



Università
Ca' Foscari
Venezia
Facoltà
di Scienze
Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Prova finale di Laurea

Sintesi di molecole fluorescenti derivate dal dichetopirrolopirrolo (DPP) per applicazioni biomediche

Relatore

Ch. Prof. Ottorino De Lucchi

Correlatore

Dott. Giuseppe Borsato

Laureando

Alessia Favero
Matricola 829444

Anno Accademico
2014 / 2015

*"Tutta la conoscenza, originariamente e secondo la sua essenza,
è al servizio della volontà. Il punto di partenza della
conoscenza non è altro se non volontà oggettiva."*

Arthur Schopenhauer

INDICE

1. *Introduzione*

1.1 Bisfosfonati

1.1.1 Il tessuto osseo e l'osteoporosi

1.1.2 I Bisfosfonati come cura

1.2 Le Sonde

1.2.1 Utilizzi delle sonde molecolari

1.3 Il Dichetopirrolopirrolo (**DPP**)

1.3.1 Proprietà chimico-fisiche del **DPP**

1.3.2 Impiego dei **DPPs** nei materiali avanzati

1.4 Sonde derivanti dal **DPP**

1.4.1 Sensori per anioni e cationi

1.4.2 Sonde per **ROS** e tioli

1.4.3 Sonde per tioli

1.4.4 Sonde per *Near Infrared Spectroscopy* (**NIR**)

2. *Scopo della Tesi*

3. *Discussione e Risultati*

3.1 Sintesi **DPP** e **DPP-NBoc** protetti

3.1.1 Sintesi del **DPP** bisBoc

3.1.2 Monodeprotezione del **DPP** bisBoc

3.2 Sintesi sonde fluorescenti

3.2.1 Sintesi diretta del **DPP** monoEstereAttivo

3.2.2 Sintesi indiretta del **DPP** monoEstereAttivo

Acronimi e abbreviazioni

ABoc	Anidride Boc (di-tert-butil-dicarbonato)
AcOEt	Acetato di etile
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
BASF	<i>Badische Anilin- und Soda Fabrik SE.</i>
BODIPY	Boro-dipirrometene
BP	Bisfosfonati
CDCl ₃	Cloroformio deuterato
Cy	Cicloesano
DCFH	Dicloro-diidro-fluoresceina diacetato
DCM	Diclorometano
DMAP	<i>N,N'</i> -dimetilamminopiridina
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DPP	Ter-butyl 1,4-diosso-3,6-difenil-4,5-diidropirrolo[3,4-c]pirrolo-2(1H)-carbossilato
dppf	1,1'-bis (difenilfosfino)ferrocene
DSSC	<i>Dye-sensitized-solar cells</i>
EDAC	<i>N</i> -(3-Dimetilamminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimmide cloridrato
Et ₂ O	Etere dietilico
Fc	<i>Flash chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPP	<i>High Performance Pigments</i>
IR	Infrarosso
MeOH	Metanolo
NBS	N-bromosuccinimide
NHS	N-idrossisuccinimide
NIR	<i>Near Infrared Spectroscopy</i>
NMP	N-metil-2-pirrolidone
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ONJ	<i>Osteonecrosis of the jaw</i> (osteonecrosi della mandibola).
OPV	Organic Photovoltaic
PLED	<i>Polymeric light emitting-diodes</i>
Pd ₂ (dba) ₃	Palladio Dibenzilidene Acetone
P(<i>t</i> -Bu) ₃	Tri- <i>tert</i> -butilfosfina
ROS	Specie ossigeno reattive
SP	Polimero supramolecolare
<i>t</i> -AmOH	<i>Tert</i> amil alcol

<i>t</i> -Boc	Di- <i>t</i> -butil dicarbonato
TBAOH	<i>Tetra</i> butilammonio idrossido
<i>t</i> -BuOK	<i>Tert</i> butossido di potassio
<i>t</i> -BuONa	<i>Tert</i> butossido di sodio
<i>t</i> -EtAOH	<i>Tetra</i> etilammonio idrossido
TEG	Glicole trietilenico
TFA	Acido Trifluoroacetico
TLC	Cromatografia su strato sottile
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioletto
Vis	Visibile

INTRODUZIONE

1.1 Bisfosfonati

I Bisfosfonati (**BP**) furono utilizzati come farmaci nel trattamento di malattie ossee a partire dalla fine degli anni '60, quando Herbert Fleisch scoprì la relazione tra la struttura di queste molecole con il metabolismo delle patologie ossee. Fino a quel momento, i **BP** erano utilizzati come agenti addolcenti dell'acqua, poiché in grado di sequestrare ioni Ca^{2+} e inibire la precipitazione del carbonato di calcio.¹

Da osservazioni sperimentali risultò che i **BP** erano in grado di (i) inibire il riassorbimento osseo poiché assorbiti selettivamente dalla superficie minerale dell'osso e (ii) di interferire biochimicamente contro l'azione di degrado dello stesso. Partendo da questi preliminari risultati si avviarono numerose ricerche volte a stabilire se questa classe di molecole potesse essere utilizzata per contrastare malattie metaboliche dell'osso come l'osteoporosi, il morbo di Paget e diverse classi di tumori ossei.²

1.1.1 Il tessuto osseo e l'osteoporosi

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo complesso organizzato in strutture di notevole durezza e resistenza (ossa) le cui funzioni sono il supporto e il movimento dell'individuo, il deposito di minerali, il controllo del pH sanguigno e la protezione degli organi interni.

Il tessuto osseo è costituito da una matrice organica, composta da fibre di collagene, glicoproteine e proteoglicani (acido ialuronico ed esamina), e da una matrice organica formata da sali minerali (fosfato e carbonato di calcio) uniti in cristalli di idrossiapatite.³

¹ L. J. M. J. Blomen, *Discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates*. Chapter 7. In: O. Bijvoet, H. A. Fleisch, R.E. Canfield, R.G.G. Russell, editors. *Bisphosphonates on bone*. Elsevier Science B.V.; **1995**, 111 - 24.

² R. Graham, G. Russell, *Metabolic Bone Disease and Related Research*, **2011**, 49: 2.

³ Enciclopedia Medica Treccani, **2010**

Nel tessuto osseo si distinguono tre tipi di cellule: osteoblasti, osteociti e osteoclasti (**Figura 1.1**). Di queste, gli osteoclasti sono le cellule designate al riassorbimento osseo, le quali sono in grado di dissolvere la componente minerale che costituisce l'osso, ovvero i cristalli di idrossiapatite, acidificando il microambiente. Sfortunatamente, a seguito dell'acidificazione, si manifesta anche la degradazione enzimatica delle componenti organiche del tessuto osseo.⁴ Il mantenimento della massa ossea è dunque garantito dall'azione combinata degli osteoclasti che riassorbono l'osso e degli osteoblasti che sostituiscono l'osso vecchio con quello nuovo.⁵

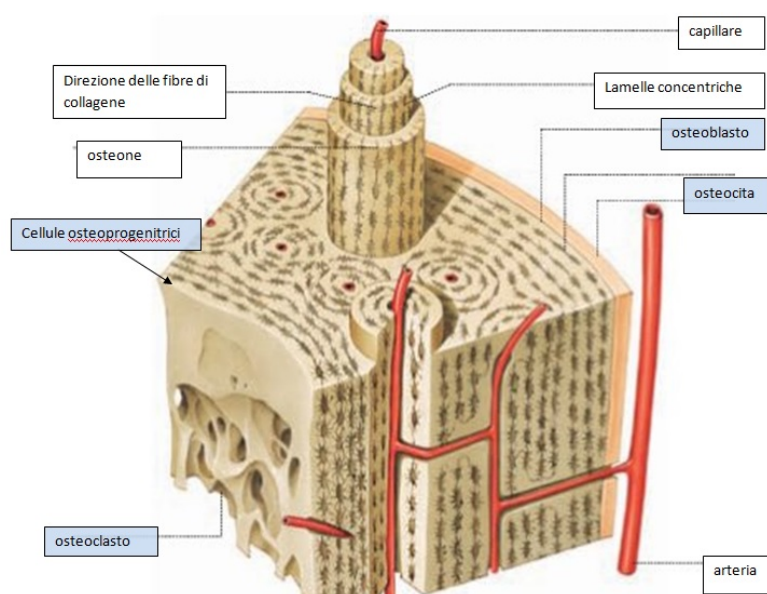


Figura 1.1. Struttura del tessuto osseo e delle diverse cellule presenti.

Uno squilibrio tra la velocità di formazione dell'osso e la sua dissoluzione, porta ad un disordine scheletrico caratterizzato da riduzione della resistenza ossea, da modificazioni della densità e della microarchitettura dell'osso (**Figura 1.2**) con aumento della fragilità e del rischio di fratture. La combinazione di questi fattori causa l'osteoporosi.

⁴ *I bisfosfonati*, Odontoiatria e salute, 2 – 100.

⁵ D. J. Hadjidakis, I. I. Androulakis, "Bone remodelling." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, 1092: 385 - 396.

L'osteoporosi è una patologia età-correlata distinta in due forme: l'osteoporosi postmenopausale e l'osteoporosi senile. La prima colpisce le donne tra i 55 e i 75 anni di età ed è dovuta alla diminuzione della concentrazione di estrogeni che induce un aumento dell'attività osteoclastica e conseguente incremento del riassorbimento osseo. La seconda è dovuta alla riduzione dell'attività osteoblastica correlata all'invecchiamento, alla ridotta disponibilità di calcio per il limitato assorbimento intestinale e alla scarsa attività fisica. Quest'ultima interessa le donne sopra i 70 anni e gli uomini sopra gli 80 anni d'età.⁶

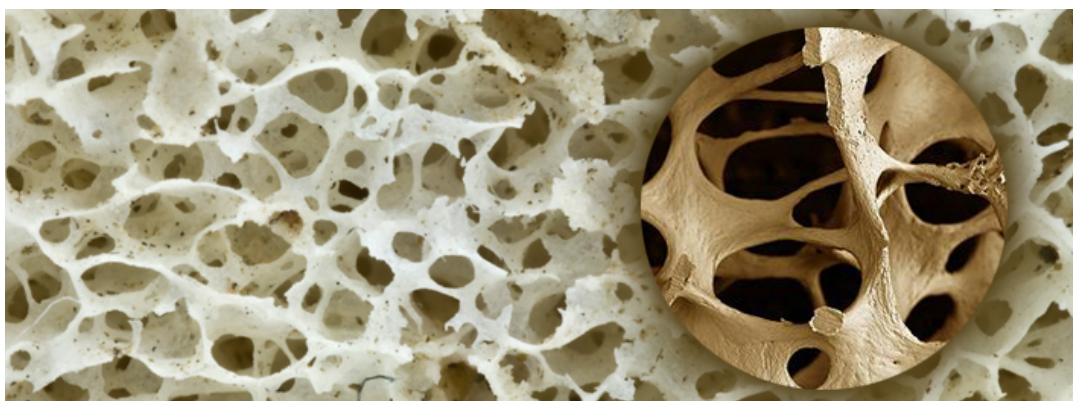


Figura 1.2. Matrice ossea sana e *spot* con tessuto osseo danneggiato dall'osteoporosi.

1.1.2 I Bisfosfonati come cura

I **BP** sono farmaci antiassorbimento in grado di ridurre l'attività osteoclastica sfruttando la somiglianza strutturale tra il bisfosfonato e il pirofosfato inorganico presente nell'idrossiapatite (**Figura 1.3**). Tale somiglianza dona al farmaco un'elevatissima affinità per il tessuto osseo veicolando i **BP** direttamente sull'osso evitando problemi di accumulo a carico di altri tessuti o organi.

⁶ *Osteoporosi: Un problema ortopedico*, Commissione Osteoporosi SIOT, 1 - 14.

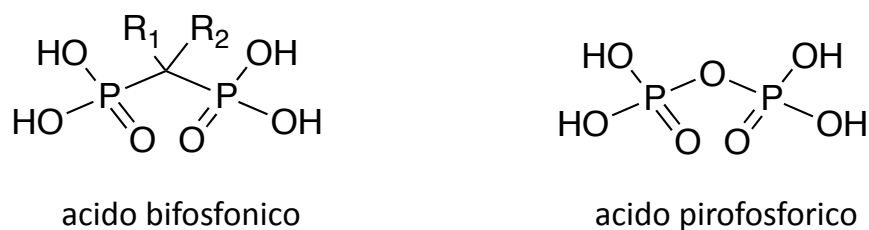


Figura 1.3. Struttura generale dei bisfosfonati e dell'acido pirofosforico.

In generale, i **BP** sono contraddistinti da due legami carbonio-fosforo e due catene laterali R_1 ed R_2 : una si lega alla matrice ossea mentre l'altra è responsabile dell'attività di anti-risassorbimento (**Figura 1.3**). L'efficacia dei bisfosfonati è intrinsecamente correlata alla loro capacità di essere trattenuti nell'osso, caratteristica che chiarisce la persistenza degli effetti dei **BP** anche a distanza di anni dall'interruzione del trattamento farmacologico. L'osso, infatti, assorbe, rilascia e riassorbe localmente il farmaco cosicché l'emivita dei **BP** nel tessuto osseo varia fino ad un massimo di 10 anni mentre l'effetto inibitorio sul riassorbimento osseo dura per almeno altri 5 anni dopo la sospensione della terapia.⁷

Malgrado la notevole affinità del farmaco per il tessuto osseo, solo il 2% del bisfosfonato assunto raggiunge l'osso mentre il resto viene eliminato dai reni, causando potenzialmente gravi danni alle mucose dell'apparato digerente come gastriti, ulcere gastriche ed esofagiti corrosive. Ciò avviene a causa dell'elevata idrofilicità dei **BP** che ne limita l'assorbimento a livello cellulare e quindi contribuisce a diminuire la loro bassa biodisponibilità.

I bisfosfonati sono farmaci comunemente ben tollerati, tuttavia una costante assunzione può provocare effetti collaterali anche gravi, come ad esempio l'osteonecrosi della mascella (**ONJ**): una malattia degenerativa invalidante con scarse possibilità di

⁷ L. De Luca. *Nuovi Potenziali Farmaci Contro L'Osteoporosi: Sintesi Anche Stereoselettive di Bisfosfonati Azotati*. Tesi di Laurea. **2015**.

remissione. **ONJ** è un effetto collaterale dovuto all'accumulo dei **BP** nelle ossa della mascella e della mandibola. L'alta concentrazione locale del farmaco è in grado di inibire l'attività osteoclastica a tal punto che l'integrità del tessuto e la sua riparazione non sono più garantite aumentando il rischio di contaminazione batterica.⁸

⁸ *I bisfosfonati, Odontoiatria e salute, 2 - 100*

1.2 Le Sonde

Per sonda molecolare si intende un gruppo di atomi o molecole, che viene utilizzato in biologia molecolare o chimica per studiare le proprietà di altre molecole o le loro strutture. Il loro funzionamento sfrutta la modificazione di alcune proprietà della sonda (in genere fisiche, come il cambiamento di assorbanza, aumento o diminuzione di fluorescenza, paramagnetismo, etc.) quando questa interagisce con l'analita, che porta a una diversa risposta del segnale. Questo rende possibile esaminare indirettamente strutture e proprietà di composti che altrimenti sarebbero impossibili da studiare in modo diretto. La scelta della sonda molecolare è strettamente legata al composto, struttura o proprietà dell'analita che si vuole indagare. Una comune sonda utilizzata in ambito medico è la fluoresceina diacetato (**DCFH**), che sfrutta il fenomeno della fluorescenza, il cui meccanismo di azione è descritto in **Figura 1.4**. Questa molecola è sensibile alle *Reactive Oxygen Species* (**ROS**). Per **ROS** si intendono un certo numero di molecole e radicali liberi derivanti dall'ossigeno molecolare. Sono molecole molto piccole altamente reattive, studiate in campo biologico perché generate come sottoprodotto del naturale metabolismo dell'ossigeno e rivestono un ruolo importante nella segnalazione cellulare.

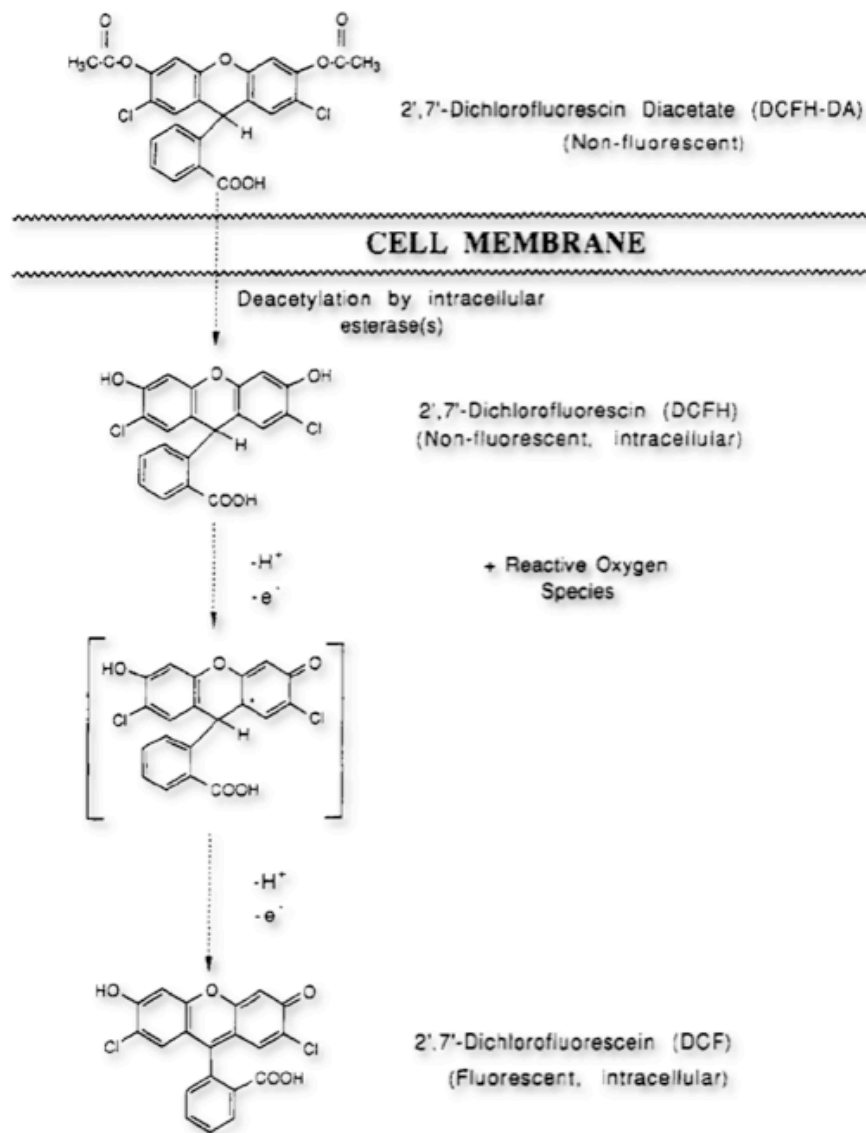


Figura 1.4. Meccanismo d'azione della DCFH.

Osservando le variazioni di fluorescenza di queste molecole con microscopi particolari di tipo confocale, si può risolvere il segnale emesso in funzione delle coordinate spaziali generando immagini ad effetto tridimensionale come quella di **Figura 1.5.**

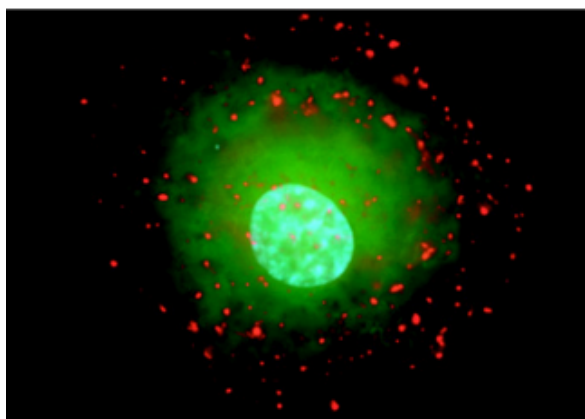


Figura 1.5: Cellula polmonare endoteliale con **DCFH** al microscopio confocale.

1.2.1 Utilizzi delle sonde molecolari

Negli ultimi anni, lo sviluppo di sonde fluorescenti per la determinazione della concentrazione di specie biologicamente attive è un argomento di ricerca di crescente interesse grazie anche alla disponibilità di un numero sempre maggiore di coloranti organici con proprietà di assorbimento ed emissione anche nel vicino infrarosso (**NIR**). Le loro proprietà ottiche li rendono adatti a una considerevole varietà di applicazioni come sensori biomedici.⁹ Come si vedrà nei paragrafi successivi, recentemente si sono realizzate diverse sonde che sfruttano le proprietà optoelettroniche del noto pigmento rosso PR-255 dichetopirrolopirrolo (**DPP**). Ciò che rende questo composto interessante è principalmente all'elevata resa quantica delle soluzioni fluorescenti prodotte dai suoi derivati, accompagnate dalla loro eccellente stabilità chimico-fisica.

Specie biologicamente importanti quali anioni, cationi, **ROS** e tioli sono essenziali per i sistemi viventi. Il monitoraggio dei valori di concentrazione di queste specie con metodiche analitiche sempre più sensibili risulta essenziale per prevenire l'insorgenza di diverse patologie come ad esempio i tumori.¹⁰ Da sempre una delle tecniche analitiche

⁹ V.J.Pansare, S.Hejazi, W.J.Faenza, R.K.Prud'homme. Chem Mater **2012**, 24: 812–27.

¹⁰ X.Li, X.Gao, W.Shi, H.Ma. Chem.Rev. **2014**, 114: 590–659.

più utilizzate in ambito biomedico per la sua sensibilità è, come già precedentemente menzionato, la fluorescenza.

Le sonde fluorogeniche comprendono un'unità di riconoscimento molecolare collegata a un'unità di segnalazione (fluoroforo) e trasformano questo riconoscimento in segnali ottici altamente sensibili e selettivi legati a cambiamenti foto-fisici da parte del fluoroforo quando questo incontra l'analita (**Figura 1.6**). Nel caso delle sonde che sfruttano la fluorescenza, l'analita legandosi alla sonda può provocare l'accensione (*turn-on*, il più comune) o lo spegnimento (*turn-off*) dell'intensità della fluorescenza, oppure si può osservare uno spostamento della banda di emissione per esempio dal blu al rosso.

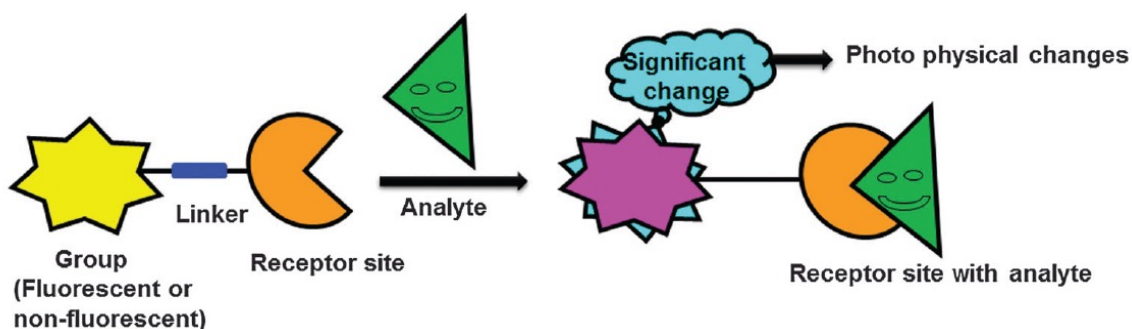
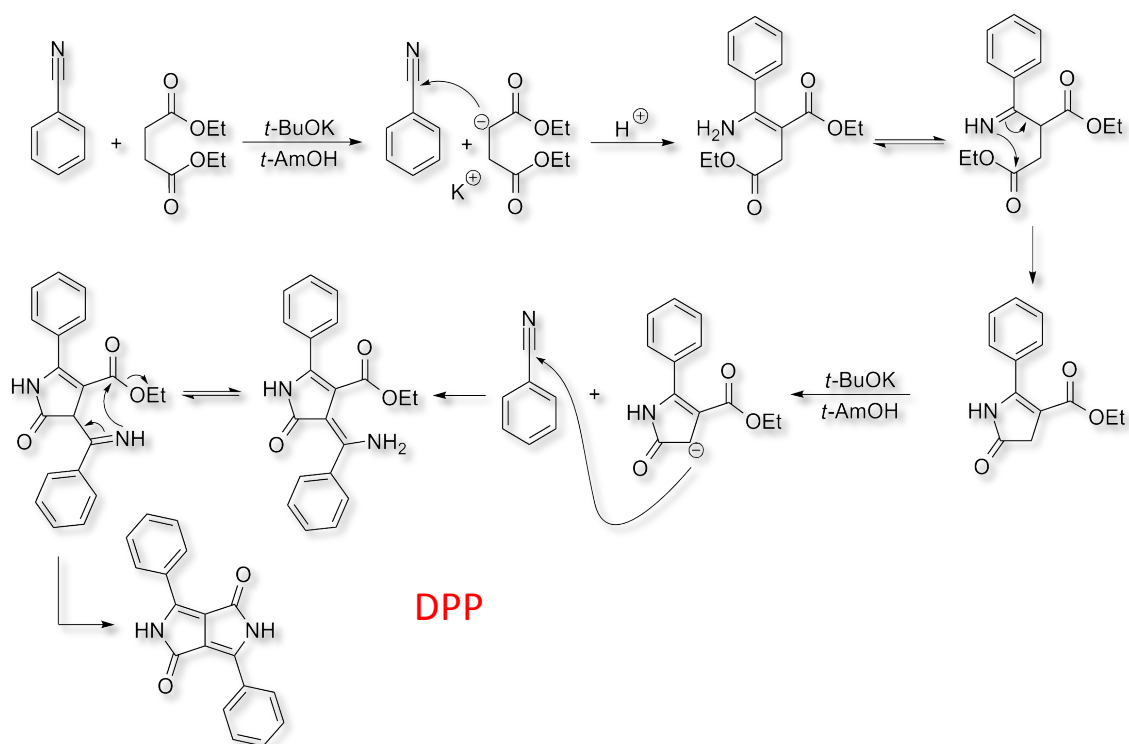


Figura 1.6. Schema generale del riconoscimento dell'analita da parte della sonda.

1.3 Dichetopirrolopirrolo (DPP)

Il presente lavoro di tesi si è concentrato sulla creazione di sonde molecolari partendo dal **DPP**. Questo pigmento è stato sintetizzato casualmente per la prima volta nel 1974 da un gruppo di ricerca impegnato in differenti studi.¹¹ La sintesi industriale attraverso una reazione *pseudo-Stobbe* a partire dal benzonitrile e il dietilsuccinato in alcol *ter*-amilico è stata sviluppata dai ricercatori Ciba¹² negli anni ottanta ed è illustrata nello **Schema 1.1**.



Schema 1.1. Sintesi del 3,6-difenil-1,4-dicheto-pirrolo[3,4-c]pirrolo.

¹¹ Farnum, D. G.; Mehta, G.; Moore, G. G. I.; Siegal, F. P., *Tetrahedron Letters* **1974**, 15: 2549.

¹² (a) Rochat A.C.; Cassar L.; Iqbal A. *EP94911*, **1983**; (b) Iqbal A., Jost M., Kirchmayr R., Pfenninger J., Rochat A., Wallquist O. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1988**, 97: 615.

