figura 51

- formula bruta : $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$; peso molecolare : 321.38 g/mol.

7.3.11 Sintesi del composto 8-(4-nitrofenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (36)



Si distilla il $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (T.eb. a 760 mmHg = 121°C, T della testa = 60°C, T del corpo = 67°C). Si recupera il prodotto **41** (803.45 mg, 2.5 mmol, 1 eq.) con DCM anidro (30-40 mL) e si aggiunge, la TEA (3 mL, 0.025 mmol) e, goccia a goccia, il $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.36 g, 23.7 mmol, 9.5 eq.). Si recupera con DCM e si eseguono i lavaggi con Na_2CO_3 sat. (3x250 mL), BRINE (2x200 mL). Ogni fase acquosa recuperata si estrae nuovamente con DCM. Si anidrifica con Na_2SO_4 , si evapora il solvente e si porta a secco sotto vuoto. Si esegue una purificazione tramite cromatografia (Silice, eluente DCM/Et.P 2:1, macchia arancione); si recupera una frazione principale più una seconda marginale (277 mg, resa = 28%).

- $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 8.38 (Parte **AA'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8$ Hz, 2H, H_a); 7.54 (Parte **BB'** di un sistema **AA'-BB'**, $J = 8$ Hz, 2H, H_b); 6.02 (s, 2H, H_d); 2.56 (s, 6H, H_e); 1.36 (s, 6H, H_c) (vedi *figura 52*);

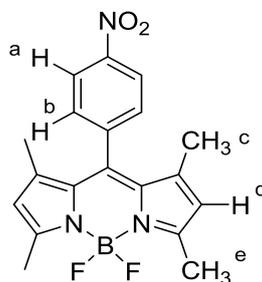


figura 52

8 Bibliografia

- (1) Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130.
- (2) Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891.
- (3) Gryko, D. T.; Gryko, D.; Lee, C.-H. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3780.
- (4) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216.
- (5) Lallana, E.; Sousa-Herves, A.; Fernandez-Trillo, F.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 1.
- (6) Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794.
- (7) Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *42*, 77.
- (8) Singh, B. G. P.; Baburao, C.; Pispati, V.; Pathipati, H.; Muthy, N.; Prassana, S. R. V.; Rathode, B. G. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* **2012**, *2*, 523.
- (9) He, H.; Pham-Huy, L. A.; Dramou, P.; Xiao, D.; Zuo, P.; Pham-Huy, C. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1.
- (10) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310.
- (11) Fabbro, C.; Ali-Boucetta, H.; Ros, T. D.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3911.
- (12) Li, R.; Wu, R.; Zhao, L.; Wu, M.; Yang, L.; Zou, H. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1399.
- (13) Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10182.
- (14) Maligaspe, E.; Tkachenko, N. V.; Subbaiyan, N. K.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; Lemmetyinen, H.; D'Souza, F. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8478.
- (15) Mula, S.; Elliott, K.; Harriman, A.; Ziessel, R. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 10515.
- (16) Mula, S.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6383.
- (17) Jameson, L. P.; Dzyuba, S. V. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 786.