1.3.1 Proprietà chimico-fisiche del DPP

Il **DPP** è un sistema biciclico contenente otto elettroni π e due unità lattamiche. Le principali caratteristiche fisiche del **DPP** sono un alto punto di fusione (>350 °C) accompagnato da una bassa solubilità (<110 mg/L in DMF a 25 °C), la quale conferisce scarsa reattività ma grande stabilità chimico-fisica, rendendo la molecola adatta all'utilizzo come pigmento. Da un punto di vista strettamente chimico, la ragione dell'insolubilità del **DPP** è dovuta alla formazione di legami idrogeno intermolecolari tra i gruppi NH e i C=O, combinata a interazioni π - π *stacking* tra piani paralleli di molecole come evidenziato dalle analisi diffrattometriche di **Figura 1.7**. Allo stato solido il **DPP** è quasi planare, in quanto gli anelli fenilici appaiono ruotati solamente di $7^\circ \pm 1^\circ$ rispetto al sistema eterociclico.

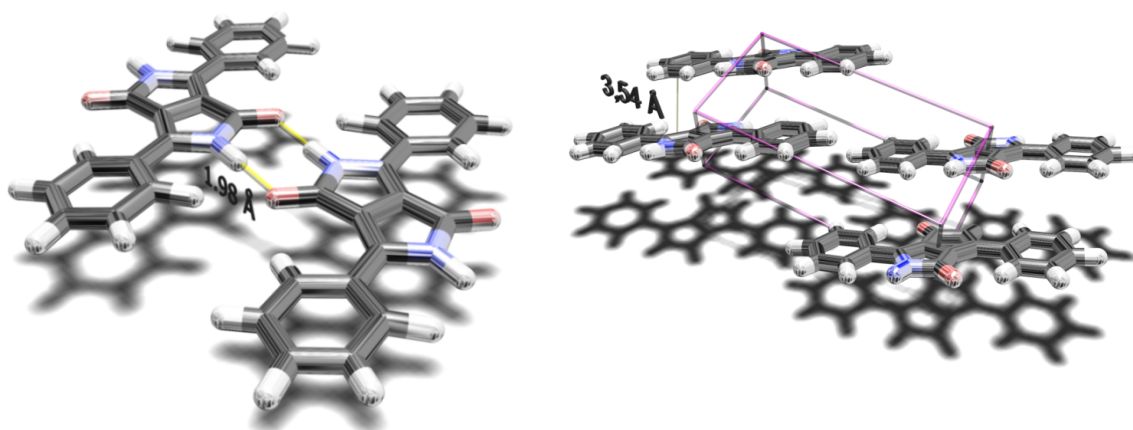


Figura 1.7. Analisi diffrattometrica del **DPP**.

Il **DPP** presenta uno spettro di assorbimento nella regione del visibile con un massimo a 504 nm quando è in soluzione e a 538 nm allo stato solido, con un coefficiente di estinzione molare pari a 33000 ($\text{dm}^2 \text{mol}^{-1}$). Visivamente il **DPP** si presenta di un colore rosso vivo allo stato solido mentre in soluzione presenta una colorazione gialla fluorescente (**Figura 1.8**).

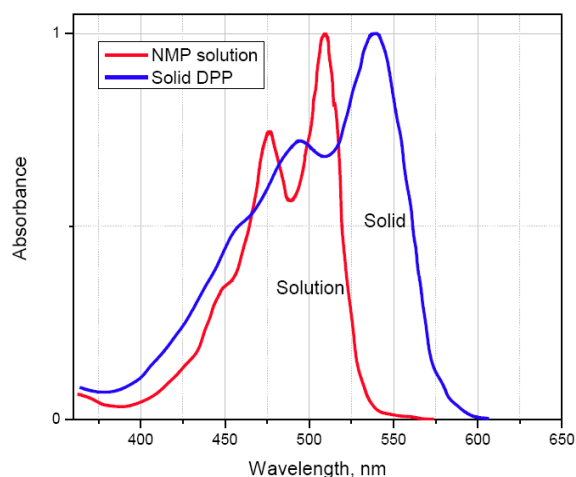


Figura 1.8. Spettro di assorbimento del **DPP** allo stato solido e in soluzione (**NMP**).

Come altre classi di pigmenti, anche i pigmenti **DPP**-derivati danno origine, come già detto, a soluzioni fluorescenti (**Figura 1.9**). Gli *Stokes shift* (differenza di lunghezza d'onda tra emissione ed assorbimento massimi) sono compresi tra 10 e 15 nm e la resa quantitativa di fluorescenza è del 60% circa. Mediante una *N*-sostituzione, sia la solubilità che gli *Stokes shift* possono essere aumentati.¹³

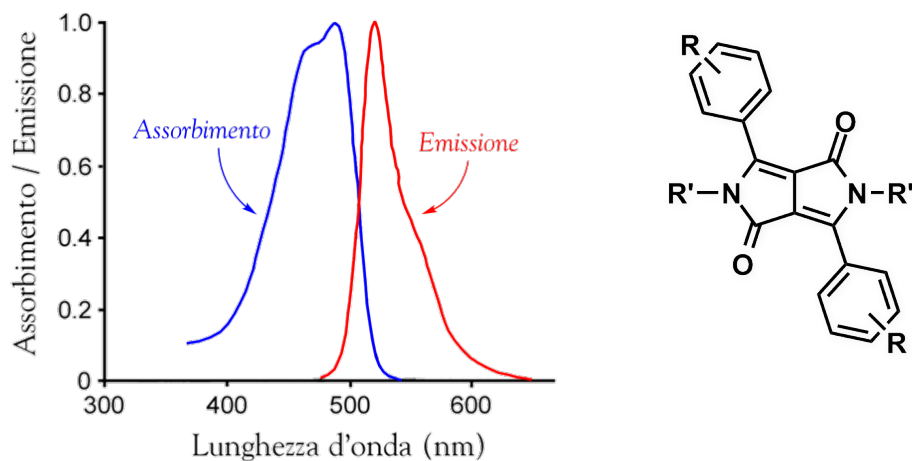


Figura 1.9. Spettri di assorbimento UV-Vis e emissione di fluorescenza del **DPP** ($R=R'=H$, soluzioni in $CHCl_3$).

¹³ *High Performance Pigments*. Ed. H.M. Smith. **2002**, p 166.

1.3.2 Impiego dei DPPs nei materiali avanzati

Per le ottime caratteristiche chimico-fisiche appena descritte come la resistenza alla luce e agli agenti atmosferici, i **DPPs** vengono ampiamente utilizzati soprattutto come pigmenti ad alte prestazioni (vernici, materie plastiche, inchiostri).¹⁴

Negli ultimi anni la ricerca nello sviluppo di nuove strutture a partire dal **DPP** ha ricevuto notevole impulso. Questo tipo di molecola ha trovato notevoli applicazioni in materiali avanzati, specialmente nel settore delle energie rinnovabili. Questo dato è confermato dal trend esponenziale delle pubblicazioni scientifiche che riguardano il **DPP** come si vede in **Figura 1.10**, infatti gli articoli pubblicati che riguardano questa molecola passano da circa venti articoli nel 2009 a centottanta nel 2013, a circa 258 nel 2014.¹⁵

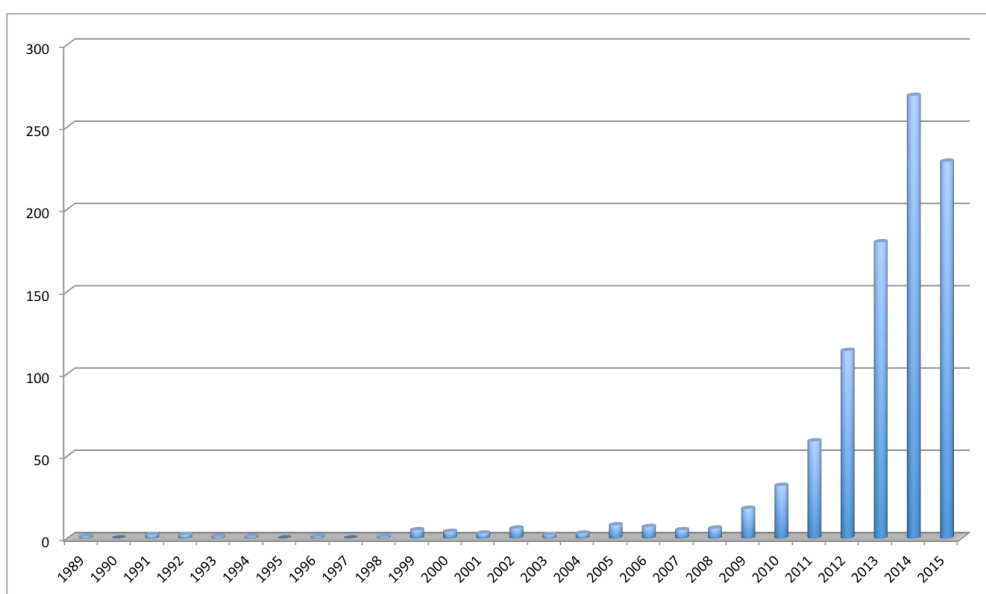


Figura 1.10. Grafico pubblicazioni sui **DPPs** aggiornato al 22/09/2014.

Recentemente in molte strutture polimeriche usate nel fotovoltaico organico si sono introdotti **DPPs**.¹⁶ Questo tipo di materiali sono interessanti in quanto abbinano alla

¹⁴ Z.Hao, A.Iqbal. *Chem.Soc.Rev.* **1997**, 26: 203–213.

¹⁵ Fonte: *Web of Science* del 22.09.2014

¹⁶ (a) W.H. Lee, S. K. Son, K. Kim, W.S. Shin, S. J. Moon, I.N. Kang, *Macromolecules.* **2012**, 45, 1303; (b) H. Bronstein, Z. Chen, R.S. Ashraf, W. Zhang, J. Du, J.R. Durrant, P.S.Tuladhar, K. Song, S.E. Watkins, Y. Geerts,

produzione di energia altre caratteristiche come peso contenuto e flessibilità (**Figura 1.11**), che li rendono dispositivi importanti per settori come la telefonia mobile e personal computers.

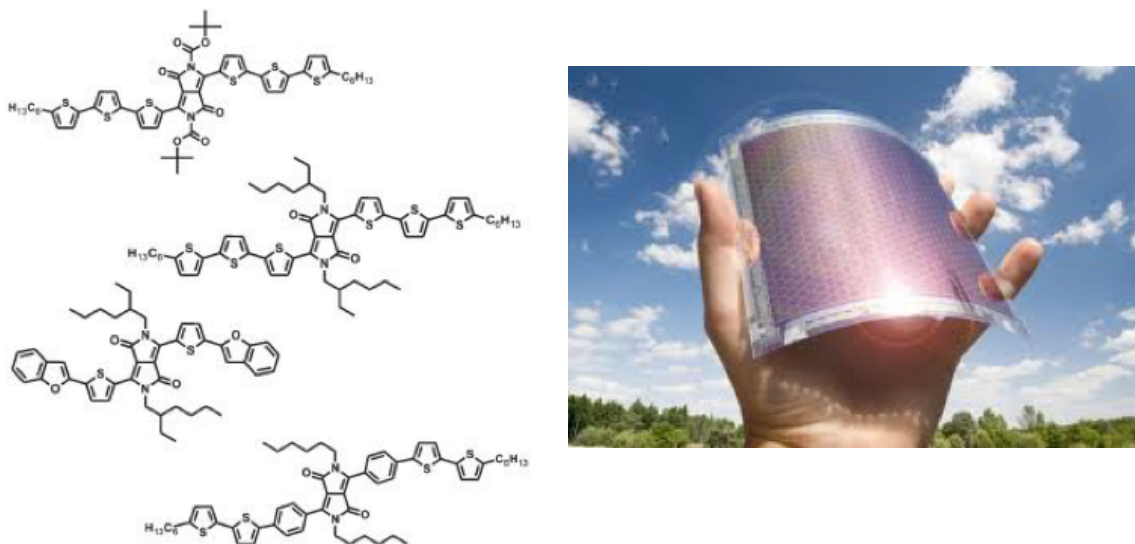


Figura 1.11. Esempi di derivati del **DPP** utilizzati nel Fotovoltaico Organico.

Un altro impiego dei **DPPs** è come sensibilizzatore nelle Dye-Sensitized Solar Cells – **DSSCs**, celle fotovoltaiche ibride di tipo Grätzel.¹⁷ La cella di Grätzel è un sistema costituito da un colorante adsorbito in una matrice di TiO₂ mesoporoso immerso in una soluzione elettrolitica di I₂/KI. Il meccanismo di funzionamento è descritto in **Figura 1.12**.¹⁸

M.M. Wienk, R.A.J. Janssen, T. Anthopoulos, H. Siringhaus, M. Heene. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* 3272; (c) B.P. Karsten, J.C. Bijleveld, R.A.J. Janssen, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1554; (d) E. Ripaud, D. Demeter, T. Rousseau, E. Boucard-Cétol, M. Allain, R. Po, P. Leriche, J. Roncali, *Dyes Pigm.* **2012**, *95*, 33.

¹⁷ (a) F. Guo, S. Qu, W. Wu, J. Li, W. Ying, J. Hua, *Synth Met* **2010**, *160*, 1767; (b) S.Y. Qu, W.J. Wu, J.L. Hua, C. Kong, Y.T. Long, H. Tian, *J. Phys. Chem. C.* **2010**, *114*, 1343; (c) J. Warnan, L. Favereau, Y. Pellegrin, E. Blart, D. Jacquemin, F. Odobel, *J. Photochem Photobiol.*, **2011**, *226*, 9; (d) J. Tang, S. Qu, J. Hu, W. Wu, J. Hua, *Sol. Energy* **2012**, *86*, 2306.

¹⁸ Fonte: <http://www.rsc.org/>

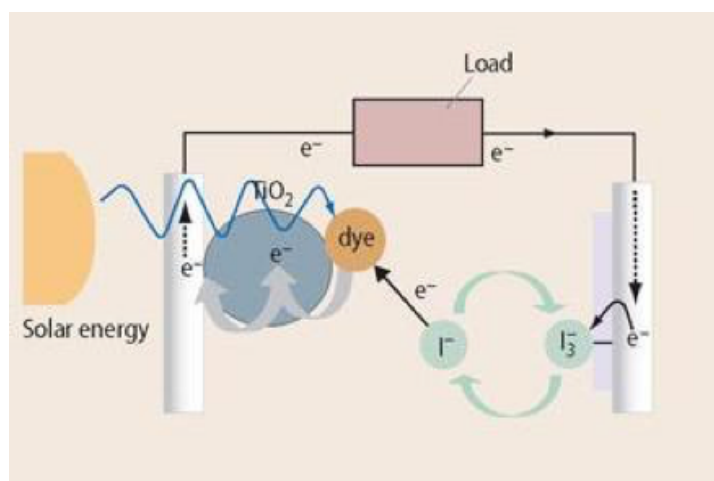


Figura 1.12. Funzionamento di una Cella di Grätzel.

Sistemi di questo tipo sono molto economici soprattutto nelle applicazioni a bassa densità offrendo un rendimento del 12,3%¹⁹ contro i sistemi low-cost in silicio che operano a circa 15-20%.²⁰ Per garantire longevità alla cella è necessario usare coloranti che abbiano un'elevata stabilità chimica e un ampio spettro di assorbimento, caratteristiche entrambe presenti nella molecola del **DPP**. In **Figura 1.13** vengono rappresentate alcune modifiche strutturali del **DPP** atte a trasformarlo in una **DSSc**.²¹

¹⁹ Fonte: <http://www.zeroemission.eu/portal/news/topic/Ricerca/id/14946/Fotovoltaico-lefficienza-della-cella-di-Gr%C3%a4tzel-schizza-al-123>

²⁰ Fonte: http://www.expoclima.net/focus/aziende/tecnologia_delle_celle_pluto_il_fotovoltaico_di_nuova_generazione.htm

²¹ S. Qu, H. Tian, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3039.

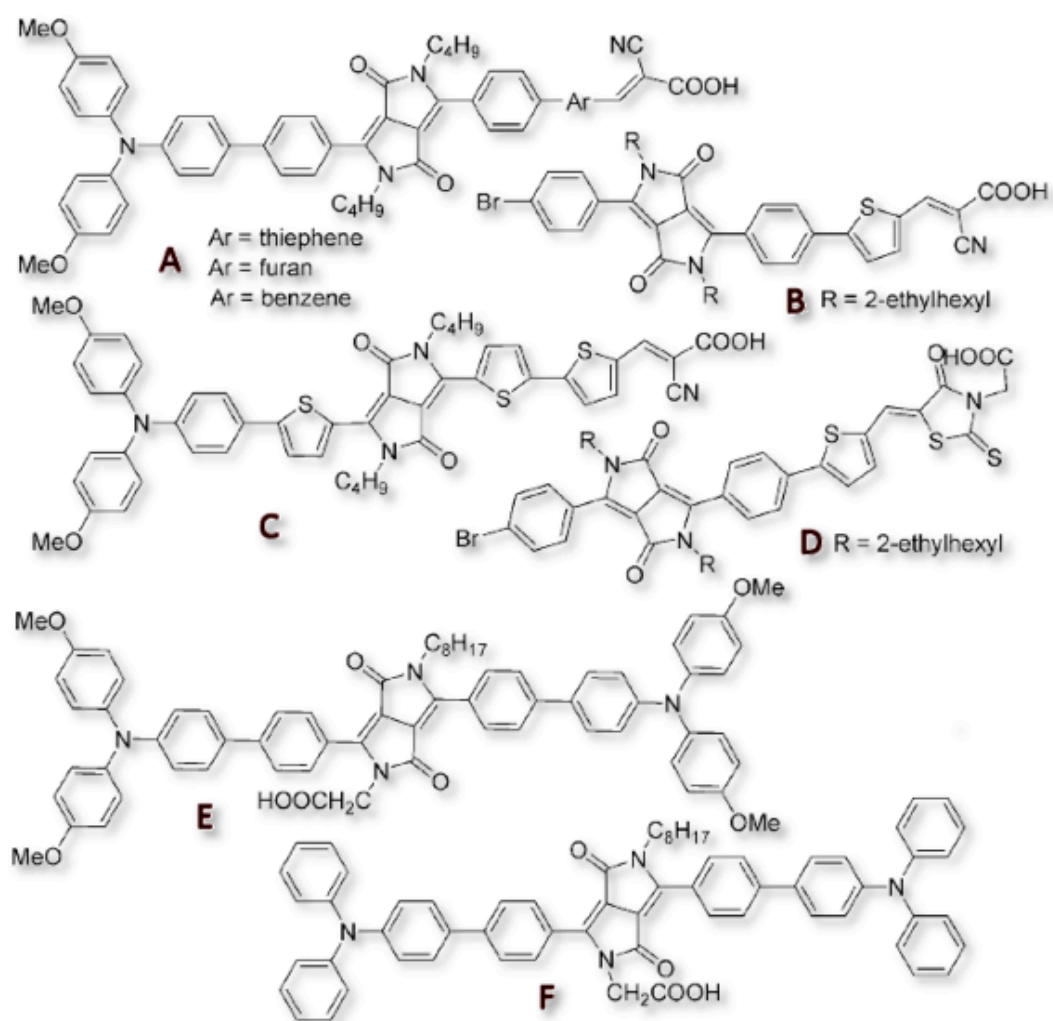


Figura 1.13. Esempi di derivati del DPP utilizzati nelle DSSc.

1.4 Sonde derivanti dal DPP

Recentemente la ricerca scientifica ha portato al raggiungimento di rilevanti traguardi nello sviluppo di nuove sonde fluorescenti basate sul **DPP** e i suoi derivati. Grazie a caratteristiche quali la possibilità di subire numerose modifiche sintetiche del nucleo centrale, l'elevata fluorescenza e l'eccezionale stabilità al calore e alla luce, il **DPP** è un eccellente *building block* per questa ricerca.

Le applicazioni di queste sonde vengono sfruttate per il riconoscimento di specie biologicamente attive come anioni, cationi, **ROS**, tioli ma anche gas come CO₂²² e H₂²³ oltre che per misurare variazioni di pH.²⁴

Negli ultimi anni sono state sviluppate anche delle sonde fluorescenti per l'imaging molecolare, **NIR** e a base di polimeri derivati dal **DPP**. Di seguito si citano alcuni fra i principali **DPPs** impiegati in questa ricerca.

1.4.1 Sensori per anioni e cationi

Come già ampiamente evidenziato, gli anioni rivestono un ruolo fondamentale nei sistemi sia ambientali che biologici, ma anche in ambito chimico e medico. Tra gli anioni più importanti, il fluoruro (F⁻) e il cianuro (CN⁻) sono indispensabili ma concentrazioni eccessivamente alte o basse comportano disturbi gastrici e renali, fluorosi dentale e scheletrica, urolitiasi negli esseri umani e possono causare persino la morte. A causa della loro tossicità, lo sviluppo di sonde fluorogeniche per la loro rilevazione è stato ampiamente perseguito.

La maggior parte delle sonde fluorescenti sfruttano (i) l'elettronegatività di questi anioni per formare forti legami a idrogeno con i gruppi -NH del **DPP** o (ii) la loro capacità di deprotonare questi gruppi amidici con conseguente spostamento *red-shift* sia

²² S.Schutting, S.M.Borisov, I.Klimant. *Anal.Chem.* **2013**; 85, 3271–3279.

²³ J.Mizuguchi, T.Imoda, H.Takahashi, H.Yamakami. *Dyes Pigm.* **2006**; 68, 47–52.

²⁴ (a) T.Yamagata, J.Kuwabara, T. Kanbara. *Tetrahedron Lett.* **2010**; 51, 1596–1599. (b) D.Aigner, B.Ungerbock, T.Mayr, R.Saf, I.Klimant, S.M.Borisov. *J. Mater. Chem. C.* **2013**; 1, 5685–5693.

nell'assorbimento che nell'emissione della sonda.²⁵ In **Figura 1.14** si rappresentano alcune strutture che sfruttano i principi sopra descritti.²⁶

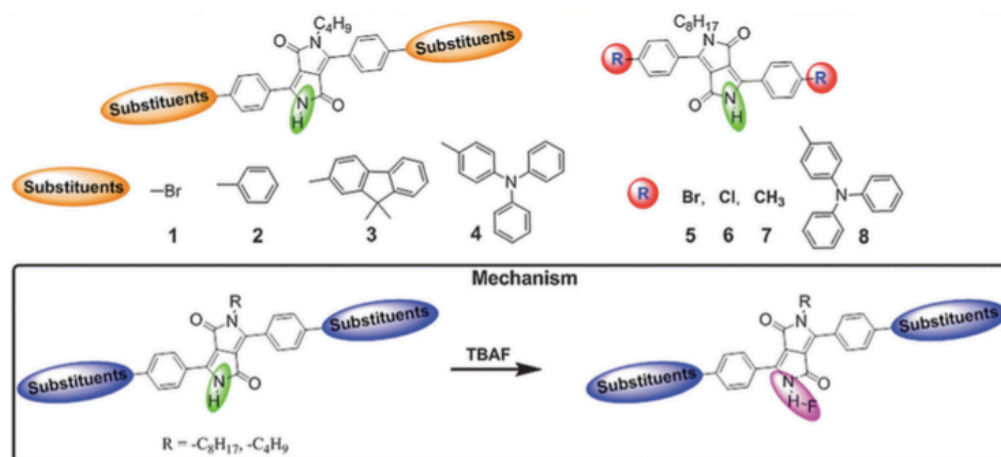


Figura 1.14. Esempi di *detector* per anioni.

Tutti gli organismi viventi necessitano di ioni metallici per la loro crescita e sviluppo. In particolare sodio, potassio, magnesio, zinco, rame, manganese e ferro sono vitali per varie funzioni fisiologiche come la trasmissione degli impulsi nervosi, l'osmoregolazione e il metabolismo.

In **Figura 1.15** è rappresentata una sonda derivata dal **DPP** utile per la determinazione quantitativa e qualitativa dello Zn^{2+} .

²⁵ (a) C.Yang, M.Zheng, Y.Li, B.Zhang, J.Li, L.Bu, W.Liu, M.Sun, H.Zhang, Y.Tao, S.Xue, W.Yang. *J.Mater.Chem.A.* **2013**, 1: 5172–5178. (b) Y.Li, M.Zheng, J.Wang, Y.Gao, B.Zhang, W.Yang, *Dyes&Pigments.* **2014**, 104: 97–101.

²⁶ M.Kaur, D.H.Choi, *Chem.Rev.Soc.* **2014**.

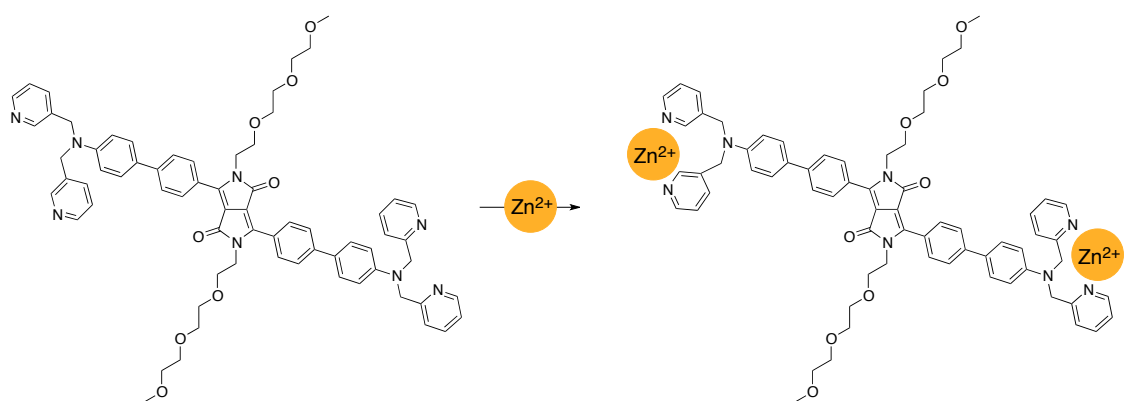


Figura 1.15. Sonda per il riconoscimento di cationi Zn^{2+} .

Questo sensore esibisce una debole fluorescenza rossa a circa 630 nm; tuttavia, dopo complessazione con lo Zn^{2+} ad opera del legante amin-bispiridinico, si assiste ad un *blu-shift* ($\Delta\lambda = 70$ nm) da 630 nm a 560 nm con un miglioramento dell'intensità di fluorescenza di 25 volte.²⁷

1.4.2 Sonde per ROS

Le specie ossigeno reattive come il perossido d'idrogeno, il radicale idrossile, il perossinitrito e l'ipoclorito sono i sottoprodotti del normale metabolismo dell'ossigeno e rivestono ruoli importanti in molti processi biologici cellulari. Tra queste, l' H_2O_2 viene prodotto da quasi tutti gli enzimi ossidasi e uno squilibrio nella sua produzione e consumo provoca l'accumulo nei mitocondri cellulari causando anche mutazioni genetiche.

Prerogativa essenziale delle **ROS**-Sonde è la selettività, verso uno specifico ossidante. E' stata perciò sintetizzata una nuova sonda fluorescente specifica per H_2O_2 come da **Figura 1.16.**²⁸

²⁷ G.Zhang, H.Li, S.Bi, L.Song, Y.Lu, L.Zhang, J.Yu, L. Wang. *Analyst*. **2013**, 138: 6163–6170.

²⁸ M.Kaur, D.S.Yang, K.Choi, M.J.Cho, D.H.Choi. *Dyes&Pigments*. **2014**, 100: 118–126.

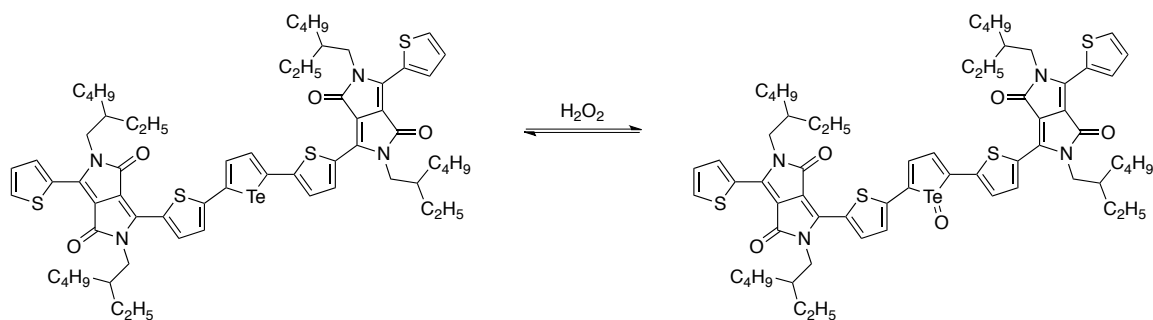


Figura 1.16. Struttura della sonda coniugata **DPP**-tellurofene.

Il picco di fluorescenza della sonda riportata nello **Figura 1.16** aumenta in presenza di H_2O_2 esibendo nello spettro un effetto batocromico con uno spostamento verso il rosso da 565 nm a 579 nm. La caratteristica di questa sonda è la sua reversibilità: la forma ossidata può essere ridotta, con aggiunta di glutazione, per rigenerare la sonda libera.

1.4.3 Sonde per tioli

I tioli come la cisteina, l'omocisteina e il glutathione rivestono un ruolo vitale nell'organismo, basti pensare che un deficit di queste molecole può causare lenta crescita nei bambini, danni al fegato e AIDS. Il rilevamento della concentrazione di tioli presenti nel sistema mediante sonde fluorescenti procede tramite vari meccanismi come la ciclizzazione con aldeidi, la scissione di esteri sulfamidici e solfonati e l'addizione di Michael.

La sonda mostrata in **Figura 1.17** utilizza il meccanismo di addizione di Michael esibendo uno spostamento *blue-shift* delle bande di assorbimento dopo l'aggiunta di cisteina (**Cys**). L'addizione di Michael della **Cys** ai doppi legami etilenici della sonda, infatti, ne riduce la π -coniugazione.²⁹

²⁹ L.Deng, W.Wu, H.Guo, J.Zhao, S.Ji, X.Zhang, X.Yuan, C.Zhang. *J.Org.Chem.* **2011**, 76: 9294–9304.

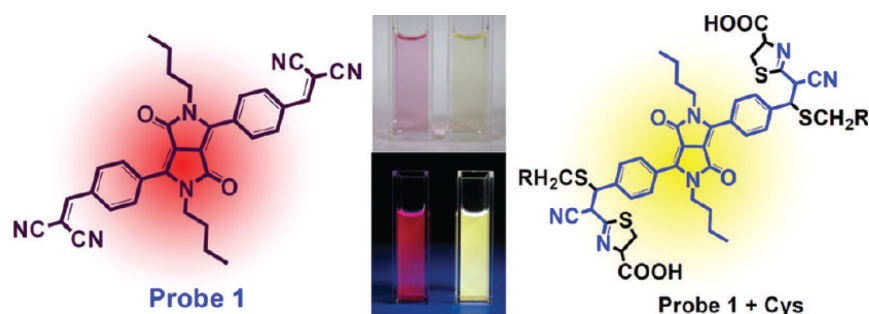


Figura 1.17. Struttura della sonda e meccanismo di rilevazione di tioli.

1.4.4 Sonde per Near Infrared Spectroscopy (NIR)

Notevoli sforzi sono stati dedicati a sviluppare sonde con assorbimento nel vicino infrarosso (NIR) offrendo importanti vantaggi per la ricerca in ambito biologico-cellulare.³⁰ Questo tipo di sonde infatti esibisce caratteristiche come (i) la penetrazione della radiazione nei tessuti profondi per il riconoscimento delle cellule; (ii) una bassa autofluorescenza delle cellule biologiche; (iii) la possibilità di imaging in vivo; (iv) minimo fotodanneggiamento dei tessuti dopo l'esposizione. In passato sono stati compiuti numero studi sulle cianine, squarine e boro-dipirrometeni (**BODIPYs**) ma le loro applicazioni sono risultate piuttosto scarse a causa della limitata fotostabilità o della bassa fluorescenza di queste molecole. (**Figura 1.18**)

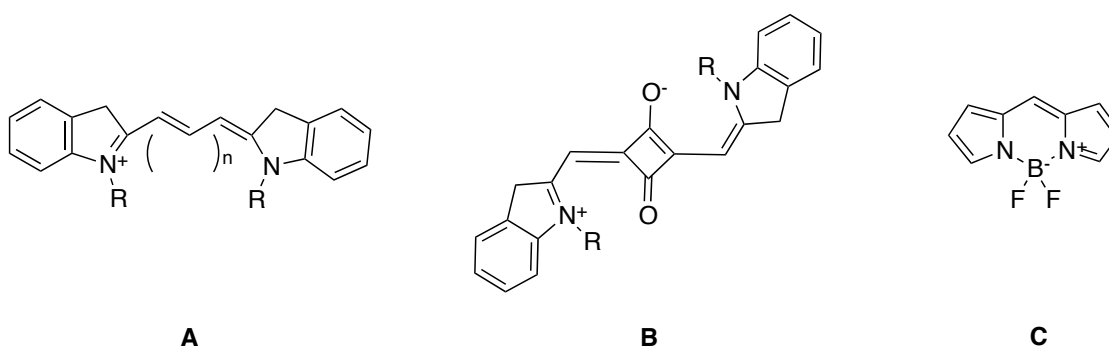


Figura 1.18. Strutture generali della cianina (A), squarina (B) e **BODIPY** (C).

³⁰ S.Luo, E.Zhang, Y.Su, T.Cheng, C.Shi. *Biomaterials*. **2011**, 32: 7127–7138.

Al contrario, il **DPP** si è rivelato un ottimo *building block* per produrre coloranti **NIR** stabili. Un esempio di sonda **NIR**³¹ utile nel campo dell'elettronica molecolare e optoelettronica, oltre che nella progettazione di sonde molecolari per Bioimaging, è di seguito riportato in **Figura 1.19**.

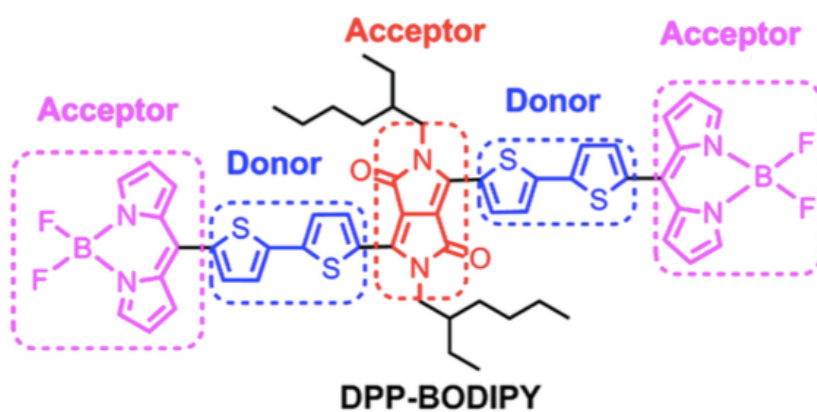


Figura 1.19. Derivato del DPP utile come sono nel **NIR**.

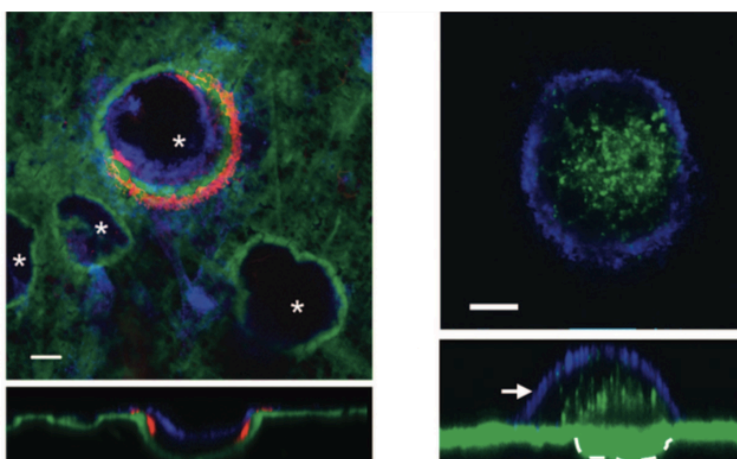
³¹ Y.Wang, J.Chen, Y.Zhen, H.Jiang, G.Yu, Y.Liu, E.Baranoff, H.Tan, W.Zhu. *Materials Letters*. **2015**, 139: 130–133.

SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro nasce dalla collaborazione del gruppo di ricerca del Prof. De Lucchi (presso cui si svolta questa tesi), il Dr. Alessandro Scarso dell'Università Ca' Foscari di Venezia e il gruppo di ricerca del Prof. McKenna della University of Southern California. Gli obiettivi di questa tesi sono:

- Realizzare precursori di sonde fluorescenti a partire dal **DPP** per potervi ancorare principi attivi farmaceutici (*Active Pharmaceutical Ingredients, API*) della classe dei bisfosfonati;
- Uno studio preliminare che permetta di realizzare sonde **NIR** per la stessa classe di **API** descritta in precedenza;
- Legare l'**API** alle sonde prodotte.

Quello che si vuole studiare con questo tipo di sonde è l'efficacia dei **BPs** rispetto il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti in vitro. Il gruppo di McKenna è stato in grado di progettare un "*magic linker*" per poter legare efficacemente il **BP** a sonda fluorescenti.³² Il fluoroforo scelto è stata la fluoresceina che ha dimostrato non solo alta affinità, ma anche un'ottima stabilità chimico-fisica una volta legata all'**API**. In **Figura 2.1** è possibile vedere la sintesi del "*magic linker*" e gli studi condotti in vitro dell'attività del **BP** su una superficie di dentina.



³² B.A.Kashemirov, J.L.F.Bala, X.Chen, F.H.Ebertino, Z.Xia, R.G.G.Russell, F.P.Coxon, A.J.Roelofs, M.J.Rogers, C.E.McKenna. *Bioconjugate Chem.* **2008**; 19, 2308-2310.

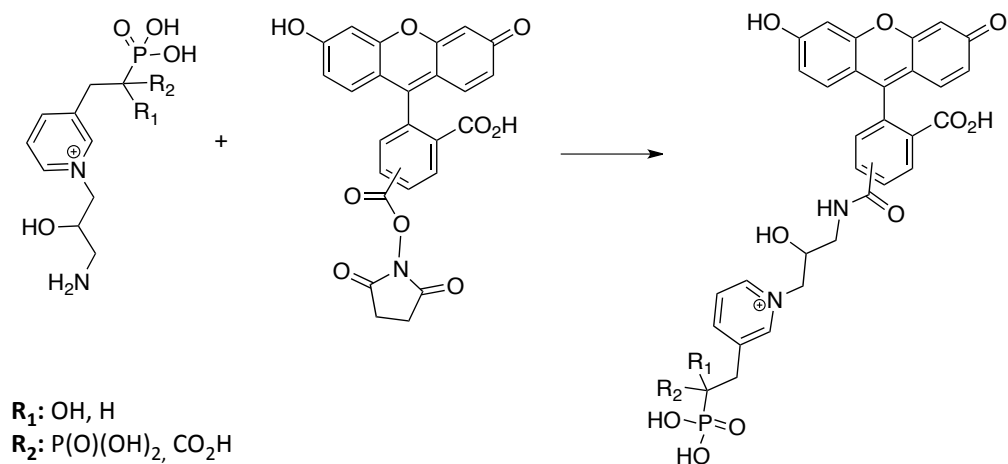


Figura 2.1. "Magic linker" e fluoresceina legata al BP sulla superficie di dentina.

Da un punto di vista strutturale la nostra sonda deve soddisfare i seguenti requisiti: (i) l'ovvio fluoroforo **DPP** per seguire l'attività del **BP**; (ii) delle funzionalità atte ad ancorare l'**API**, che coinvolgeranno l'azoto lattamico; (iii) il legame che lega il fluoroforo al bisfosfonato deve produrre una struttura protonabile in ambiente biologico in quanto si è visto che un azoto protonabile nella struttura del **BP** ne incrementa notevolmente l'attività e favorisce l'ancoraggio all'osteoclasto; (iv) bisogna prevedere la possibilità di espandere il "core" attraverso opportune reazioni chimiche che spostino la sua fluorescenza nel **NIR**. Le citate caratteristiche strutturali sono esemplificate in **Figura 2.2**.

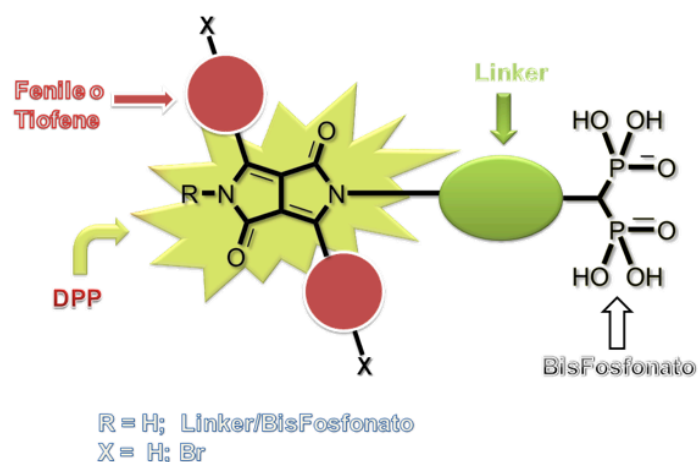
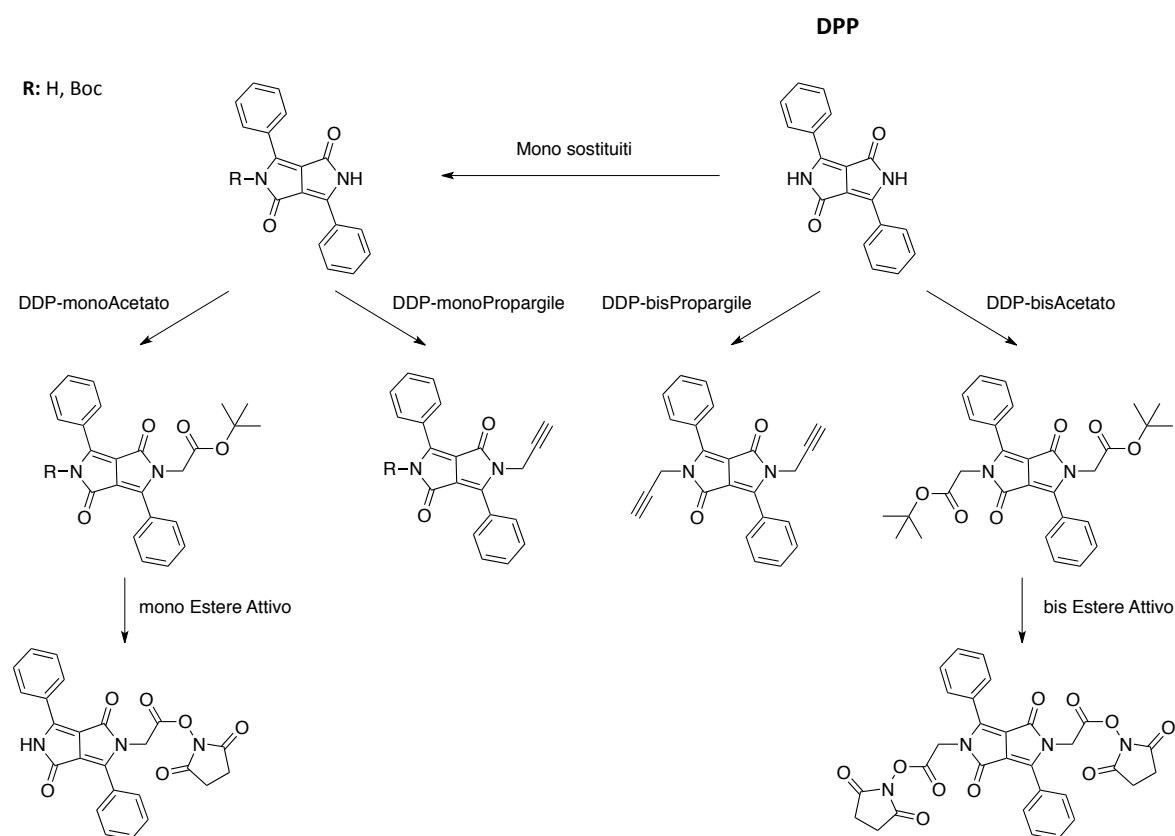


Figura 2.2. Sonda molecolare legata all'API.

In base ai requisiti richiesti, si è disegnato un protocollo sintetico messo a punto in questa tesi, che permette di realizzare il precursore-sonda capace di legarsi al farmaco attraverso reazioni di esterificazione e di tipo "click chemistry". I due percorsi sintetici prevedono la realizzazione di molecole sia monofunzionali che bifunzionali come da **Schema 2.1**.



Schema 2.1. Sintesi delle sonde fluorescenti.

E' stata inoltre iniziata la sintesi di una sonda di fluorescenza **NIR** avente residui bifunzionali di tipo estere attivo. (**Figura 2.3**)

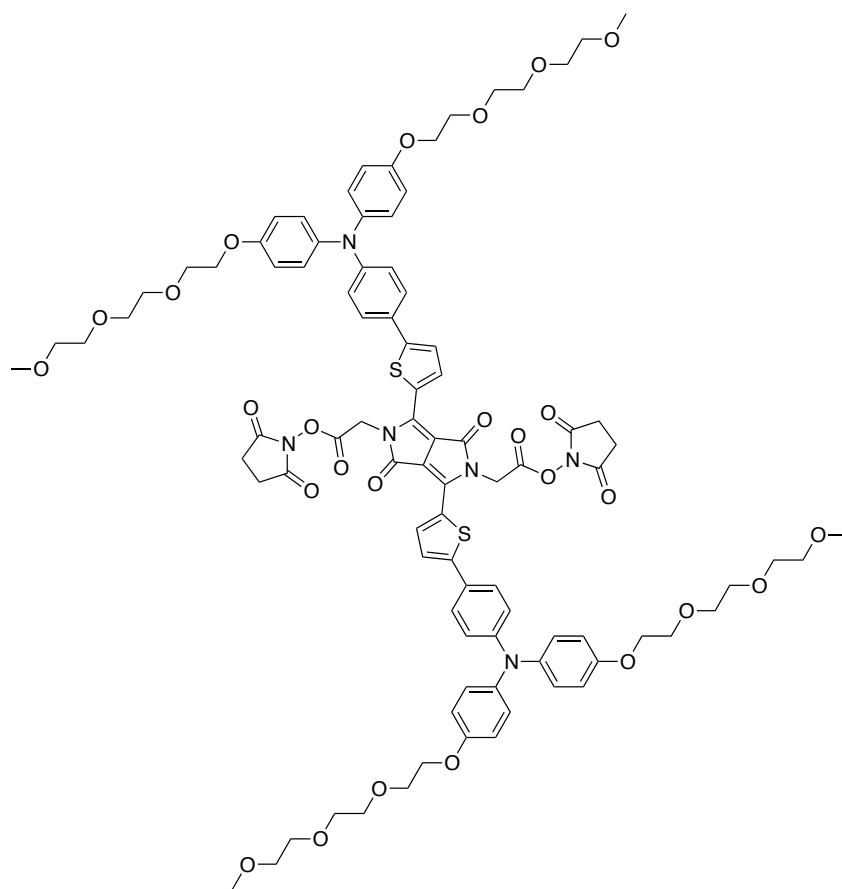
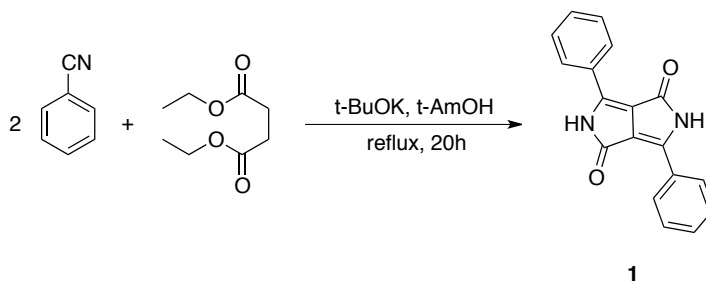


Figura 2.3. NIR-DPP.

DISCUSSIONE E RISULTATI

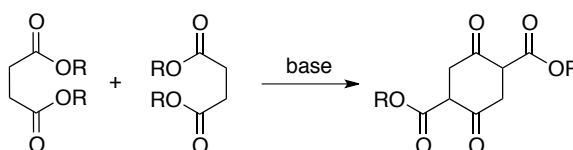
3.1 Sintesi del DPP e DPP-NBoc protetti

La sintesi del substrato di partenza di **DPP**, descritta nella sezione introduttiva, è raffigurata nello **Schema** di reazione **3.1**.



Schema 3.1. Sintesi del precursore **1**.

La sintesi prevede una reazione di condensazione pseudo-Stobbe tra il dietil succinato e il benzonitrile in presenza di una base forte e di un solvente protico (***t-AmOH***). Per evitare che l'estere reagisca per dare un'autocondensazione (**Schema 3.2**) e per minimizzare la formazione di prodotti indesiderati, si sono ricercate le condizioni ottimali per la condensazione dell'estere con il benzonitrile. Si è scoperto che ciò è possibile utilizzando esteri succinici con gruppi alchilici stericamente ingombrati; in termini di resa, i migliori risultati si ottengono con l'impiego del *ter*-amil succinato per la produzione di **DPPs** con anelli aromatici sostituiti da gruppi alogeno. Di estrema importanza risultano anche l'ordine e la velocità di aggiunta dei reagenti.

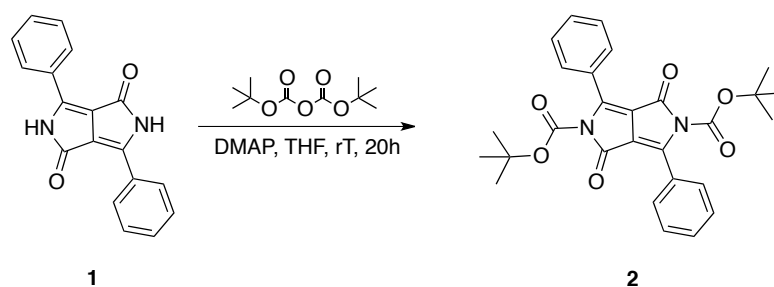


Schema 3.2. Autocondensazione tra esteri succinici.

3.1.1 Sintesi DPP bisBoc

La sintesi di substrato **DPP** monoBoc prevede la protezione degli atomi di azoto dei due anelli pirrolidinici con gruppi *t*-Boc seguita da selettiva monodeprotezione su silice.

Il primo passaggio sintetico consiste nella sintesi del precursore **2** secondo lo **Schema 3.3**.

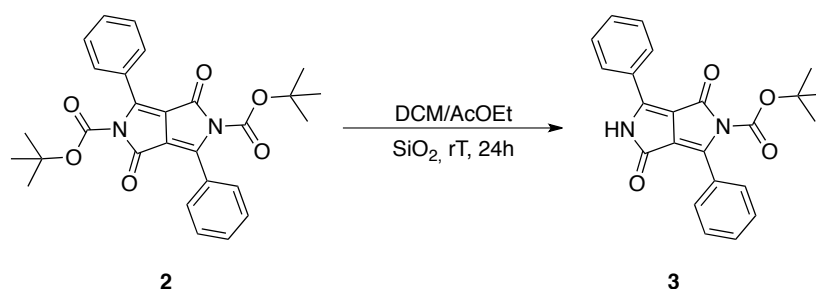


Schema 3.3. Sintesi dell'intermedio **2**.

Il prodotto **2** è ottenuto attraverso reazione del **DPP** con di-*tert*-butil-dicarbonato (**ABoc**), utilizzando *N,N'*-dimetilamminopiridina (**DMAP**) come catalizzatore in tetraidrofurano (**THF**) come solvente. Il prodotto viene ottenuto con resa quantitativa e utilizzato per il successivo passaggio sintetico senza necessità di purificazione. La protezione dei gruppi lattamici assolve la funzione di aumentare la solubilità del substrato in solventi organici, rompendo le interazioni non covalenti tra le molecole di **DPP**, incrementandone la reattività.

3.1.2 Monodeprotezione DPP bisBoc

Il DPP monoBoc **3** è stato ottenuto per monodeprotezione selettiva di **2**.

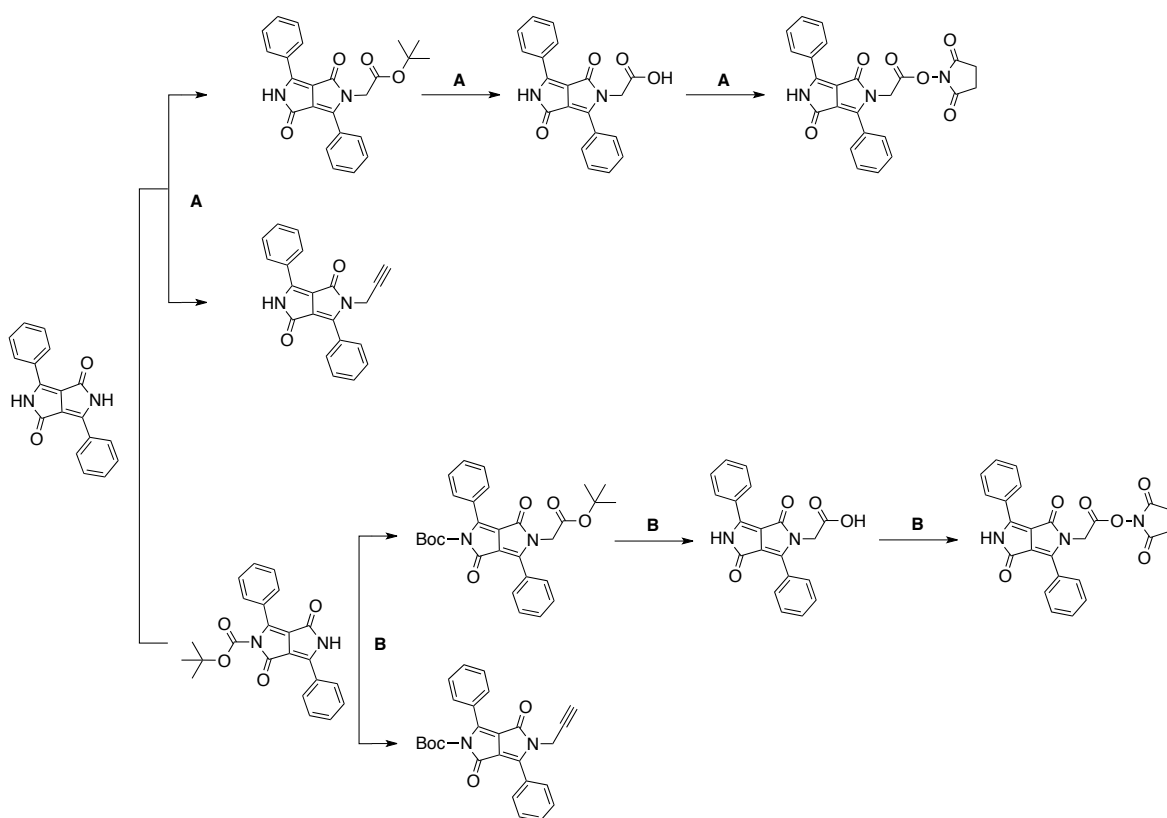


Schema 3.4. Sintesi del DPP-monoBoc **3**.

Il reagente **2** viene sciolto nella minima quantità di diclorometano (**DCM**), si aggiunge successivamente la silice e il solvente viene rimosso a pressione ridotta. La blanda azione acida della SiO₂ permette, dopo 24 ore sotto alto vuoto, la selettiva deprotezione di una delle due protezioni **t-Boc**. Il prodotto **3** è recuperato attraverso purificazione con colonna cromatografica in una miscela di **DCM/AcOEt** (9:1). Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 62% assieme a due sottoprodotti: il reagente **2** e il pigmento rimasto intrappolato nella SiO₂.

3.2 Sintesi di sonde fluorescenti

Per realizzare le sonde fluorescenti mono-sostituite descritte in "Scopo della Tesi" si è deciso di esplorare due percorsi sintetici. Il percorso **A** prevede la selettiva monoalchilazione del **DPP** con propargil bromuro oppure con *tert*-butil bromoacetato. Il percorso **B**, invece, prevede di alchilare con i medesimi reagenti il **DPP** monoBoc, come da sintesi precedentemente descritta. La via **A** è sicuramente più semplice e corretta in termini di *Atom Economy*, mentre la via **B** è più lunga, ma presenta il vantaggio di lavorare con substrati sempre solubili.

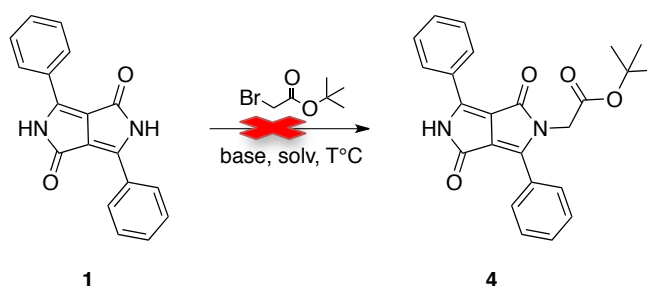


Schema 3.5. Schema di sintesi in generale.

In questo lavoro di tesi, entrambe le vie sono state percorse, privilegiando in prima istanza la via A poiché più diretta.

3.2.1 Sintesi diretta del DPP monoEstereAttivo

Seguendo l'approccio descritto precedentemente, si è cercato di unire **1** alla molecola di *tert*-butil bromoacetato (**Schema 3.6**). Le condizioni di reazione provate di **1** con l'acetato alogenato sono riassunte in **Tabella 3.1**. Si sono provate diverse basi e solventi, purtroppo tutte con esito negativo o insoddisfacente e non si è riusciti a isolare il prodotto **4**.



Schema 3.6. Sintesi DPP-monoacetato.

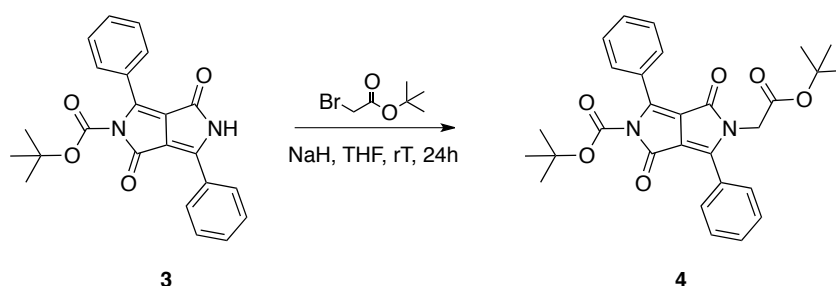
Inizialmente si è testata la coppia **NaH/THF**, combinazione di base e solvente con esiti soddisfacenti su substrati analoghi. Tuttavia, a causa della scarsa reattività dell'elettrofilo impiegato, la reazione non ha portato all'esito sperato ma al recupero del reagente inalterato. I migliori risultati si sono ottenuti con le coppie base/solvente *tert*-butilammonio idrossido trenta idrato (**TBAOH*30H₂O**)/**THF** e **K₂CO₃/THF**. Purtroppo le complesse fasi di lavorazione delle miscele di reazione per recuperare il prodotto desiderato, contenenti una notevole quantità sia di pigmento in soluzione che di prodotto bi-sostituito, hanno suggerito di abbandonare questa strada.

Prova	Base	Solvente	Temperatura	Tempo	Esito
1	NaH	THF	rT	12 h	negativo
2	TBAOH*30H ₂ O	THF	rT	24 h	31%
3	TBAOH*30H ₂ O	DMF	rT	24 h	negativo
4	K ₂ CO ₃	DMF	rT	24 h	35%
5	TBAOH*30H ₂ O	THF	60°C	24 h	negativo

Tabella 3.1: Tentativi di sostituzione del *tert*-butil bromoacetato su **1**.

3.2.2 Sintesi indiretta del DPP monoEstereAttivo

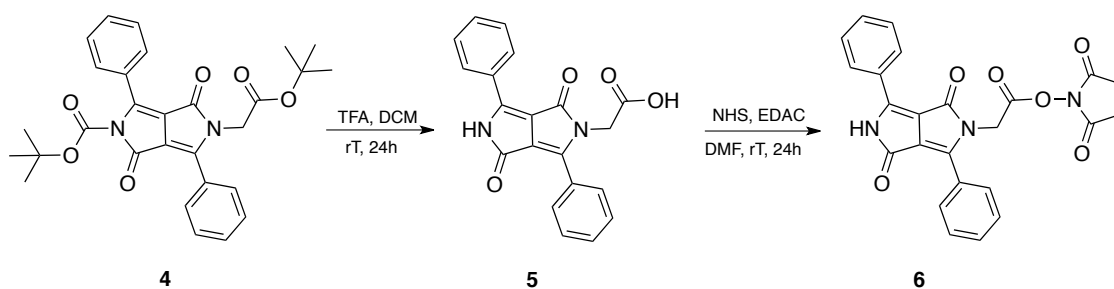
Il substrato desiderato **4** è stato ottenuto più agevolmente a partire dal **DPP** monoboc **3**. Le condizioni di reazione provate (**NaH/THF** a rt) hanno portato ad ottenere il prodotto **4** in resa quantitativa e senza necessità di ulteriori purificazioni.



Schema 3.7. Sintesi del **DPP**-monoacetato **4** dal **DPP**-monoBoc **3**.

3.2.3 Sintesi del DPP monoEstereAttivo

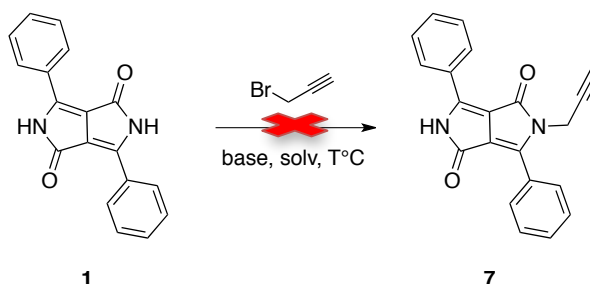
I risultati soddisfacenti prodotti dalla reazione di **3** con il *tert*-butil bromoacetato (**Schema 3.7**), hanno dato la possibilità di ultimare la sintesi della sonda molecolare di fluorescenza mono sostituita **6**. Dopo aver rimosso il gruppo protettore e la funzione *tert*-butilica con una semplice reazione in **TFA** e **DCM**, è possibile generare l'estere attivo tramite una particolare reazione di esterificazione impiegata nella chimica dei peptidi che utilizza *N*-(3-Dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimmide cloridrato (**EDAC**) e *N*-idrossisuccinimide (**NHS**). Il prodotto **6** viene ottenuto precipitando con ghiaccio la miscela di reazione con resa dell'82%.



Schema 3.8. Sintesi della sonda mono-funzionalizzata **6**.

3.2.4 Sintesi diretta del DPP monoPropargile

In analogia a quanto descritto per il *tert*-butil bromoacetato (**Schema 3.6**), si è cercato di unire direttamente **1** e il bromo propargile. Le condizioni di reazione provate, le diverse basi e i solventi, sono riassunte in **Tabella 3.2**.



Schema 3.9: Reazione tra **DPP** e bromo propargile.

Inizialmente si è testato il **TBAOH** come base, il quale aveva esibito esiti soddisfacenti su substrati analoghi in **THF** e **DMF**.

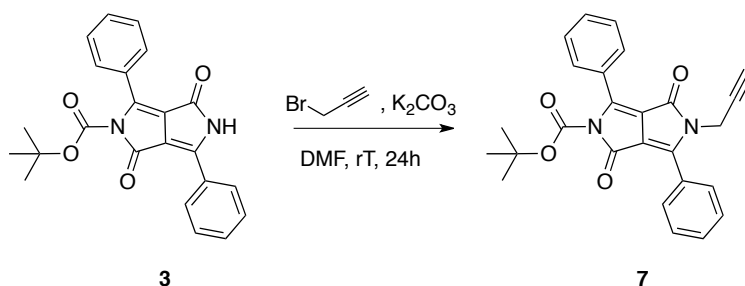
Prova	Base	Solvente	Temperatura	Tempo	Esito
1	TBAOH *30H ₂ O	THF	rT	24 h	27%
2	TBAOH *30H ₂ O	DMF	rT	24 h	negativo
3	K ₂ CO ₃	DMF	rT	24 h	negativo

Tabella 3.2: Tentativi di sostituzione del bromo propargile su **1**.

Purtroppo, anche in questo caso, le reazioni hanno avuto esito negativo o insoddisfacente e si è quindi reso necessario l'uso del **DPP** monoBoc come substrato di partenza.

3.2.5 Sintesi indiretta del DPP-monoPropargile

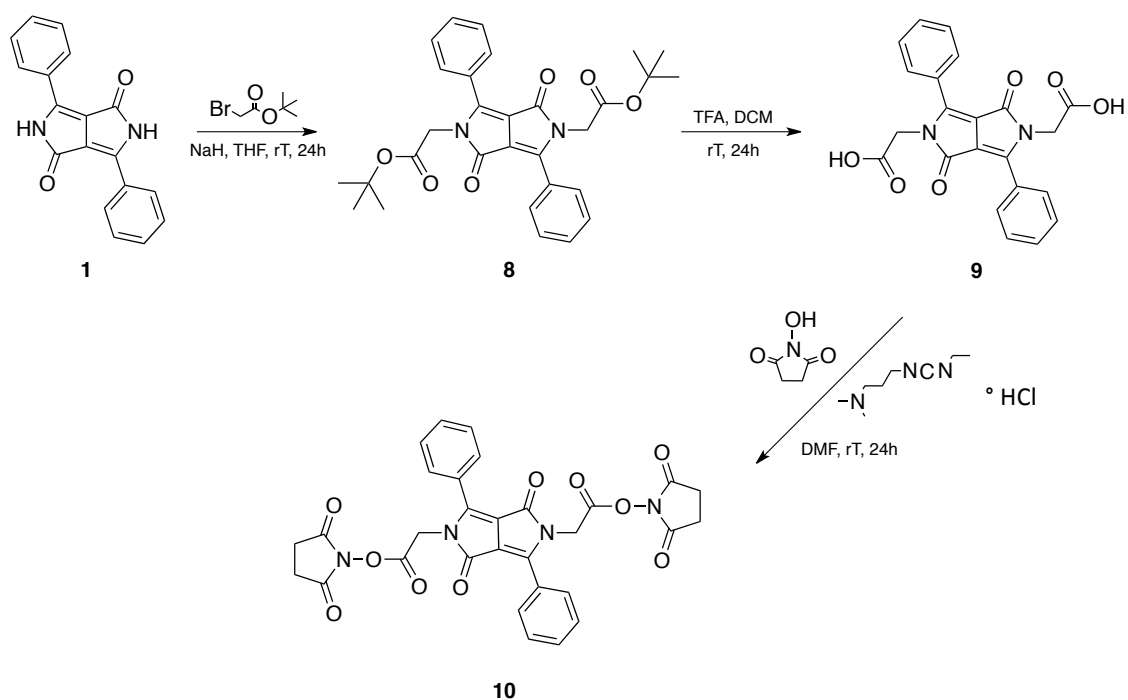
La reazione mostrata nello **Schema** sintetico **3.10** ha portato all'ottenimento del prodotto desiderato **7** (cui è legato il gruppo protettivo **t-Boc**) con resa quantitativa e senza necessità di purificazione, inoltre **7** possiede una buona solubilità; questa caratteristica è successiva reazioni di "*Click Chemistry*" a cui dev'essere sottoposto.



Schema 3.10: Reazione tra **DPP** monoBoc e bromo propargile.

3.2.6 Sintesi del DPP bisEstereAttivo

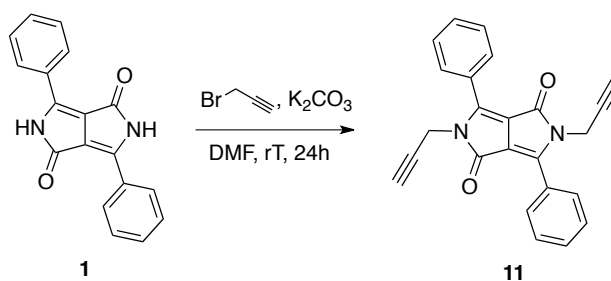
Con procedure simili ma molto meno complesse, sono stati realizzati anche i derivati **DPP**-bisEstereAttivo recanti due siti d'accatto per il farmaco **BP**. Lo schema della reazione è di seguito riportato.



Schema 3.11. Strategia sintetica per la realizzazione della sonda bis-funzionalizzata **10**.

3.2.7 Sintesi del DPP bisPropargile

Il derivato bisostituito **11** è stato facilmente realizzato partendo dal cromoforo **1** per reazione di sostituzione nucleofila con il reagente. Lo schema della reazione è di seguito riportato. Il prodotto **11** risulta poco solubile in solventi organici, rendendo difficile un suo impiego in reazioni successive.



Schema 3.12: Sintesi del DPP bis-funzionalizzato.

3.3 Studio delle proprietà ottiche delle sonde sintetizzate

I parametri opto-elettronici delle molecole presentate nel precedente paragrafo sono stati studiati mediante spettroscopia di assorbimento **UV-Vis** e confronto con i corrispondenti spettri di emissione di fluorescenza per risalire ai valori di *Stokes shift*.³³ Lo *Stokes shift* di un fluoroforo è la differenza tra i suoi massimi di emissione e di assorbimento, $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ass}$, ed è una misurazione diretta delle energie vibrazionali della molecola.

Tutti gli spettri registrati sono in soluzione di **DMSO**, con un *cut-off* del solvente³⁴ pari a 330 nm (al di sotto del *range* d'interesse per le indagini effettuate).

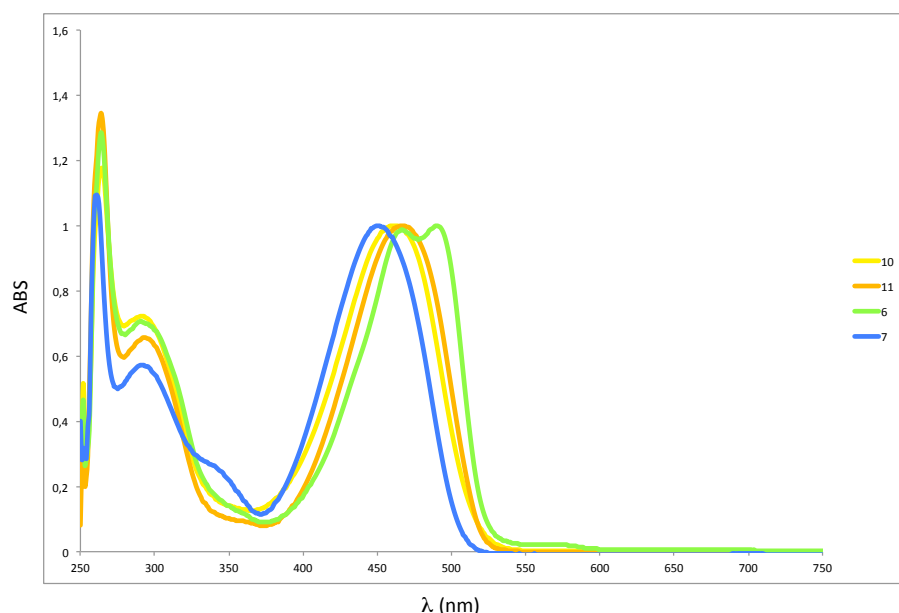


Figura 3.1. Spettri di assorbimento **UV-Vis** delle sonde sintetizzate.

³³ Stokes, G. G. *Phil. Tans. R. Soc. London.* **1852**; *142*, 463-562.

³⁴ (a) Friedel, R. A.; Orchin, M. "Ultraviolet spectra of aromatic compounds", ed. Wiley, New York, **1951**. (b) Hirayama, K. "Handbook of UV & visible absorption spectra of organic compounds", Plenum Press, **1967**. (c) Sadtler "Handbook of UV spectra", Heyden, London, **1979**. (d) Scott, A. J. "Interpretation of UV spectra of natural products", Pergamon Press, London, **1964**. (e) Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1123. (f) Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 72.

Nelle figure sottostanti si possono osservare gli spettri di assorbimento **UV-Vis** ed emissione di fluorescenza (con valori di intensità massima normalizzati) relativi alle sonde fluorescenti sintetizzate.

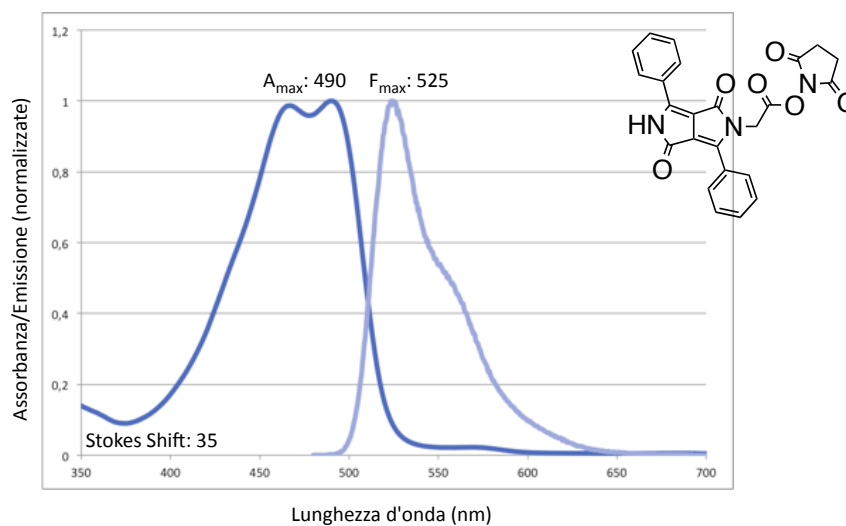


Figura 3.2. Spettro di assorbimento **UV-Vis** e fluorescenza di **6**.

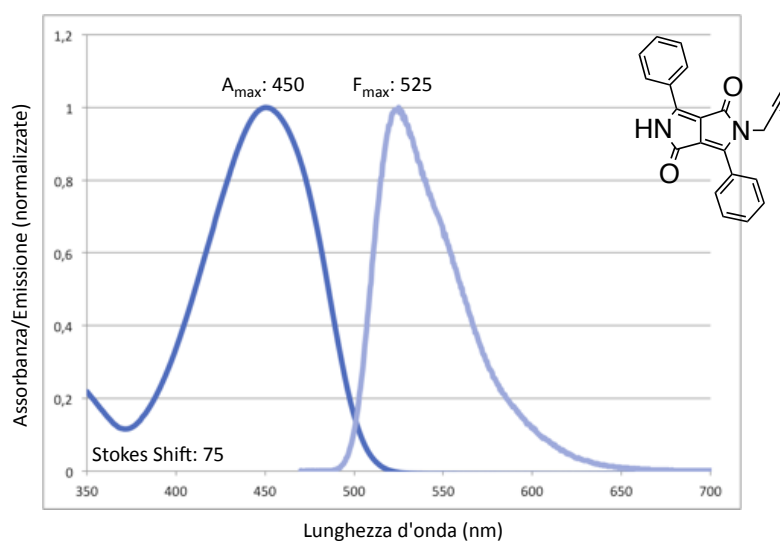


Figura 3.3. Spettro di assorbimento **UV-Vis** e fluorescenza di **7**.

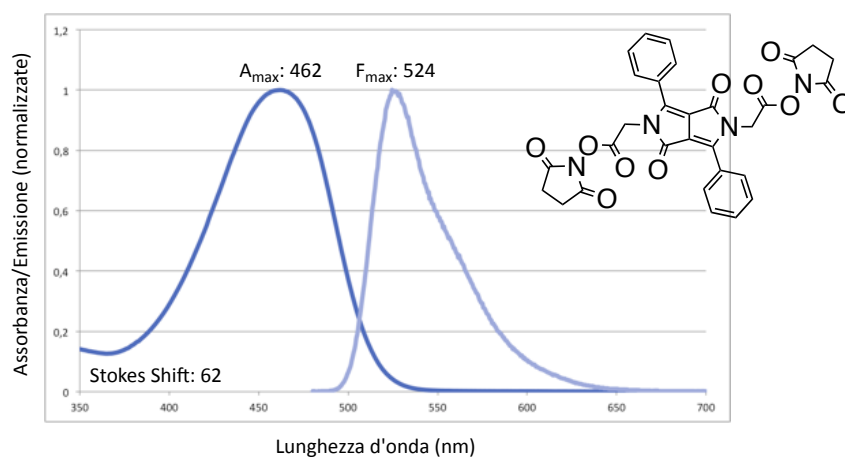


Figura 3.4. Spettro di assorbimento UV-Vis e fluorescenza di **10**.

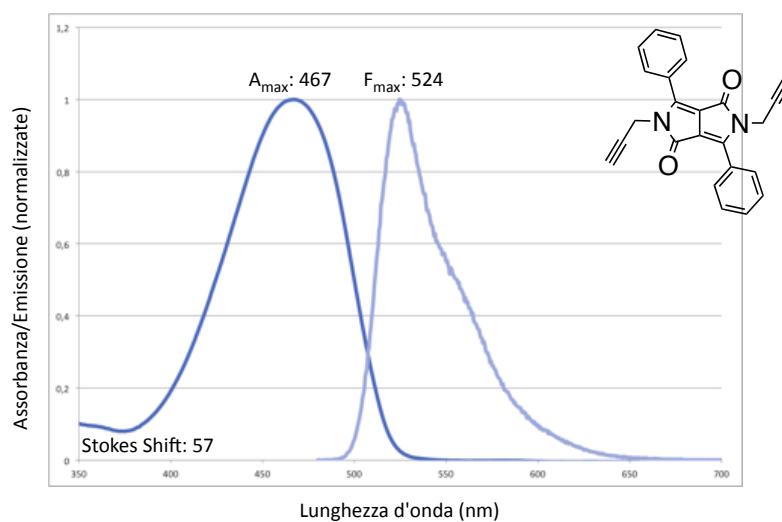
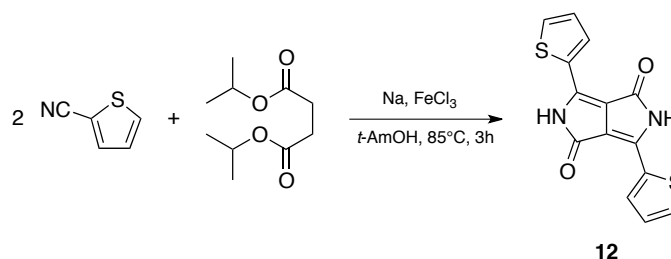


Figura 3.5. Spettro di assorbimento UV-Vis e fluorescenza di **11**.

L'assorbimento massimo in soluzione varia tra 450 e 490 nm. I valori di *Stokes shift* osservati rientrano mediamente nell'intervallo di 60-75 nm, eccezion fatta per il composto **6**, caratterizzato da un valore pari a 35 nm.

3.4 Sintesi del DPP Tiofene

La sintesi del substrato di partenza di **DPP** con gruppi tiofenici³⁵ è descritta nello **Schema** di reazione **3.13** ed è del tutto analoga a quella già descritta per **1**.



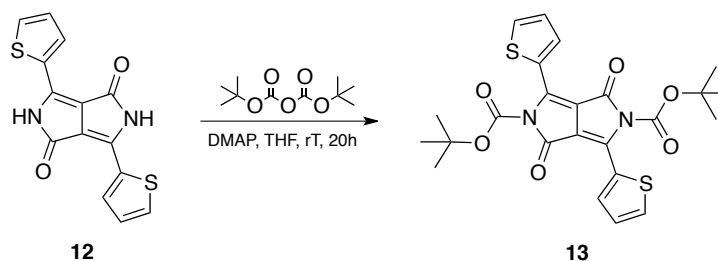
Schema 3.13. Sintesi del precursore **12**.

La sintesi prevede una reazione di condensazione pseudo-Stobbe tra il diisopropil succinato in *t*-AmOH con la presenza di FeCl₃ e sodio metallico.

3.4.1 Sintesi DPP Tiofene bisBoc

La sintesi del substrato **DPP** TiofeneBromo prevede la protezione degli atomi di azoto di **12** dei due anelli pirrolidinici con gruppi *t*-Boc seguita da una bromurazione dei sostituenti tiofenici con **NBS**.

Il primo passaggio sintetico consiste nella sintesi del precursore **13**³⁶ secondo lo **Schema 3.14**.



Schema 3.14. Sintesi dell'intermedio **13**.

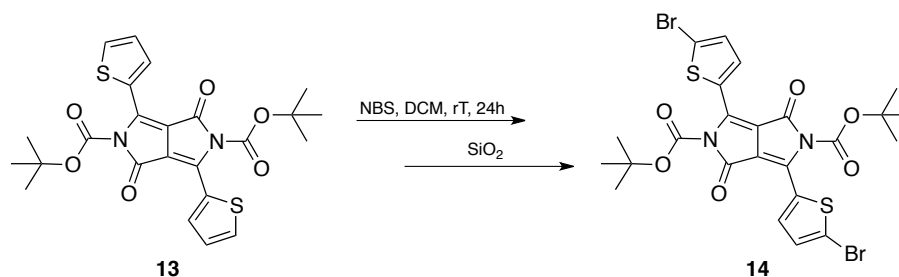
³⁵ E. Zhou, S. Yamakawa, K. Tajima, C. Yang, K. Hashimoto, *Chem. Mater.* **2009**; 21, 4055.

³⁶ A. B. Tamayo, B. Walker, T.-Q. Nguyen, *J. Phys. Chem. C.* **2008**; 112, 11545.

Il prodotto **13** è ottenuto attraverso reazione di **12** con di-*tert*-butil-dicarbonato, utilizzando **DMAP** come catalizzatore in **THF** come solvente. Il prodotto viene ottenuto con resa del 76% e utilizzato per il successivo passaggio sintetico senza necessità di purificazione.

3.4.2 Bromurazione del DPP Tiofene bisBoc

Il **DPP** TiofeneBromo **14**³⁷ è stato ottenuto per bromurazione di **13**. La presenza dell'alogeno sull'anello tiofenico è indispensabile per poter condurre un *cross coupling* e legare la trifenilammina-**TEG** sostituita.



Schema 3.15. Sintesi in due steps del substrato bromurato **14**.

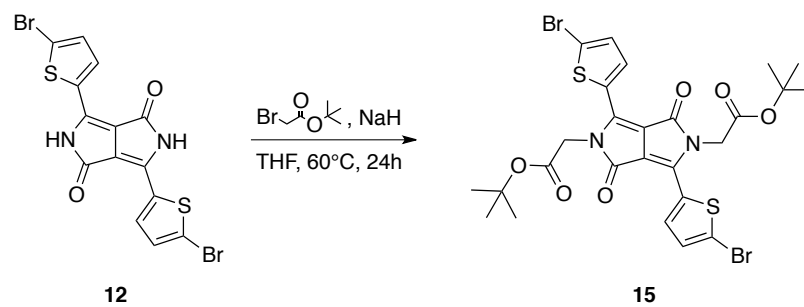
Il reagente **13** viene sciolto in **DCM** anidro e si aggiunge **NBS**, conducendo la reazione al buio e in ambiente anidro. Dopo lavorazione del grezzo di reazione e conseguente cromatografia, il prodotto bromurato viene ottenuto con una resa del 40% mentre il restante 60% è dato dal prodotto **DPP** TiofeneBromo deprotetto. Questo prodotto sarà quello impiegato nella reazione successiva.

3.4.3 Sintesi del DPP TiofeneBromo bisAcetato

Riprendendo la sintesi di **8**, che aveva dato risultati soddisfacenti con il *tert*-butil bromoacetato (**Schema 3.11**), è stato sintetizzato l'intermedio bi-sostituito con una resa

³⁷ J.Lee, A.R.Han, J.Hong, J.H.Seo, J.H.Oh, C. Yang. *Adv. Funct. Mater.* **2012**; 22, 4128–4138.

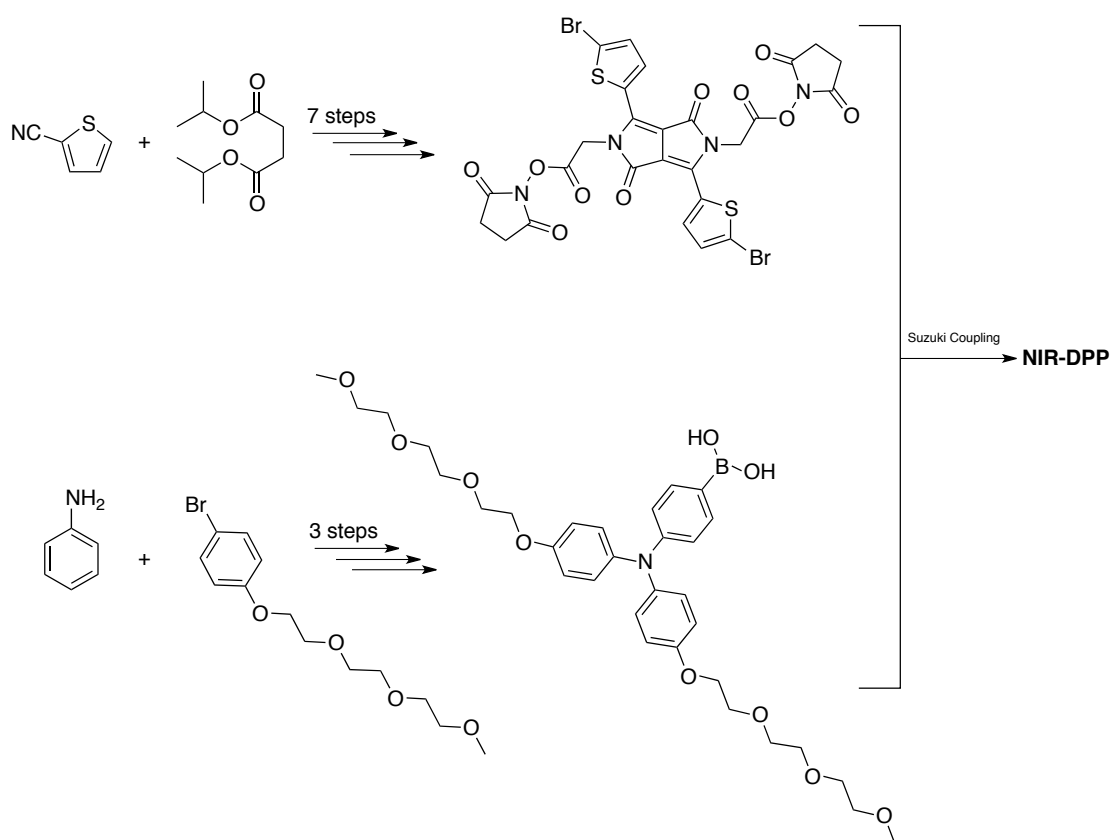
del 79%. Per questioni tempistiche non si è riusciti a raggiungere la forma di estere attivo che prevedeva altri due passaggi sintetici.



Schema 3.16. Sintesi del **DPP** TiofeneBr bisAcetato.

3.5 Sintesi sonde in fluorescenza NIR

Come precedentemente descritto nella sezione introduttiva, durante questo periodo di tesi, si è iniziata la realizzazione della sonda di fluorescenza nel **NIR**. Nella schema sotto riportato se ne descrive il percorso sintetico. Per problemi di tempistica la sintesi dell'estere attivo, che prevede 7 passaggi si è fermata alla realizzazione di **15**, mentre per quanto riguarda la trifenilammina con catene **TEG**, la realizzazione si è interrotta al bromo derivato, precursore dell'acido boronico.

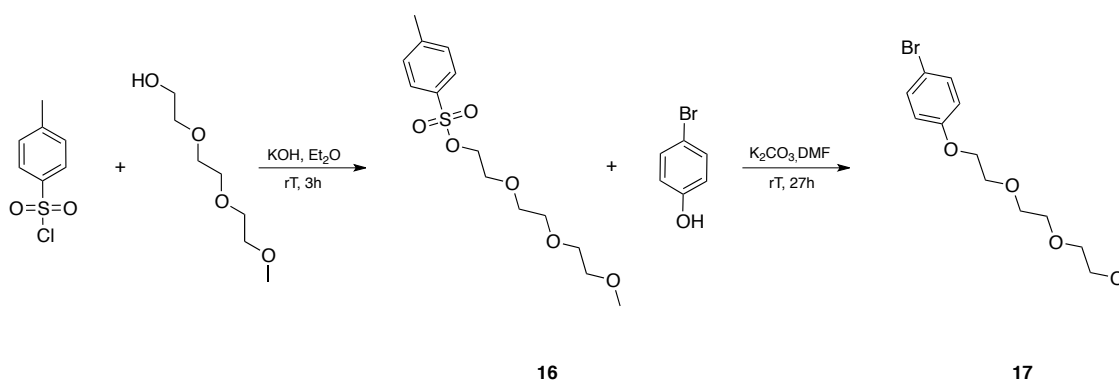


Schema 3.17. Sintesi **NIR-DPP**.

Si è deciso di realizzare questo tipo di ammina perché essendo elettrondonatrice consente di spostare la fluorescenza del substrato nel NIR, inoltre, i gruppi **TEG** dovrebbero mantenere una buona solubilità del sensore finale in acqua.

3.5.1 Sintesi del *p*-bromofenile-TEG

La sintesi del *p*-bromofenile-TEG è una sintesi in due passaggi che prevede nel primo stadio la tosilazione del glicole trietilenico ad opera del *p*-toluensulfonil cloruro. La reazione è condotta in Et₂O/H₂O, dalla quale si ottiene l'intermedio **16** sotto forma di olio.³⁸ La catena TEG tosilata viene successivamente fatta reagire con il Bromo fenolo per ottenere il precursore **17**. Il prodotto così ottenuto viene successivamente purificato mediante colonna cromatografica (eluente: Cy/AcOEt 9:1) con una resa pari a 84%.

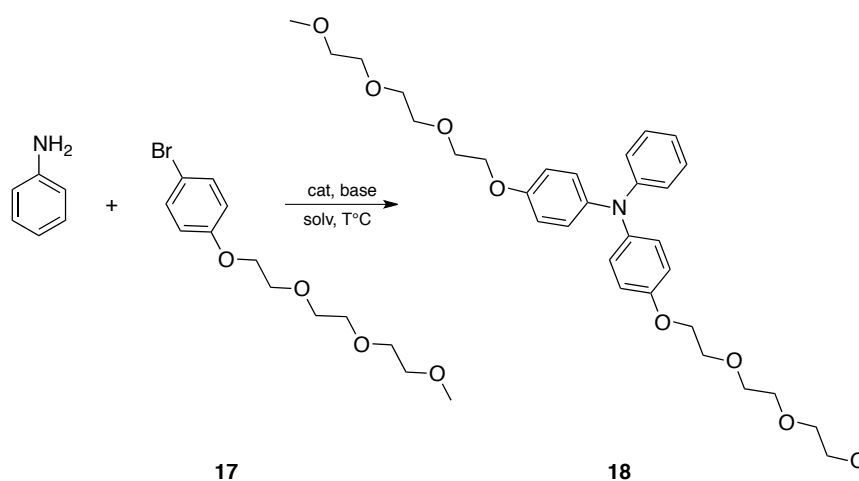


Schema 3.18. Sintesi dei precursori **16** e **17**.

3.5.2 Sintesi della trifenilammina-TEG

La trifenilammina-TEG è stata ottenuta attraverso un'amminazione di Buchwald-Hartwig che è una reazione di accoppiamento ossidativo mediata dal palladio, che permette la formazione di un legame carbonio-azoto. Le condizioni di reazione provate per legare **17** con l'anilina per ottenere **18** sono riassunte in **Tabella 3.3**. Si sono provate diverse basi e catalizzatori palladio con diverse fosfine.

³⁸M.Rosso, A.T.Nguyen, E.deJong, J.Baggerman, J.M.J.Paulusse, M.Giesbers, R.G.Fokkink, W.Norde, K.Schroën, C.J.M.vanRijn, H.Zuilhof. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2011**; 3, 697–704.



Schema 3.18. Sintesi della trifenilammina-TEG sostituita **18**.

Inizialmente si è testata la coppia $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(t\text{-Bu})_3$ utilizzando $t\text{-BuOK}$ come base, con esiti soddisfacenti su substrati analoghi, ma che nelle prove iniziali non ha portata all'esito desiderato ma ad una miscela di prodotti di difficile separazione. Si è provata anche la coppia $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(t\text{-Bu})_3$ utilizzando questa volta il $t\text{-BuONa}$, come da letteratura³⁹ nella quale veniva impiegata su un substrato analogo. Nel nostro caso però si è rivelata inefficace, portando al recupero dei reagenti inalterati. Anche la procedura descritta nel brevetto **BASF**⁴⁰ in cui vengono utilizzato il sistema $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{dppf}$ non ha prodotto gli esiti sperati. Tutte le reazioni sono condotte in toluene a riflusso.

Prova	Base	Cat	Tempo	Esito
1	$t\text{-BuOK}$	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(t\text{-Bu})_3$	24 h	negativo
2	$t\text{-BuONa}$	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(t\text{-Bu})_3$	48 h	negativo
3	$t\text{-BuONa}$	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{dppf}$	20 h	negativo
4	$t\text{-BuOK}$	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(t\text{-Bu})_3$	66 h	97%
5	$t\text{-BuONa}$	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(t\text{-Bu})_3$	66 h	28%

Tabella 3.3: Cross Coupling di Buckwald-Hartwing.

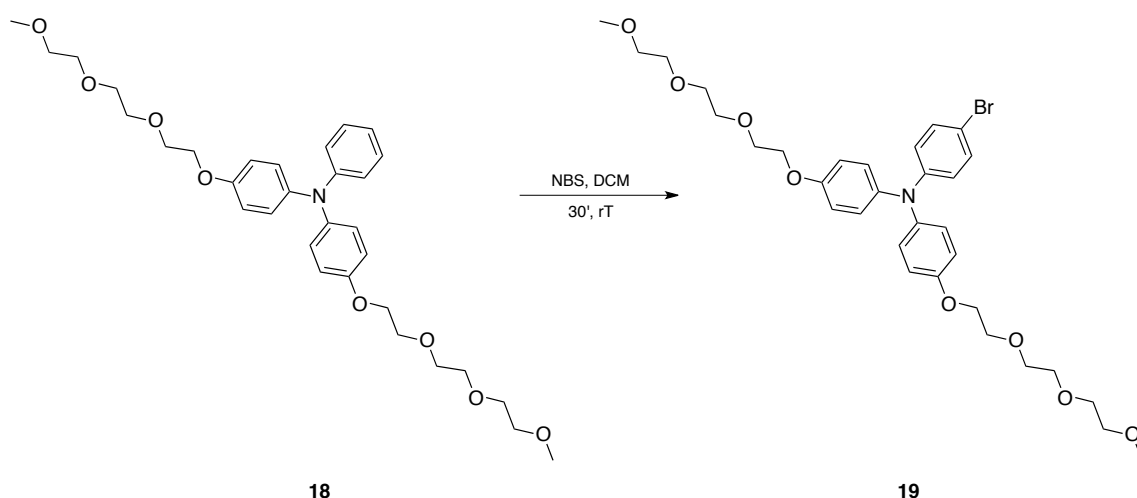
³⁹ H.Choi, J.Han, M.S.Kang, K.Song, J.Ko. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**; 35 (5): 1433-1439.

⁴⁰ T.Gessner, R.Sens, S.Ebert. BASF SE. Patent: US8586745 B2, **2013**; 27 (28).

Il prodotto desiderato **18** è stato ottenuto aumentando drasticamente gli equivalenti di fosfina (consumata anche dalla base poiché è stata impiegata la **(t-Bu)₃PH⁺BF₄⁻**) e allungando i tempi di reazione. Le condizioni migliori (**t-BuOK**/Toluene a riflusso con **Pd₂(dba)₃/P(t-Bu)₃** come catalizzatori) hanno portato ad ottenere il prodotto **18** in buona resa. Il prodotto viene purificato tramite estrazione e **Fc** (eluente: **AcOEt/Cy** 4:2).

3.5.3 Bromurazione della trifenilammina-TEG con NBS

Al fine di ottenere l'acido boronico descritto nello **Schema 3.17**, il quale si lega al **DPP** per ottenere la sonda finale, è necessario prima operare una bromurazione di **18** mediante **NBS**. La reazione è istantanea e porta all'ottenimento di **19** che viene purificato tramite **Fc** (eluente: **AcOEt/Cy** 4:2).



Schema 3.20. Bromurazione con **NBS**.

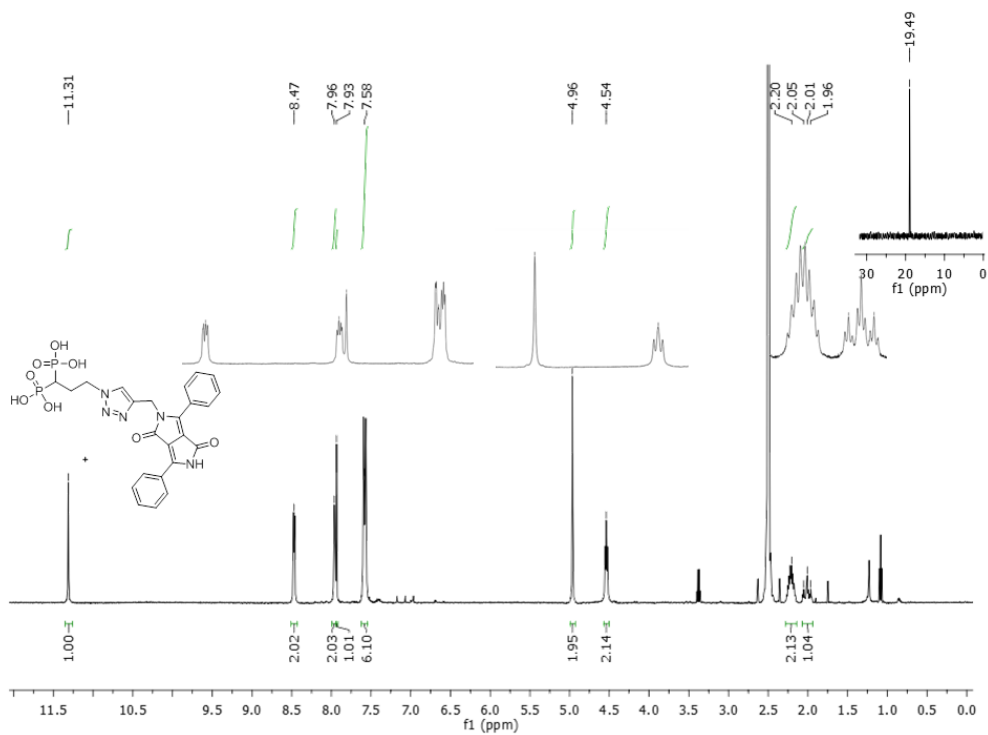
La trasformazione del gruppo funzionale bromo in acido boronico, attraverso reazione con reagenti *n*-alchillitio e B(OR)₃ è ancora in corso di studio, e verrà sviluppata in futuro presso il gruppo di ricerca in cui si è svolta questa tesi.

CONCLUSIONE E PROSPETTIVE

I risultati raggiunti durante questo periodo di tesi possono essere riassunti nei seguenti punti:

- Si sono sintetizzati e caratterizzati due **DPPs** mono funzionalizzati aventi funzionalità estere attivo o acetilene, in grado di reagire con **API** di tipo **BP** e quindi sfruttabili come sonde.
- Si sono sintetizzati e caratterizzati due **DPPs** bifunzionalizzati con le medesime funzionalità dei mono, e quindi in grado di assolvere alle stesse funzioni obbiettivo del presente lavoro.
- Le sonde prodotte oltre che essere caratterizzate strutturalmente (^1H NMR, ^{13}C NMR e ESI-MS), sono state caratterizzate anche dal punto di vista optoelettronico attraverso spettroscopia **UV-Vis** e di fluorescenza.
- Si è iniziata la sintesi di un sensore **NIR** per farmaci di tipo **BP** di grande potenzialità per l'imaging molecolare in campo biomedico da impiegare sia in vitro che in vivo.

La semplicità e linearità delle sequenze sintetiche proposte in questa tesi, con intermedi e prodotti finali ottenuti sempre in buona resa, ci ha permesso di produrre quattro lotti da 500 mg di sonde fluorescenti per i prodotti monoderivati **6** e **7** e bisderivati **10** e **11**. I campioni sono stati inviati presso University of Southern California nel gruppo di ricerca del Prof. McKenna, il quale ha già ottenuto con successo il triazolin-derivato (inserito in **Figura 4.1** assieme al suo spettro ^1H -NMR e ^{31}P -NMR) derivante dalla reazione "click" fra il bisfosfonato azide e il fluoroforo **7**.



Le valutazioni sull'attività biologica di questa sonda, come i test tossicologici sulla stessa sono ancora in corso di realizzazione.

PARTE SPERIMENTALE

5.1 Strumentazione, reagenti e solventi

Il grado di avanzamento delle reazioni viene verificato attraverso TLC POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ di 0.25 mm di spessore. Le cromatografie flash sono eseguite servendosi di gel di silice MERK 60, 0.04-0.063 mm / 230-400 mesh, seguendo il metodo e la tecnica proposti da Still.⁴¹ Gli spettri NMR sono registrati con uno spettrometro BRUKER AVANCE 300 MHz e VARIAN UNITY 400 MHz, utilizzando, come riferimento interno, il tetrametilsilano. Gli spettri NMR COSY sono ottenuti con la usuale sequenza di impulsi. Le trasformazioni lungo t1 e t2 sono pesate con le opportune *non-shifted sine functions* e fasate con la tecnica *absolute value*. Gli spettri NMR NOESY vengono ottenuti con la normale sequenza di impulsi e con un *mixing time* di 1.8 secondi. La massima sensibilità si ottiene non applicando alcuna funzione lungo t2 e con una *non shifted gaussian function* lungo t1. Gli spettri eterocorrelati sono ottenuti con la tecnica *reverse detection*. Lo spettro eterocorrelato HMQC permette di rilevare le correlazioni dirette $^1J_{CH}$, mentre lo spettro *multiple bond* HMBC fornisce le correlazioni a più lungo raggio $^nJ_{CH}$ (con in genere n = 2, 3). In un tipico esperimento sono state effettuate 256 misure lungo t1 con il metodo di acquisizione *phase sensitive*, con 16 (HMQC) o 32 (HMBC) scansioni per ogni valore di t1. Il ritardo per il filtro BIRD è tarato su un valore medio $^1J_{CH} = 140$ Hz, mentre il ritardo per il rilevamento delle correlazioni *multiple bond* è basato su $^nJ_{CH} = 5$ Hz. La trasformazione lungo t2 è effettuata su FID pesati da una funzione gaussiana, la trasformazione lungo t1 è preceduta dall'applicazione di una funzione gaussiana e da *zero filling*. Gli spettri HMBC sono in genere deturpati da elevato rumore lungo t1. Il rumore è rimosso mediante l'applicazione a ogni traccia (punti lungo la direzione orizzontale nello spettro) di una maschera formata dai valori massimi e minimi delle tracce raccolte in un intervallo privo di segnali. I valori positivi (negativi) di ogni traccia sono sottratti ai valori positivi (negativi) della maschera, o azzerati se nell'operazione il segno del valore cambia. Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro di massa Finnigan LCQ Deca XP Max con sorgente ESI in modalita' positiva, utilizzando come solvente **MeOH**.

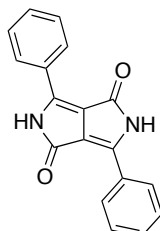
⁴¹ Still, W.C.; Kahn, M; Mitra, A.J. *Org. Chem.* **1987**, *43*, p. 2923.

Tutti i reagenti e i solventi commerciali sono impiegati senza ulteriori purificazioni. I solventi definiti “anidri” vengono purificati secondo procedure riportate in letteratura.⁴²

⁴² (a) Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**. (b) D.Bradley, G.Williams, M.Lawton. *J. Org. Chem.* **2010**.

5.2 Procedure sperimentali

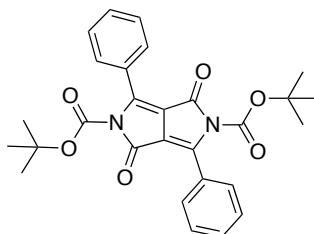
3,6-difenilpirrolo[3,4-c]pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (1)



In un pallone a tre colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti **t-BuOK** (43 g, 0.38 mmol) e 2-metil-2-butanolo anidro (225 mL). La soluzione viene portata a 130°C fino ad avere il riflusso di solvente. Si aggiunge quindi benzonitrile (16.4 mL, 0.16 mmol) e il dietil succinato (13.3 mL, 0.08 mmol) tramite syringe pump nell'arco di 8h e 30'. Si lascia procedere la reazione a riflusso per 10h, quindi si porta la temperatura a 60°C. Si aggiungono 200 mL di **MeOH** mediante imbuto gocciolatore nell'arco di 1h e poi HCl al 37% (20 mL in 180 mL di H₂O) in 30'. Il prodotto ottenuto viene filtrato su Buchner e lavato con H₂O bollente, **MeOH** e infine **Et₂O**. Il solvente adsorbito viene rimosso tramite essiccatore in pompa per una notte fornendo **3** come un solido rosso intenso. (11.45 g, resa: 52%).

¹**H-NMR** (DMSO, 400 MHz), δ (ppm): 11.34 (2H, s), 8.52-8.45 (6H, m), 7.63-7.55 (6H, m).

di-tert-butyl 1,4-diosso-3,6-difenilpirrolo[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dicarbossilato (2)

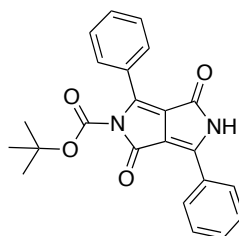


In un pallone a tre colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti **DPP** (3.5 g, 12.14 mmol), **DMAP** in quantità catalitica (37.08 mg, 0.30 mmol) e **THF** anidro (300 mL). La reazione procede a temperatura ambiente per 30'. Si aggiunge quindi di-tert-butyl-dicarbonato (14 mL, 0.06 mmol) e si lascia procedere la reazione per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene filtrata su cotone e il solvente viene rimosso a bassa pressione per 4h a 45°C, eliminando anche l'eccesso di **ABoc**. Si ottiene **2** come un solido giallo. (5.8 g, resa: 98%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 7.75-7.73 (4H, m), 7.50-7.46 (6H, m), 1.40 (18H, s).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz), δ(ppm): 159.55, 148.18, 146.44, 131.68, 128.60, 128.51, 128.43, 112.34, 85.36, 27.63.

tert-butyl 1,4-diosso-3,6-difenil-4,5-diidropirrolo[3,4-c]pirrolo-2(1H)-carbossilato (3)



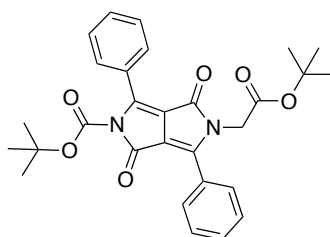
In un pallone viene inserito il **DPP-bisBoc** (2.00 g, 0.0041 mol), sciolto nella minima quantità di **DCM**, e gel di silice 63-200 um (25 g). Il solvente viene rimosso a bassa pressione e il composto adsorbito su silice viene ulteriormente essiccato sotto vuoto per

24h. Il composto viene purificato tramite colonna cromatografica in **DCM/AcOEt** (9:1) ottenendo il composto d'interesse **1** come solido arancione. (982 mg, resa: 62%)

¹**H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 8.38 (1H, s), 8.23-8.21 (2H, m), 7.80-7.77 (2H, m), 7.57-7.54 (3H, m), 7.52-7.49 (3H, m), 1.43 (9H, s).

¹³**C-NMR** (CDCl₃, 100MHz), δ(ppm): 163.83, 159.70, 148.65, 146.38, 144.89, 132.82, 131.37, 129.39, 128.88, 128.64, 128.44, 127.25, 115.16, 108.09, 85.12, 27.68.

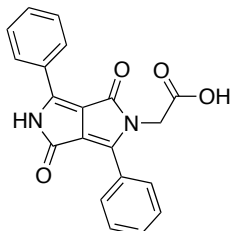
tert-butil 5- (2- (tert-butossi) -2-ossoetil) -1,4- diosso- 3,6- difenil- 4,5diidropirrolo [3,4-c] pirrolo-2(1H)-carbossilato (4)



In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar vengono inseriti **DPPmonoBoc** (100 mg, 0.26 mmol), NaH (21 mg, 0.51 mmol) e **THF** anidro (10 mL). La reazione procede a temperatura ambiente per 6 ore. Si aggiunge quindi *t*-butil bromoacetato (76 µL, 0.51 mmol) e si lascia procedere la reazione per una notte a temperatura ambiente. Il solvente di reazione viene rimosso tramite a bassa pressione fornendo **4** come solido arancione. (129.3 mg, resa: 100%).

¹**H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 7.79-7.77 (2H, m), 7.74-7.71 (2H, m), 7.55-7.51 (3H, m), 7.49-7.46 (3H, m), 4.41 (2H, s), 1.40 (9H, s), 1.37 (9H, s).

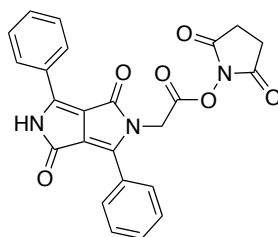
2-(5-(*tert*-butossicarbonil)-1,4-diosso-3,6-difenil-4,5-diidropirrolo[3,4-*c*] pirrolo 2(1*H*) -il) acido acetico (5)



In un pallone a un collo dotato di agitazione magnetica vengono inseriti **DPPmonoAcetato** (147 mg, 0.29 mmol), **TFA** (3.36 mL, 0.044 mmol) e **DCM** (70 mL). Dopo 24 ore, il solvente di reazione viene rimosso tramite rotavapor e il solido viene lavato con 3 aliquote di **DCM** e 2 aliquote di **Et₂O**. Si ottiene un solido arancione. (126.5 mg, resa: 100%).

¹**H-NMR** (DMSO, 400 MHz), δ (ppm): 13.68 (1H, s), 11.39 (1H, s), 8.49-8.45 (2H, m), 7.79-7.78 (2H, m), 7.62-7.61 (3H, m), 7.59-7.58 (3H, m), 4.50 (2H, s).

2,5-diossopirrolidin-1-il 2-(1,4-diosso-3,6-difenil-4,5-diidropirrolo[3,4-*c*] pirrolo-2(1*H*) -il) acetato (6)



In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar, vengono inseriti **DPPmonoAcido** (260 mg, 0.75 mmol), **DMF** anidra (30 mL) e i reagenti: **EDAC** (140 mg, 0.90 mmoli) e **NHS** (105 mg, 0.90 mmoli). La soluzione procede per 4.5h a temperatura ambiente. Successivamente si aggiungono altri 0.4 eq di **EDAC** (47 mg, 0.30 mmol) e si lascia procedere la reazione per una notte a temperatura ambiente.

Il prodotto viene precipitato con ghiaccio per ottenere **5**, un solido arancione. (301.8 mg,

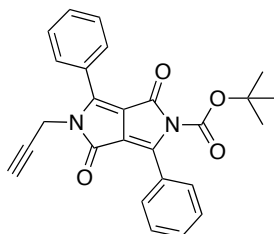
resa: 91%).

¹H-NMR (DMSO, 300 MHz), δ(ppm): 8.49-8.46 (2H, m), 7.81-7.78 (2H, m), 7.64-7.62 (3H, m), 7.62-7.60 (3H, m), 5.00 (2H, s), 2.82 (4H, s).

¹³C-NMR (DMSO, 100MHz), δ(ppm): 169.7, 165.4, 162.5, 160.8, 147.4, 132.7, 131.4, 129.1, 129.0, 128.4, 128.0, 127.2, 126.9, 107.2, 41.4, 25.4.

Massa [C₂₄H₁₇N₃O₆ + Na]⁺: 466.3

tert-butil 1,4-diosso-3,6-difenil-5- (prop-2-in-1-il) -4,5-diidropirrolo [3,4-c] pirrolo 2(1H) – carbossilato (7)



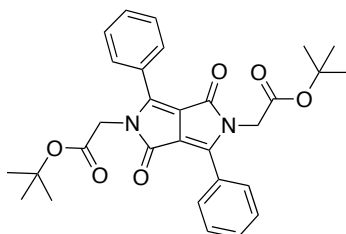
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar, vengono inseriti **DPPmonoBoc** (250 mg, 0.644 mmol), K₂CO₃ (149 mg, 1.09 mmol) e **DMF** anidra (5 mL). Successivamente si aggiunge propargil bromuro (115 μL, 1.09 mmol) e si lascia procedere la reazione per 24h a temperatura ambiente. Il solvente di reazione viene rimosso a pressione ridotta e il solido viene precipitato con H₂O. I surnatanti vengono riuniti ed estratti con **AcOEt**. I solidi precipitati e le frazioni organiche estratte vengono riuniti, seccati su MgSO₄ ed evaporati a pressione ridotta, fornendo un prodotto come solido arancione. (282 mg, resa: 100%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 8.01-7.98 (2H, m), 7.81-7.75 (2H, m), 7.57-7.53 (3H, m), 7.49-7.47 (3H, m), 4.48 (2H, J= 2.4 Hz, d), 2.34 (1H, J= 2.4 Hz, t) 1.40 (9H, s).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz), δ(ppm): 161.92, 159.49, 148.55, 145.83, 132.06, 131.45, 129.29, 129.23, 128.81, 128.50, 128.43, 127.06, 113.22, 108.49, 84.97, 78.50, 72.80, 32.17, 27.62.

Massa [C₂₆H₂₂N₂O₄ + Na]⁺: 449.1

terz-butil 2,2'-(1,4-diosso-3,6-difenilpirrolo [3,4-c]pirrolo-2,5 (1H,4H)-dimetil) diacetato (8)

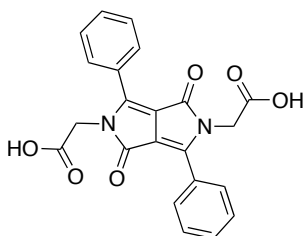


In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti **DPP** (500 mg, 1.16 mmol), NaH (277 mg, 4.64 mmol) e **THF** anidro (60 mL). La reazione procede a temperatura ambiente per 24 ore. Si aggiunge quindi *t*-butil bromo acetato (1.24 mL, 4.64 mmol). Dopo 24 ore si aggiunge acqua e si estrae con **DCM**. Le fasi organiche riunite sono anidrificate su MgSO₄ e il solvente rimosso a bassa pressione fornendo un solido giallo. (927 mg, resa: 98%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 7.78-7.76 (4H, m), 7.51-7.49 (6H, m), 4.42 (4H, s), 1.37 (18H, s).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz), δ(ppm): 167.5, 162.3, 148.3, 131.4, 128.9, 128.6, 127.8, 109.6, 82.4, 44.2, 27.9.

2,2'-(1,4-diosso-3,6-difenilpirrolo[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H)-dimetil) acido diacetico (9)



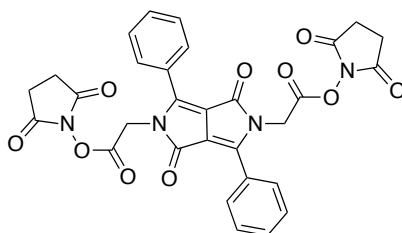
In un pallone ad un collo dotato di agitazione magnetica vengono inseriti **DPPbisAcetato** (100 mg, 0.15 mmol), **TFA** (2.25 mL, 29.40 mmol) e **DCM** (45 mL). Dopo 24

ore si allontana il solvente a pressione ridotta e il residuo viene lavato quattro volte prima con **DCM** e poi quattro volte con **Et₂O**. Il solvente viene rimosso a bassa pressione e il residuo seccato in pompa ad alto vuoto per 5 ore fornendo un solido arancione come prodotto d'interesse. (76 mg, resa: 98%).

¹**H-NMR** (DMSO, 400 MHz), δ (ppm): 7.82-7.79 (4H, m), 7.62-7.60 (6H, m), 4.45 (4H, s).

¹³**C-NMR** (DMSO, 100MHz), δ (ppm): 169.8, 161.5, 147.6, 131.5, 129.0, 128.5, 127.3, 108.1, 82.4, 43.1, 27.4.

bis (2,5-diossopirrolidin-1-il) 2,2'- (1,4-diosso-3,6-difenilpirrolo [3,4-c] pirrolo - 2,5 (1H, 4H) -diil) diacetato (10)



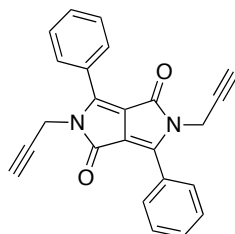
In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar, vengono inseriti **9** (450 mg, 1.11 mmol), **EDAC** (415 mg, 2.67 mmoli) e **NHS** (310 mg, 2.67 mmoli) in **DMF** anidra. La soluzione viene lasciata sotto agitazione per 4.5h a temperatura ambiente. Successivamente si aggiungono altri 0.4 eq di **EDAC** (70 mg, 0.44 mmol) e si lascia procedere la reazione per una notte sotto agitazione a temperatura ambiente. La lavorazione si effettua precipitando il prodotto con ghiaccio. Si ottiene un solido arancione. (631 mg, resa: 95%).

¹**H-NMR** (DMSO, 300 MHz), δ (ppm): 7.83-7.78 (4H, m), 7.65-7.61 (6H, m), 4.99 (4H, s), 2.81 (8H, m).

¹³**C-NMR** (DMSO, 100MHz), δ (ppm): 169.7, 165.2, 160.9, 147.7, 132.0, 129.2, 128.6, 126.4, 108.5, 41.3, 25.4, 25.2.

Massa [C₃₀H₂₂N₄O₁₀ + Na]⁺: 621.4

3,6-difenil-2,5-di(prop-2-in-1-il) pirrolo [3,4-c] pirrolo-1,4(2H,5H)-dione (11)

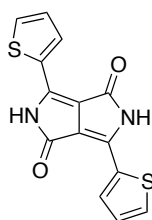


In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar, vengono inseriti **DPP** (500 mg, 1.73 mmol), K_2CO_3 (138 mg, 5.2 mmol) e **DMF** anidra (5 mL). Quindi si aggiunge propargil bromuro (83 μ L, 0.70 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione per una notte a 50°C. Successivamente la miscela di reazione viene lavata con **Et₂O**, centrifugata ed estratta con **DCM**/H₂O. Il prodotto **9** si presenta come un solido rosso. (505.6 mg, resa: 80%).

¹**H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 8.00-7.98 (2H, m), 7.81-7.78 (2H, m), 7.57-7.56 (3H, m), 7.50-7.48 (3H, m), 4.50 (2H, s), 2.34 (4H, m).

¹³**C-NMR** (DMSO, 100MHz), δ (ppm): 166.4, 147.5, 137.7, 110.2, 79.2, 75.0, 31.3.

3,6-di(tiofen-2-il) pirrolo [3,4-c] pirrolo -1,4(2H,5H)-dione (12)

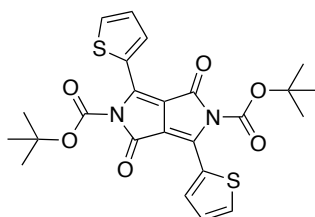


In un pallone a tre colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti Na metallico (2.09 g, 91.32 mmol), FeCl₃ in quantità catalitica (50 mg) e l'alcool *ter*-amilico (30 mL). Dopo la completa dissoluzione del sodio, la soluzione viene portata a 85°C. Si aggiunge quindi 2-tiofene carbonitrile (4.3 mL, 45.66 mmol) e il

diisopropil succinato (4.6 g, 22.83 mmol). Si lascia procedere la reazione 2h, quindi si porta la temperatura a 50°C. Si aggiungono 50 mL di **MeOH** mediante imbuto gocciolatore nell'arco di 1h e poi Acido Acetico (15 mL) in 30'. La miscela viene portata a riflusso per 15 minuti e successivamente filtrata su Buchner e lavato con H₂O bollente (500 mL), **MeOH** caldo (500 mL), acetone (500 mL) e infine esano (500 mL). Il solvente adsorbito viene rimosso tramite essiccatore in pompa per una notte fornendo **10** come un solido viola molto scuro. (2.8 g, resa: 20%).

¹H-NMR (DMSO, 400 MHz), δ(ppm): 11.24 (2H, s), 8.21-8.20 (2H, m), 7.97-7.95 (2H, m), 7.31-7.29 (2H, m).

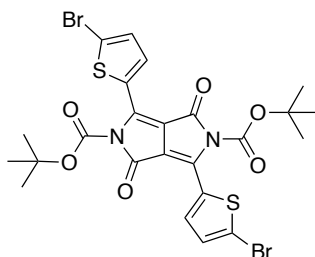
di-tert-butil 1,4-diosso-3,6-di(tiofen-2-il)pirrolo[3,4-c]pirrolo-2,5(1H,4H) – dicarbossilato (13)



In un pallone a tre colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti **DPP** Tiofene (2 g, 6.65 mmol), **DMAP** in quantità catalitica (81 mg, 0.665 mmol) e **THF** anidro (200 mL). La reazione procede a temperatura ambiente per 1h. Si aggiunge quindi di-tert-butil-dicarbonato (5.04 mL, 21.97 mmol) e si lascia procedere la reazione per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene filtrata su cotone e il solvente viene rimosso a bassa pressione per 4h a 45°C, eliminando anche l'eccesso di **ABoc**. Si ottiene **11** come un solido viola scuro. (2.5 g, resa: 76%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 8.23-8.22 (2H, m), 7.64-7.62 (2H, m), 7.20-7.18 (2H, m), 1.59 (18H, s).

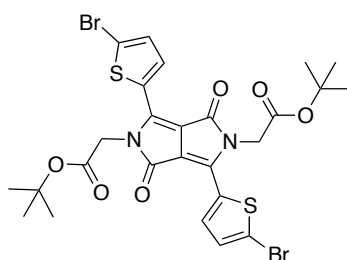
**di-*tert*-butil 3,6-bis (5-bromotiofen-2-il) - 1,4 - diossipirrolo [3,4-*c*] pirrolo - 2,5 (1*H*, 4*H*)
– dicarbossilato (14)**



In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar, vengono inseriti **DPP** Tiofene bisBoc (1 g, 1.99 mmoli) e **DCM** anidro (100 mL). Quindi si aggiunge **NBS** (146 mg, 7.99 mmol) e si conduce la reazione al buio, a temperatura ambiente, per una notte. Il solvente è poi rimosso a bassa pressione e il solido viene precipitato in **MeOH**. Il prodotto finito **12** viene ottenuto dopo lavaggio con H₂O bollente e **MeOH** caldo come un solido viola intenso. (400 mg, resa: 40%).

¹**H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 8.08-8.07 (2H, m), 7.16-7.15 (2H, m), 1.54 (18H, s).

di-*tert*-butil 2,2'- (3,6-bis (5-bromotiofen-2-il) -1,4-diossipirrolo [3,4-*c*] pirrolo-2,5 (1*H*, 4*H*) -diil) diacetato (15)

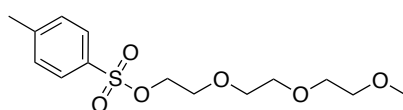


In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica, refrigerante e flusso d'Ar vengono inseriti **DPP** (50 mg, 0.11 mmol), NaH (18 mg, 0.44 mmol) e **THF** anidro (5 mL). La reazione procede a temperatura ambiente per 24 ore. Si aggiunge quindi *t*-butil bromo

acetato (65 μ L, 0.44 mmol). Dopo 24 ore si aggiunge acqua e si centrifuga ottenendo un solido viola. (60 mg, resa: 79%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 8.47-8.44 (2H, m), 7.22-7.20 (2H, m), 4.70 (4H, s), 1.45 (18H, s).

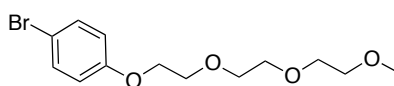
2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil 4-metilbenzenesulfonato (16)



In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar, vengono inseriti trietilenglicole monometil etere (3 mL, 0.018 mmoli) e Et_2O (10 mL). Quindi si aggiunge il p-toluensolfonil cloruro (3.83 g, 0.020 mmol) e si porta la temperatura a 5°C con un bagno a ghiaccio. Il KOH (4.20 g, 0.075 mmol) viene aggiunto in più fasi previa macinazione. La reazione viene fatta procedere per 3h. Il grezzo di reazione ottenuto viene estratto con H_2O e Et_2O e le fasi organiche riunite sono anidrificate su MgSO_4 e il solvente rimosso a pressione ridotta. Il prodotto finito è un olio incolore **15**. (4.9 g, resa: 85%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7.80-7.77 (3H, d), 7.34-7.32 (2H, d), 3.81-3.79 (2H, m), 3.69-3.55 (4H, m), 3.52-3.49 (4H, m), 3.46-3.43 (4H, m), 3.35 (3H, s).

1-bromo-4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi)benzene (17)

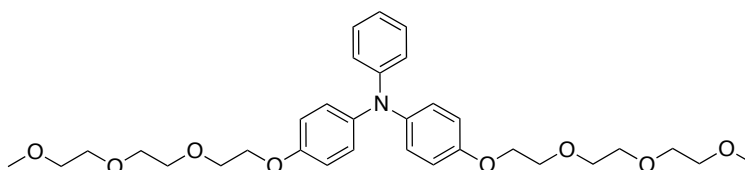


In un pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar vengono inseriti 4-bromofenolo (1.09 g, 0.0063 mmol), **15** (1.00 g, 0.0031 mmol) e **DMF** anidra (12

mL). Quindi si aggiunge il potassio carbonato (1.30 g, 0.0094 mmol) e si lascia procedere la reazione per 27h sotto agitazione a 50°C. Il solvente di reazione viene diminuito a pressione ridotta e il grezzo estratto con **DCM**/acqua basica (NaOH 10%). Il prodotto è un olio incolore che viene purificato mediante **Fc (Cy/AcOEt 9:1)** per dare il composto d'interesse **13**. (756 mg, resa: 84%).

¹**H-NMR** (Acetone-d₆, 400 MHz), δ(ppm): 7.43-7.40 (2H, m), 6.94-6.90 (2H, m), 4.14-4.11 (2H, m), 3.81-3.79 (2H, m), 3.65-3.62 (2H, m), 3.59-3.55 (4H, m), 3.47-3.44 (2H, m), 3.27 (3H, s).

4- (2- (2- (2- metossietossi) etossi) etossi) -N- (4- (2- (2- (2- metossietossi) etossi) etossi) fenil)-N-fenil-anilina (18)

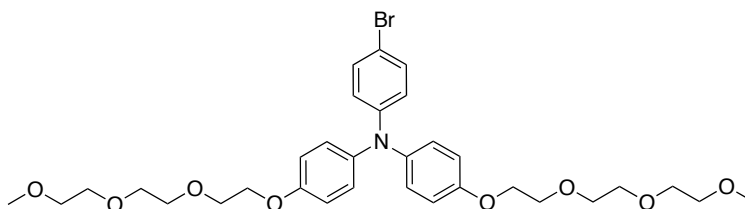


In pallone a due colli dotato di agitazione magnetica e flusso d'Ar vengono inseriti **Pd₂(dba)₃** (1.05 mg, 0.0025 mmol), **(*t*-Bu)₃PH⁺BF₄⁻** (0.73 mg, 0.0025 mmol), ***t*-BuOK** (56 mg, 12.5 mmol) e **13** (105.57 mg, 8.36 mmol) in toluene (3 mL). Quindi si aggiunge anilina distillata (14 μL, 0.15 mmol) e si lascia procedere la reazione a riflusso per due notti. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta e il prodotto viene estratto con **DCM**. Il grezzo di reazione viene purificato tramite colonna cromatografica in **AcOEt/Cy (4:2)**. Si ottiene il prodotto puro come olio trasparente. (83 mg, resa: 97%).

¹**H-NMR** (Acetone-d₆, 400 MHz), δ(ppm): 7.20-7.14 (2H, m), 7.04-7.01 (4H, m), 7.01-6.98 (4H, m), 6.93-6.81 (3H, m), 4.14-4.09 (4H, m), 3.84-3.78 (4H, m), 3.67-3.64 (4H, m), 3.61-3.55 (8H, m), 3.48-3.45 (4H, m), 3.28 (6H, s).

¹³**C-NMR** (Acetone-d₆, 100 MHz), δ(ppm): 155.39, 148.94, 141.10, 128.90, 126.39, 120.56, 120.47, 115.44, 71.78, 70.55, 70.39, 70.23, 69.50, 67.75, 57.90.

4-bromo-*N,N*-bis(4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi)fenil)anilina (19)

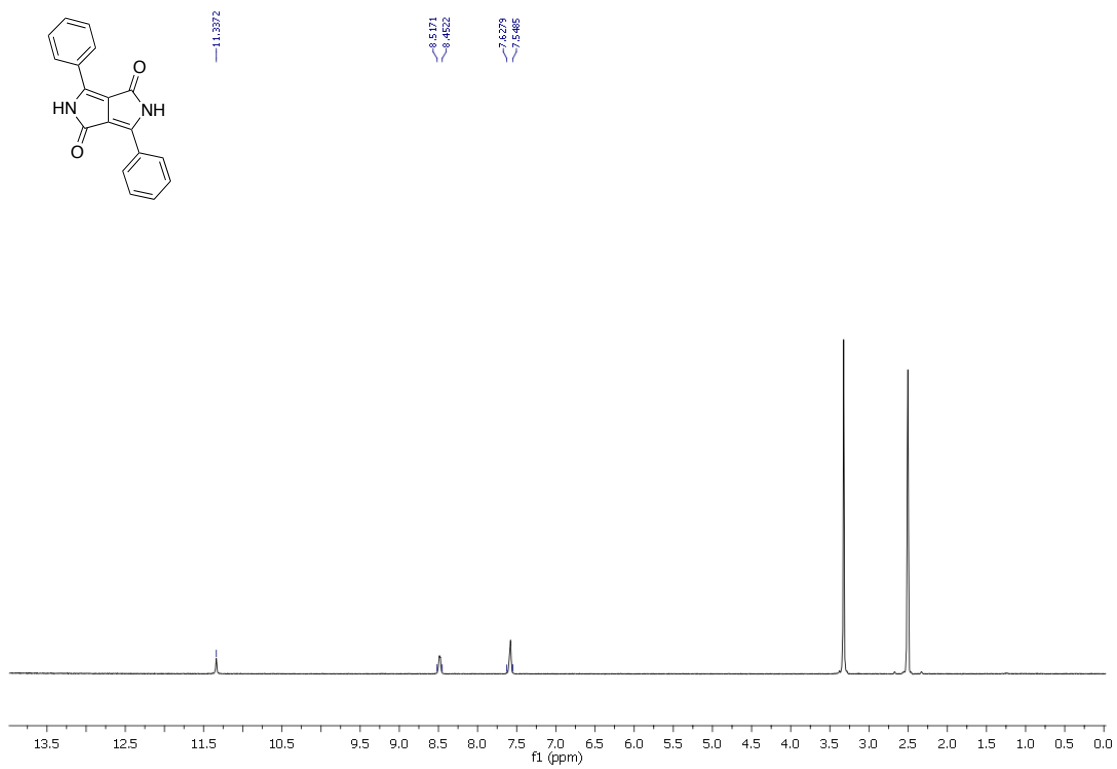


In un pallone viene introdotto **14** (64 mg, 0.1123 mmol) sciolto in **DCM** (13 mL). Successivamente viene aggiunta la **NBS** (22 mg, 0.1236 mmol) a temperatura ambiente sotto agitazione. Il grezzo di reazione viene purificato mediante estrazione con acqua basica (NaOH 2M) e colonna cromatografica in **AcOEt:Cy** (4:2) per dare un olio.

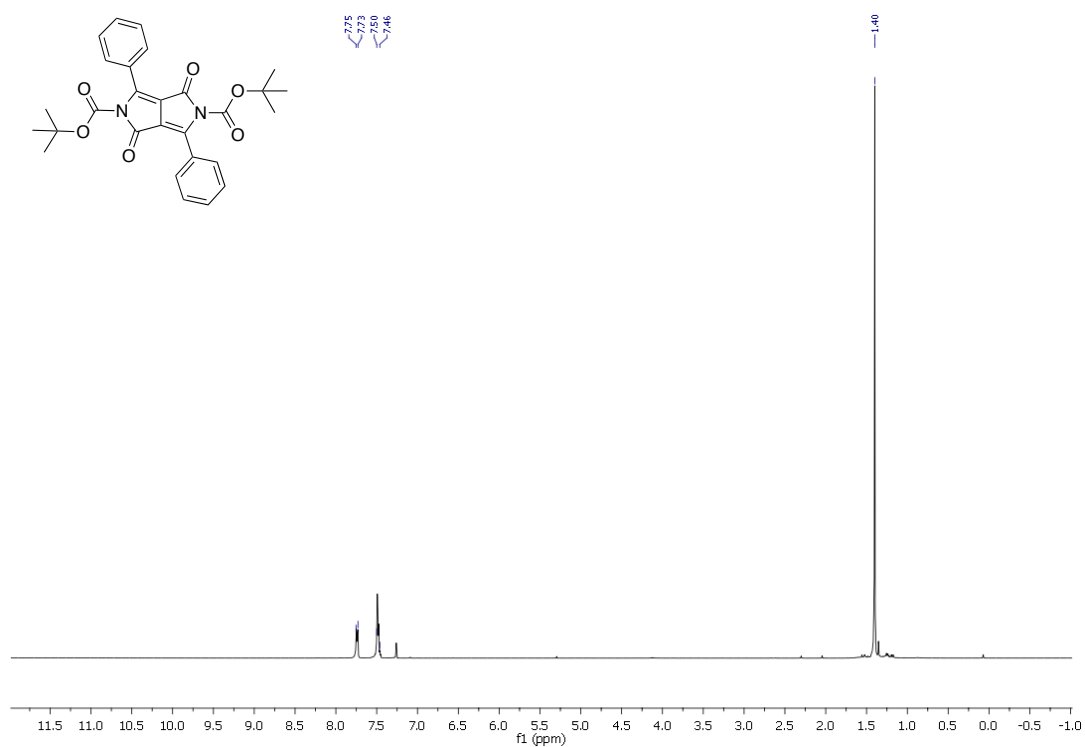
¹**H-NMR** (Acetone-d₆, 400 MHz), δ(ppm): 7.23-7.18 (2H, m), 7.03-6.95 (4H, m), 6.85-6.74 (6H, m), 4.12-4.06 (4H, m), 3.87-3.72 (4H, m), 3.77-3.72 (4H, m), 3.70-3.64 (8H, m), 3.57-3.52 (4H, m), 3.38 (6H, s).

5.3 Spettri principali

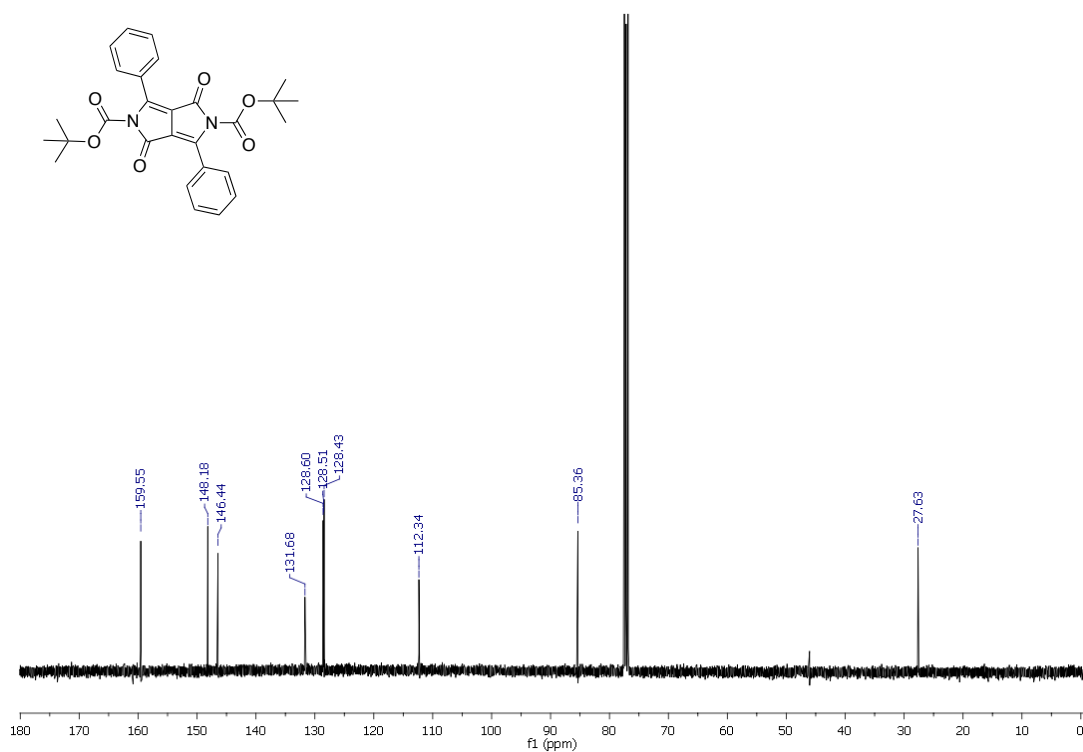
1. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz), δ (ppm): 11.34 (2H, s), 8.52-8.45 (6H, m), 7.63-7.55 (6H, m).



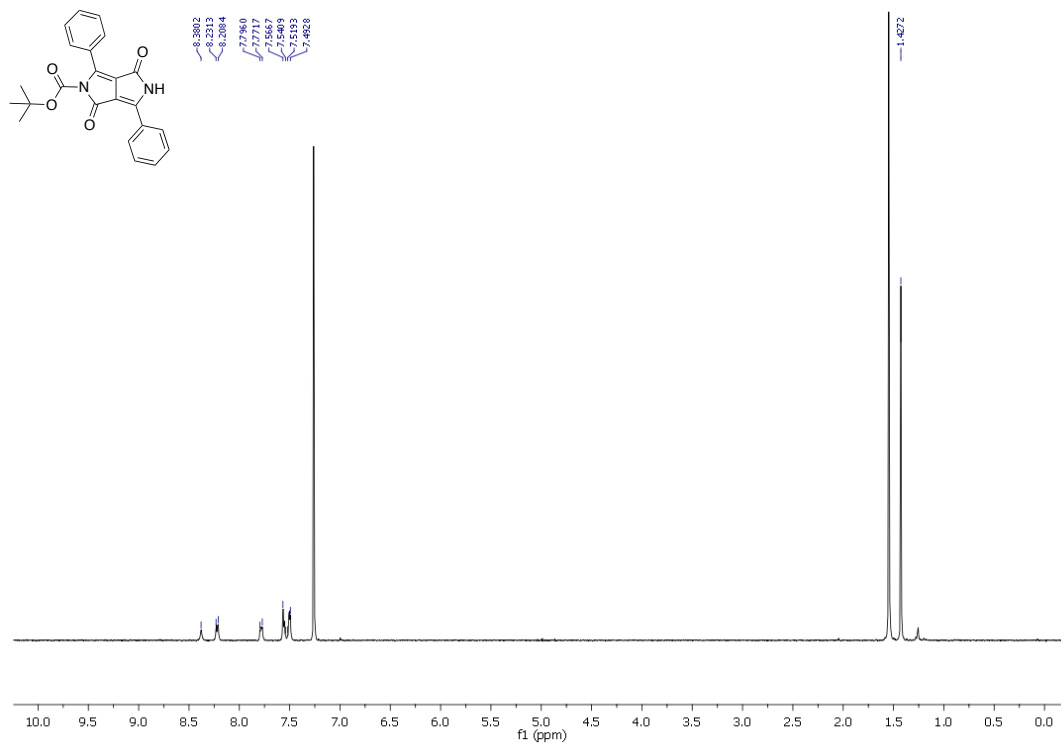
2. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.75-7.73 (4H, m), 7.50-7.46 (6H, m), 1.40 (18H, s).



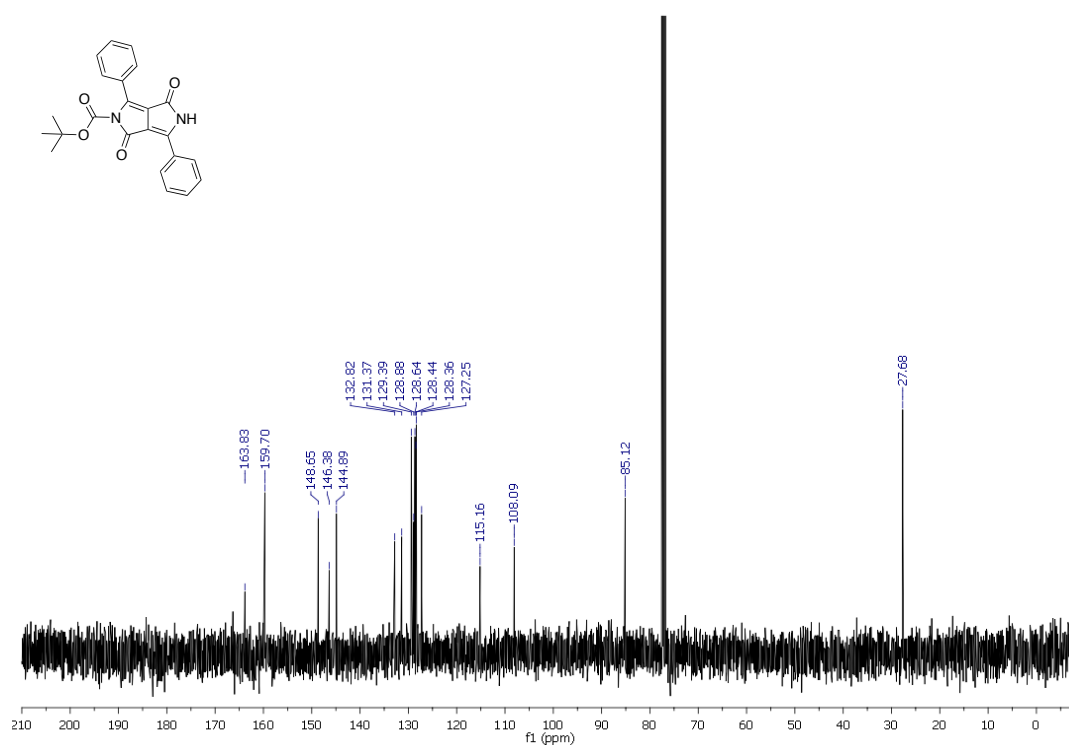
2. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz), $\delta(\text{ppm})$: 159.55, 148.18, 146.44, 131.68, 128.60, 128.51, 128.43, 112.34, 85.36, 27.63.



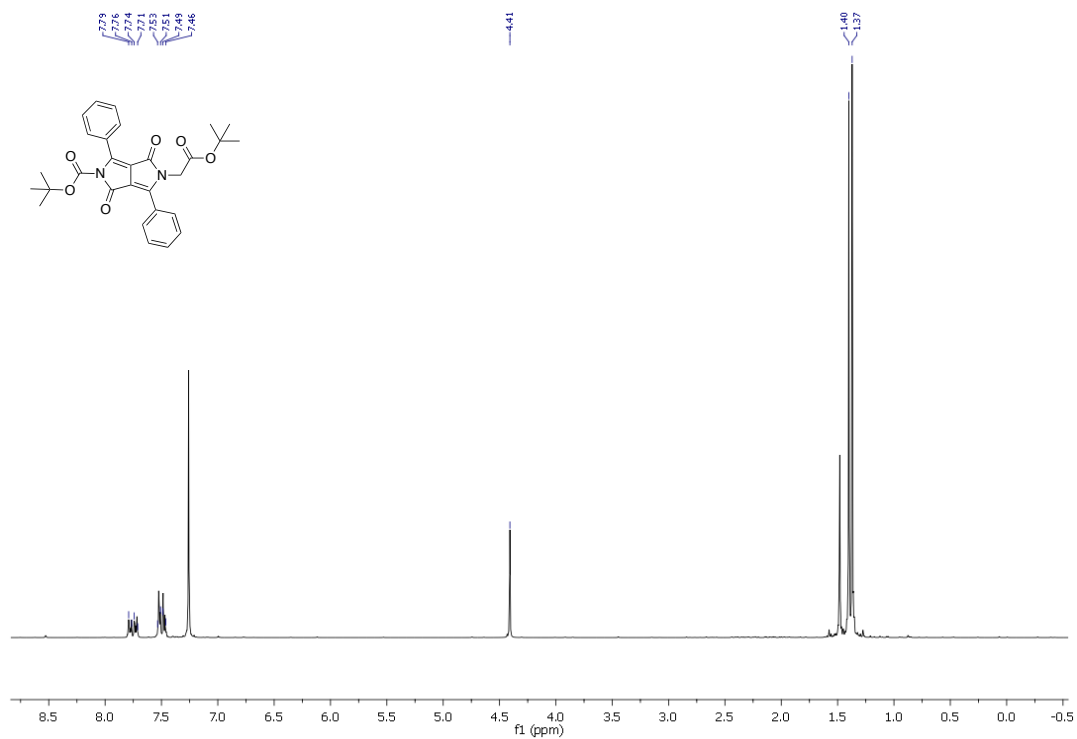
3. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 8.38 (1H, s), 8.23-8.21 (2H, m), 7.80-7.77 (2H, m), 7.57-7.54 (3H, m), 7.52-7.49 (3H, m), 1.43 (9H, s).



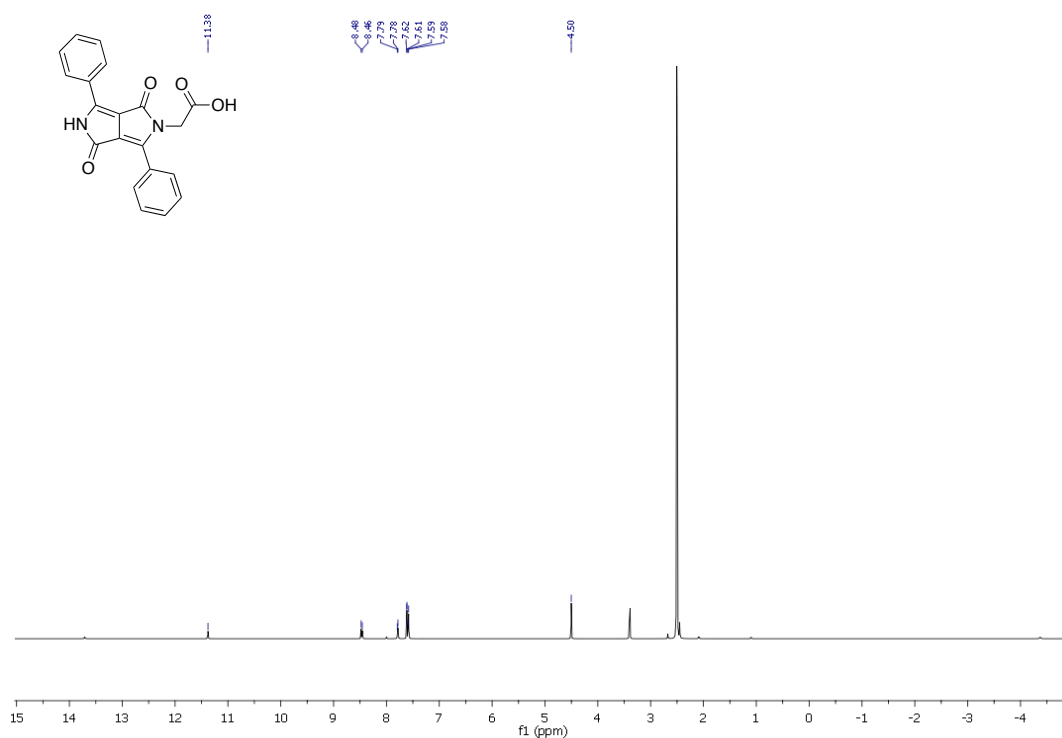
3. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz), δ (ppm): 163.83, 159.70, 148.65, 146.38, 144.89, 132.82, 131.37, 129.39, 128.88, 128.64, 128.44, 127.25, 115.16, 108.09, 85.12, 27.68.



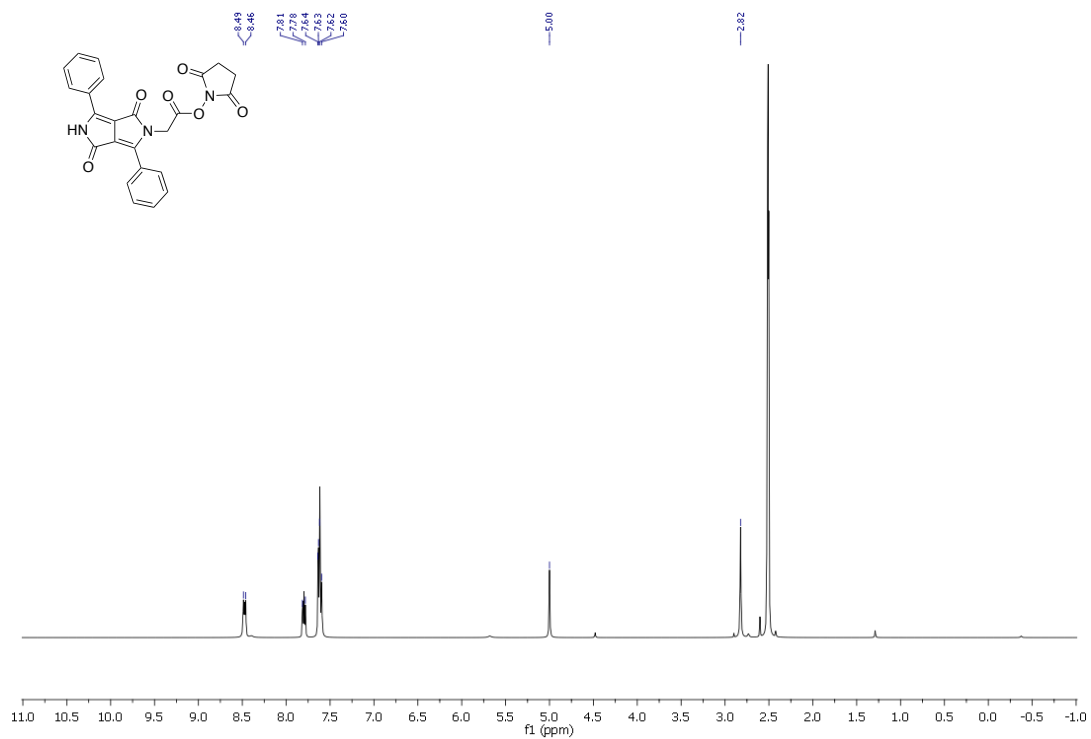
4. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.79-7.77 (2H, m), 7.74-7.71 (2H, m), 7.55-7.51 (3H, m), 7.49-7.46 (3H, m), 4.41 (2H, s), 1.40 (9H, s), 1.37 (9H, s).



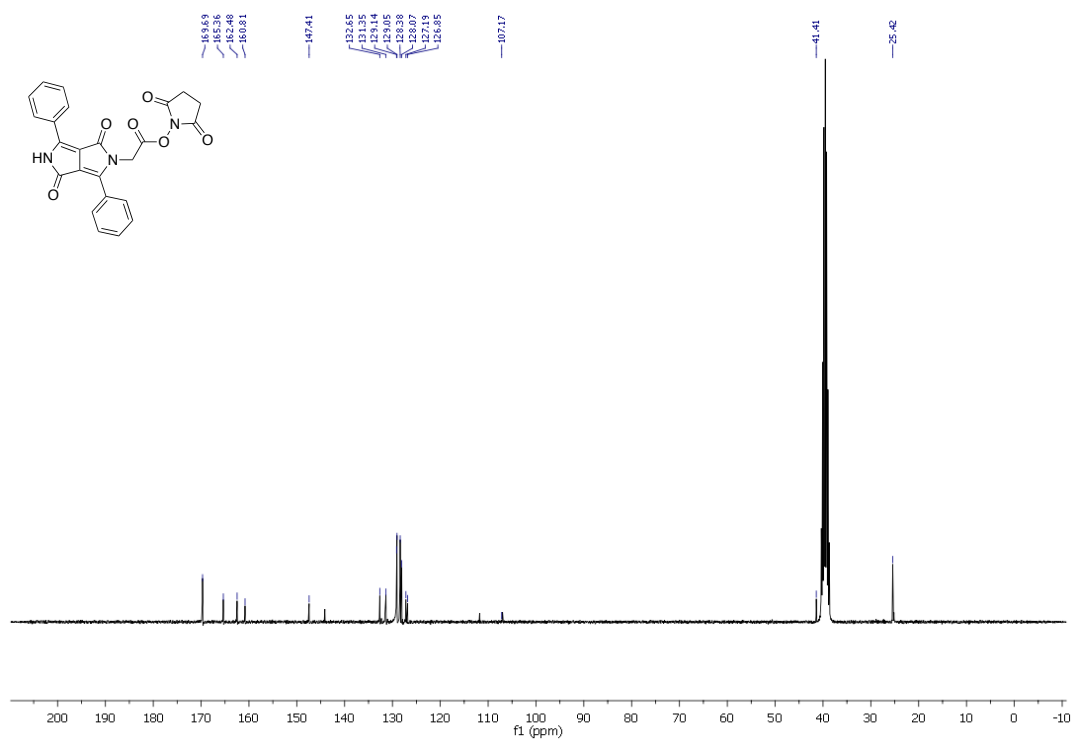
5. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 13.68 (1H, s), 11.39 (1H, s), 8.49-8.45 (2H, m), 7.79-7.78 (2H, m), 7.62-7.61 (3H, m), 7.59-7.58 (3H, m), 4.50 (2H, s).



6. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz), δ (ppm): 8.49-8.46 (2H, m), 7.81-7.78 (2H, m), 7.64-7.62 (3H, m), 7.62-7.60 (3H, m), 5.00 (2H, s), 2.82 (4H, s).

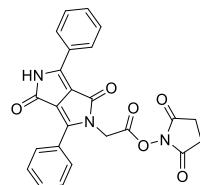
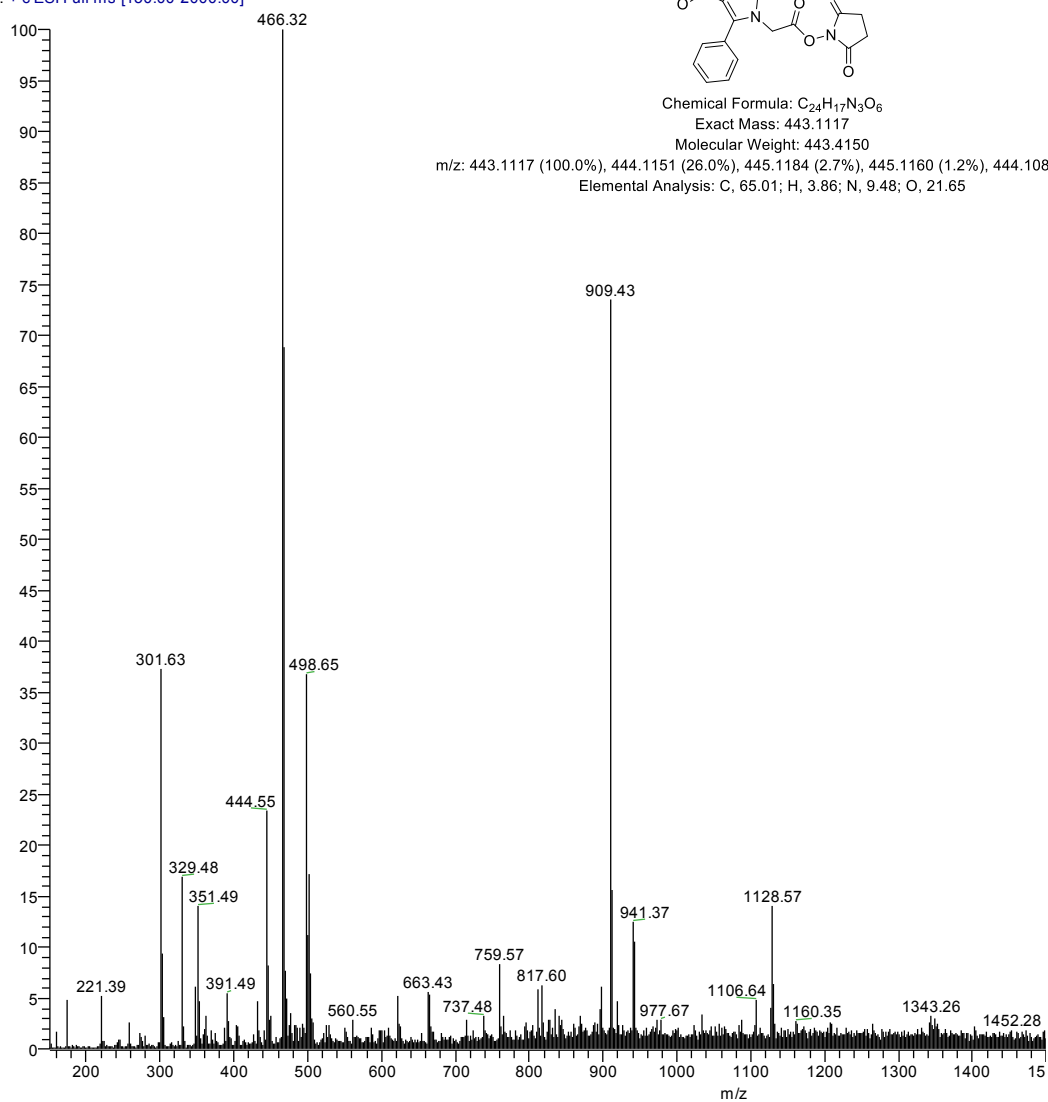


6. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100MHz), δ (ppm): 169.7, 165.4, 162.5, 160.8, 147.4, 132.7, 131.4, 129.1, 129.0, 128.4, 128.0, 127.2, 126.9, 107.2, 41.4, 25.4.



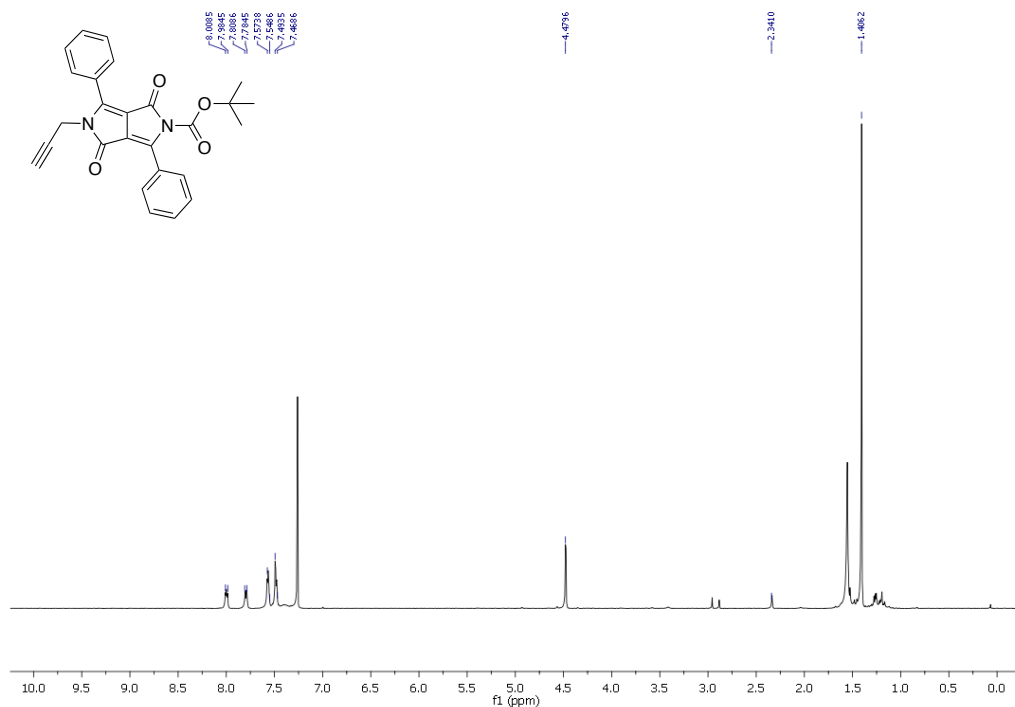
6. Massa [C₂₄H₁₇N₃O₆ + Na]⁺: 466.3

Andrea2 #14 RT: 0.38 AV: 1 NL: 7.30E6
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

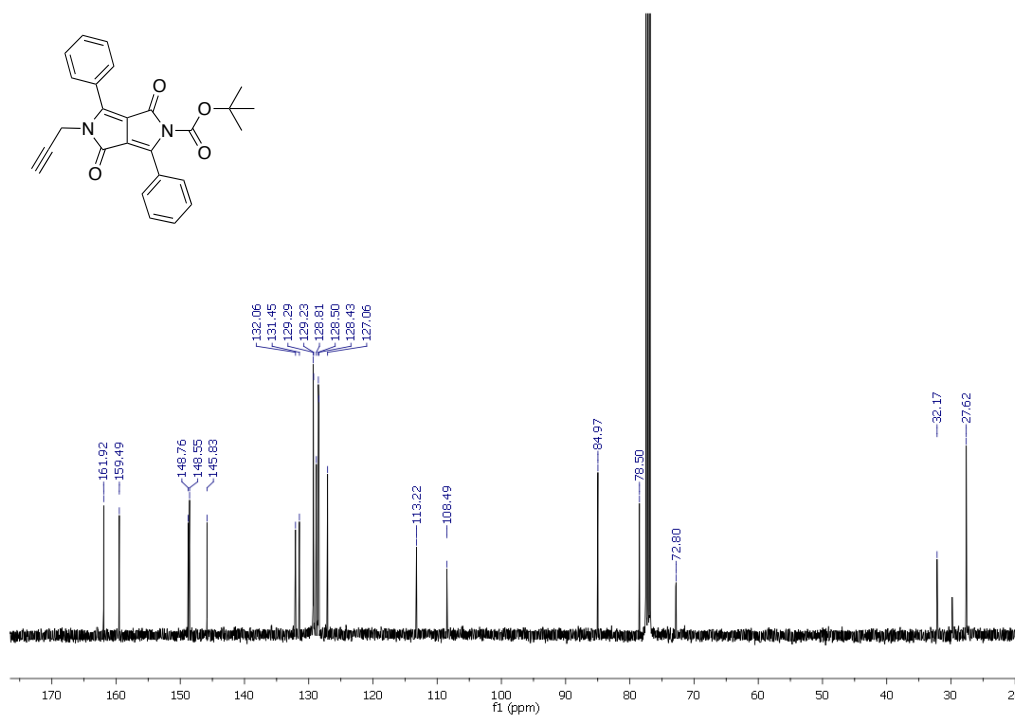


Chemical Formula: C₂₄H₁₇N₃O₆
Exact Mass: 443.1117
Molecular Weight: 443.4150
m/z: 443.1117 (100.0%), 444.1151 (26.0%), 445.1184 (2.7%), 445.1160 (1.2%), 444.1088 (1.1%)
Elemental Analysis: C, 65.01; H, 3.86; N, 9.48; O, 21.65

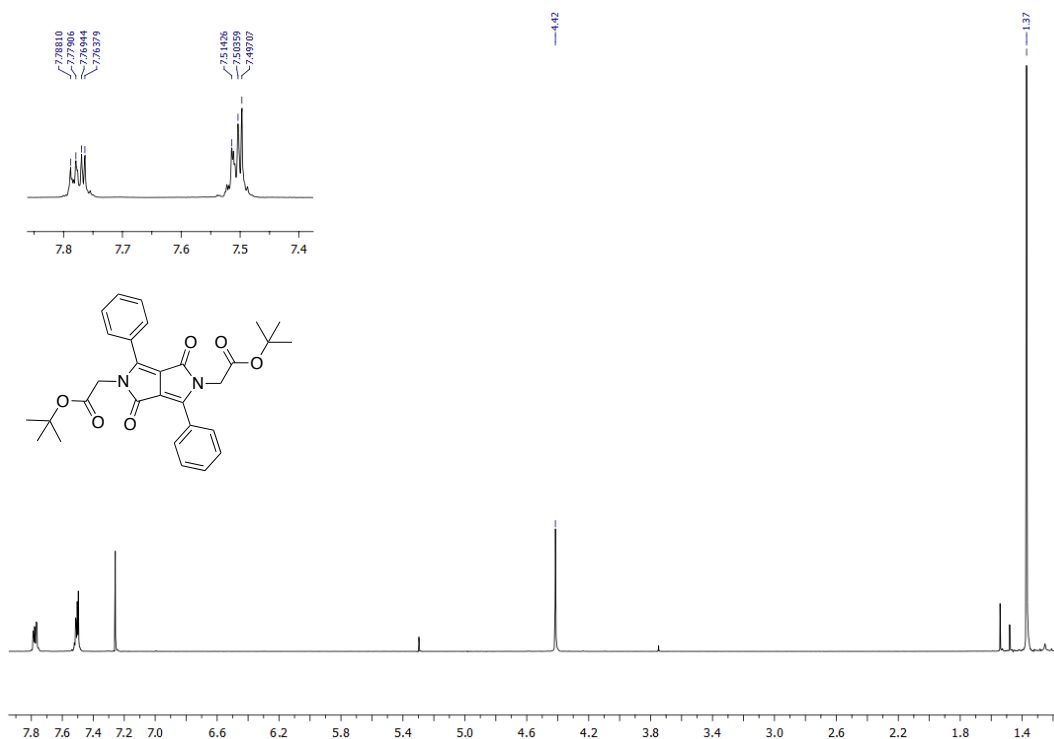
7. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ(ppm): 8.01-7.98 (2H, m), 7.81-7.75 (2H, m), 7.57-7.53 (3H, m), 7.49-7.47 (3H, m), 4.48 (2H, J= 2.4 Hz, d), 2.34 (1H, J= 2.4 Hz, t) 1.40 (9H, s).



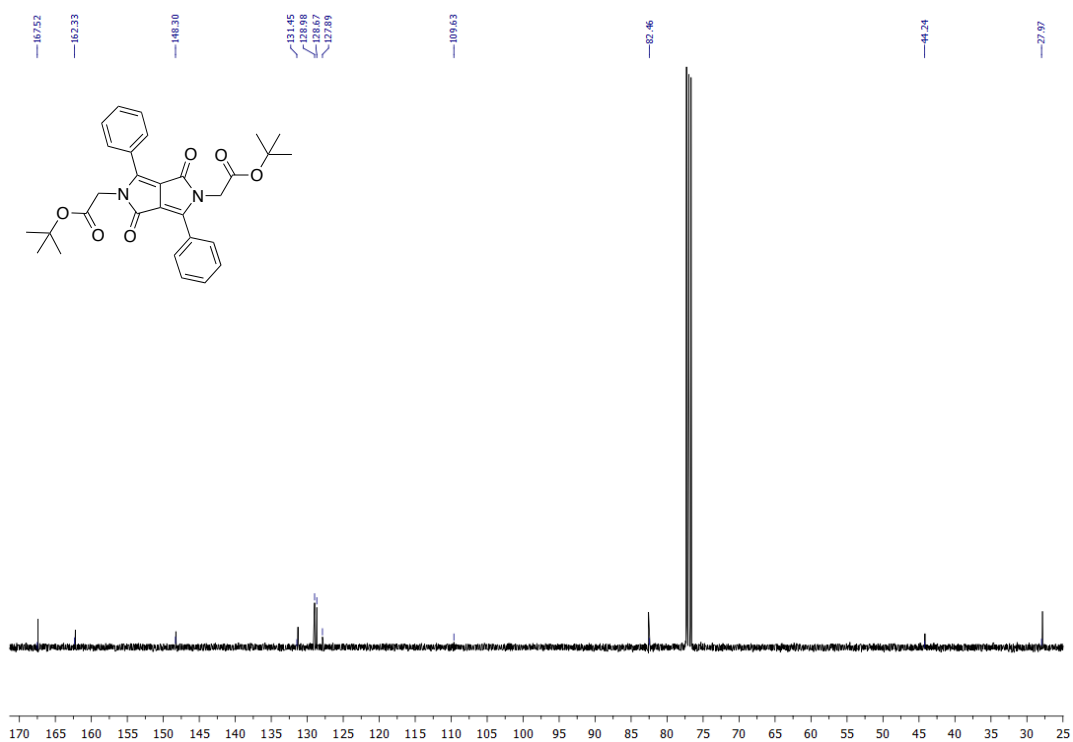
7. ¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz), δ(ppm): 161.92, 159.49, 148.55, 145.83, 132.06, 131.45, 129.29, 129.23, 128.81, 128.50, 128.43, 127.06, 113.22, 108.49, 84.97, 78.50, 72.80, 32.17, 27.62.



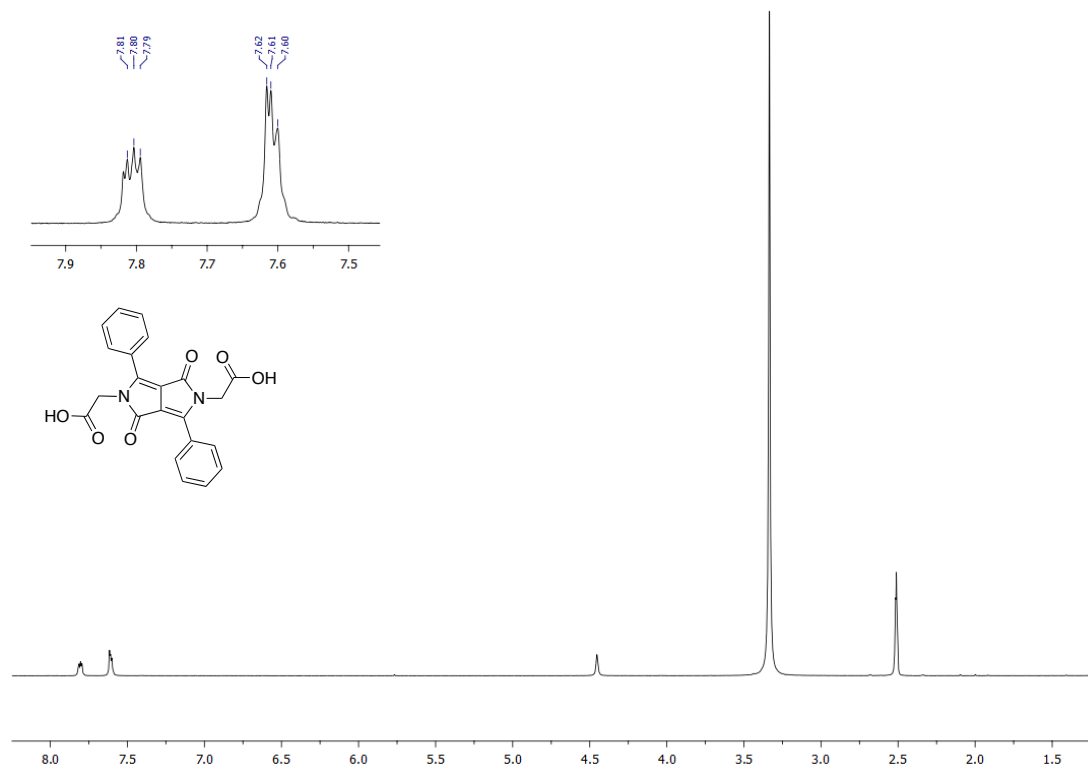
8. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.78-7.76 (4H, m), 7.51-7.49 (6H, m), 4.42 (4H, s), 1.37 (18H, s).



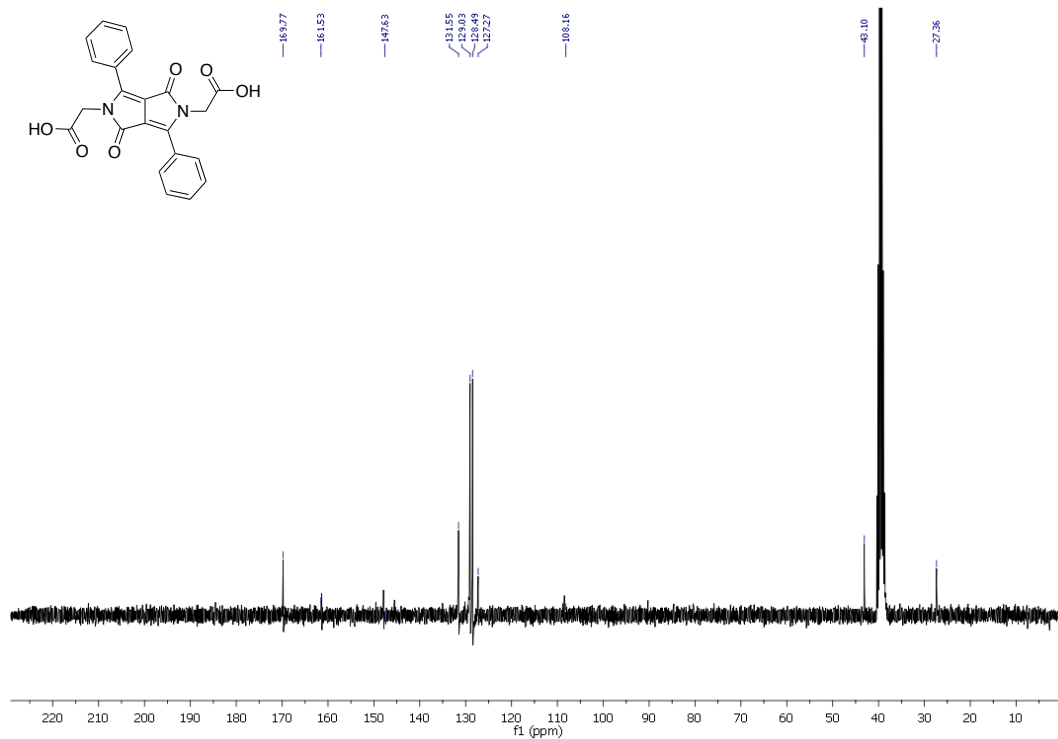
8. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz), $\delta(\text{ppm})$: 167.5, 162.3, 148.3, 131.4, 128.9, 128.6, 127.8, 109.6, 82.4, 44.2, 27.9.



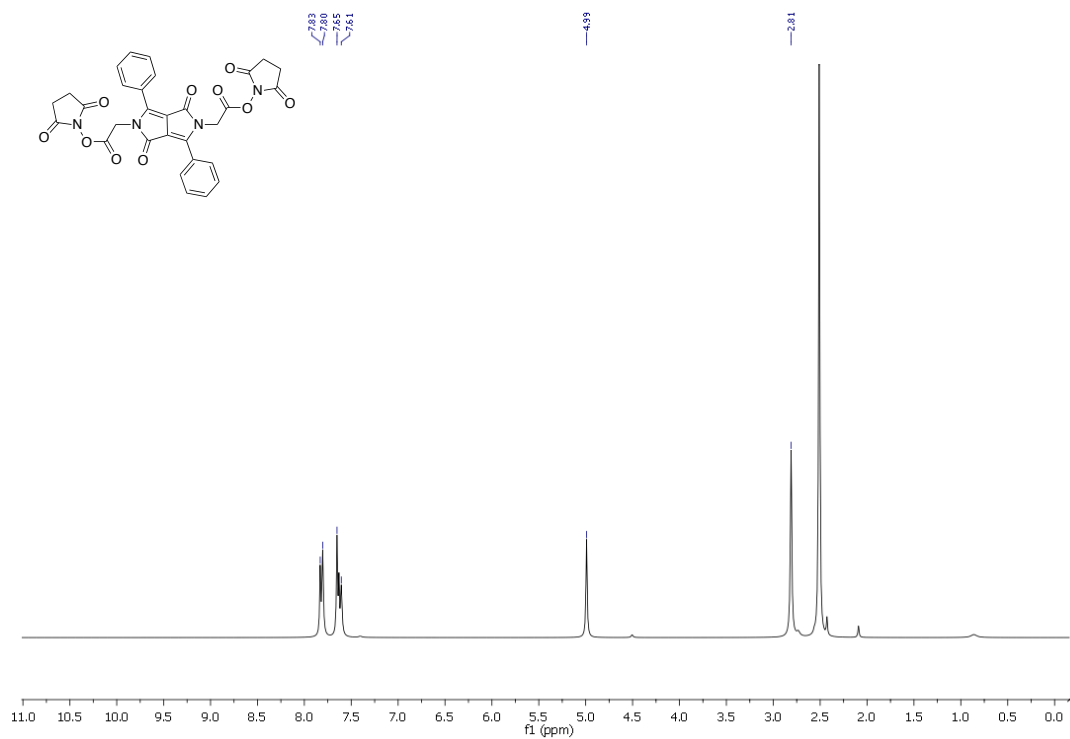
9. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz), δ (ppm): 7.82-7.79 (4H, m), 7.62-7.60 (6H, m), 4.45 (4H, s).



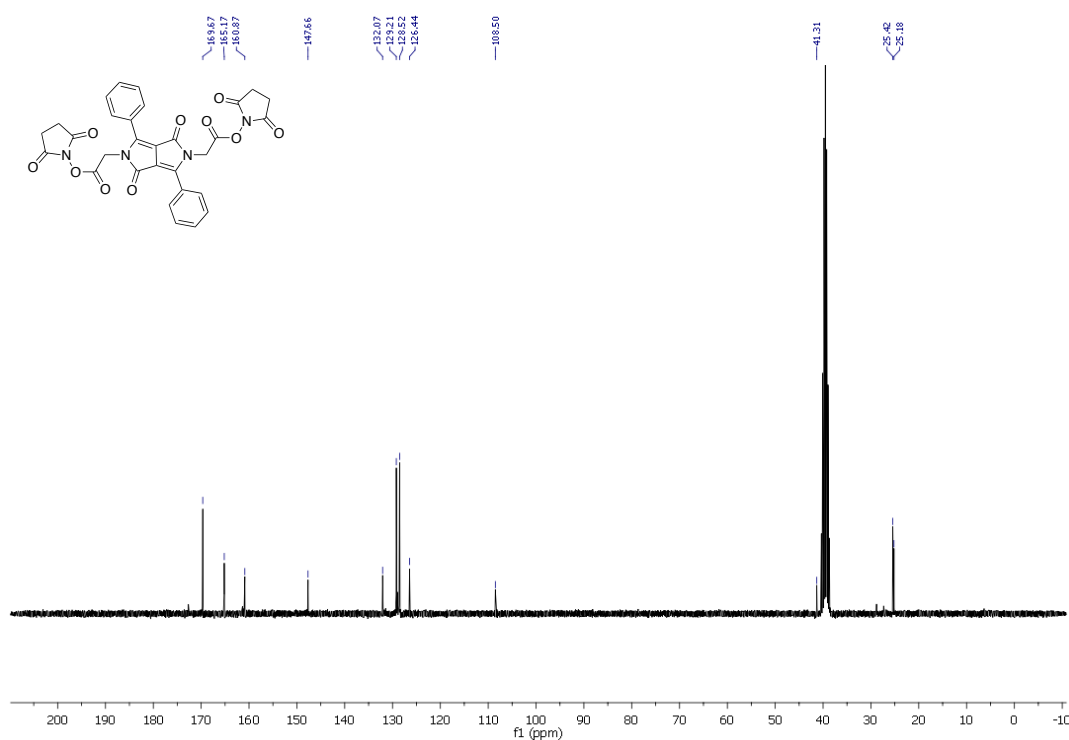
9. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100MHz), δ (ppm): 169.8, 161.5, 147.6, 131.5, 129.0, 128.5, 127.3, 108.1, 82.4, 43.1, 27.4.



10. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz), δ (ppm): 7.83-7.78 (4H, m), 7.65-7.61 (6H, m), 4.99 (4H, s), 2.81 (8H, m).

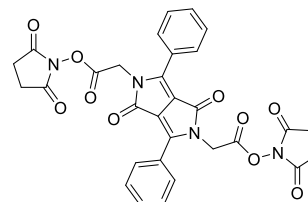
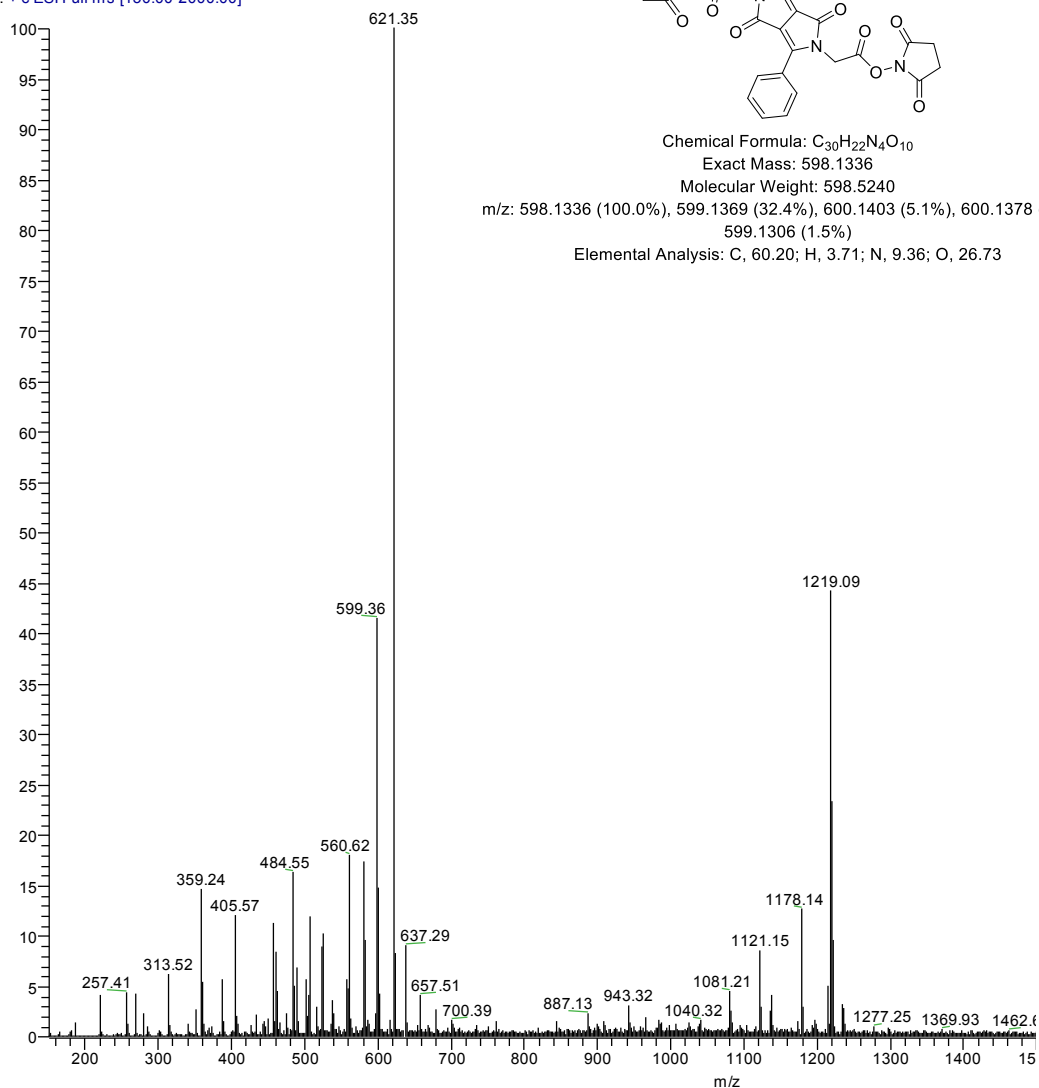


10. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100MHz), δ (ppm): 169.7, 165.2, 160.9, 147.7, 132.0, 129.2, 128.6, 126.4, 108.5, 41.3, 25.4, 25.2.



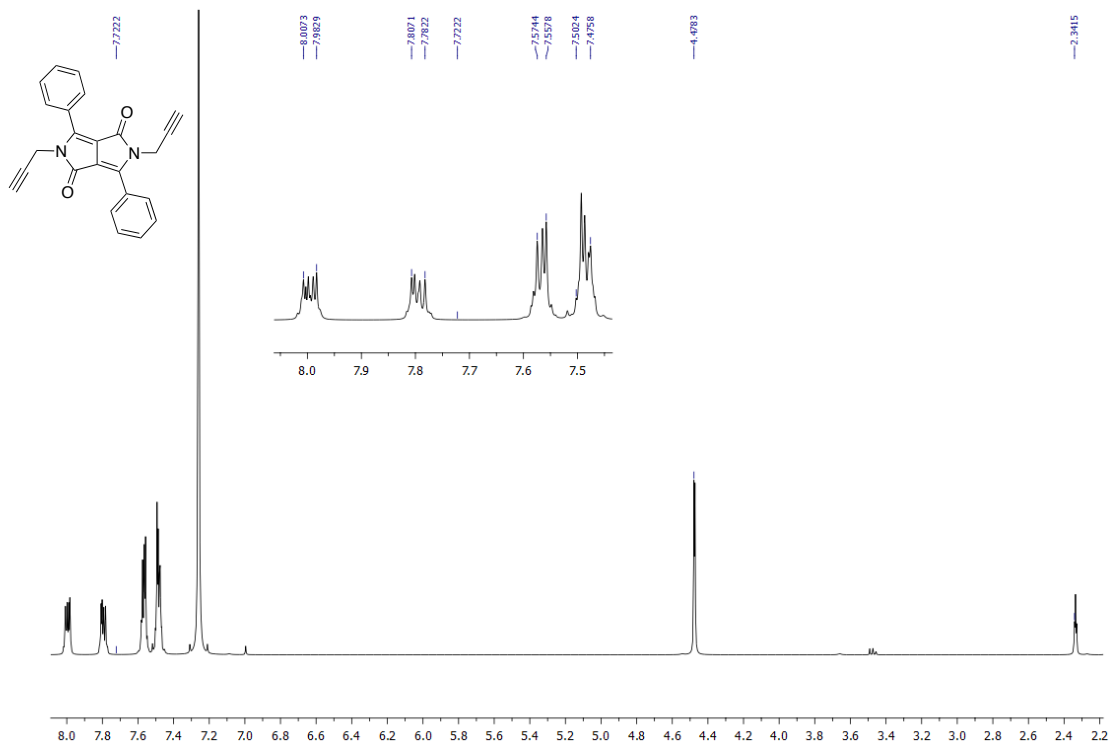
10. Massa [C₃₀H₂₂N₄O₁₀ + Na]⁺: 621.4

Andrea1 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 4.30E7
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

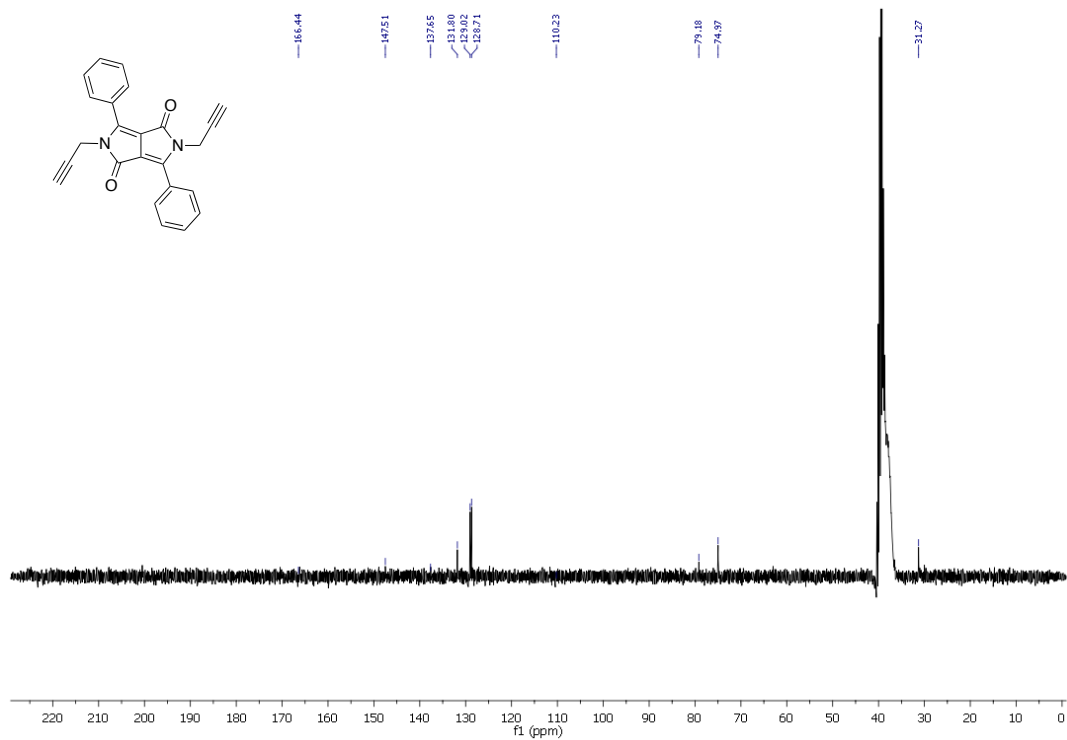


Chemical Formula: C₃₀H₂₂N₄O₁₀
Exact Mass: 598.1336
Molecular Weight: 598.5240
m/z: 598.1336 (100.0%), 599.1369 (32.4%), 600.1403 (5.1%), 600.1378 (2.1%),
599.1306 (1.5%)
Elemental Analysis: C, 60.20; H, 3.71; N, 9.36; O, 26.73

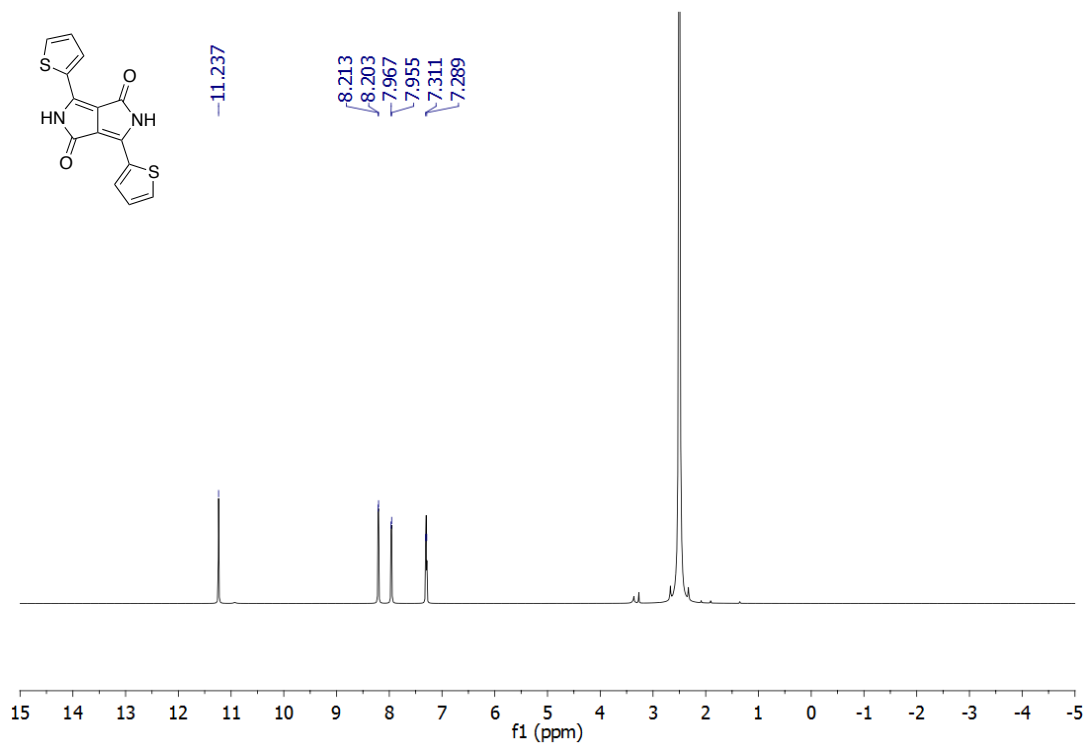
11. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 8.00-7.98 (2H, m), 7.81-7.78 (2H, m), 7.57-7.56 (3H, m), 7.50-7.48 (3H, m), 4.50 (2H, s), 2.34 (4H, m).



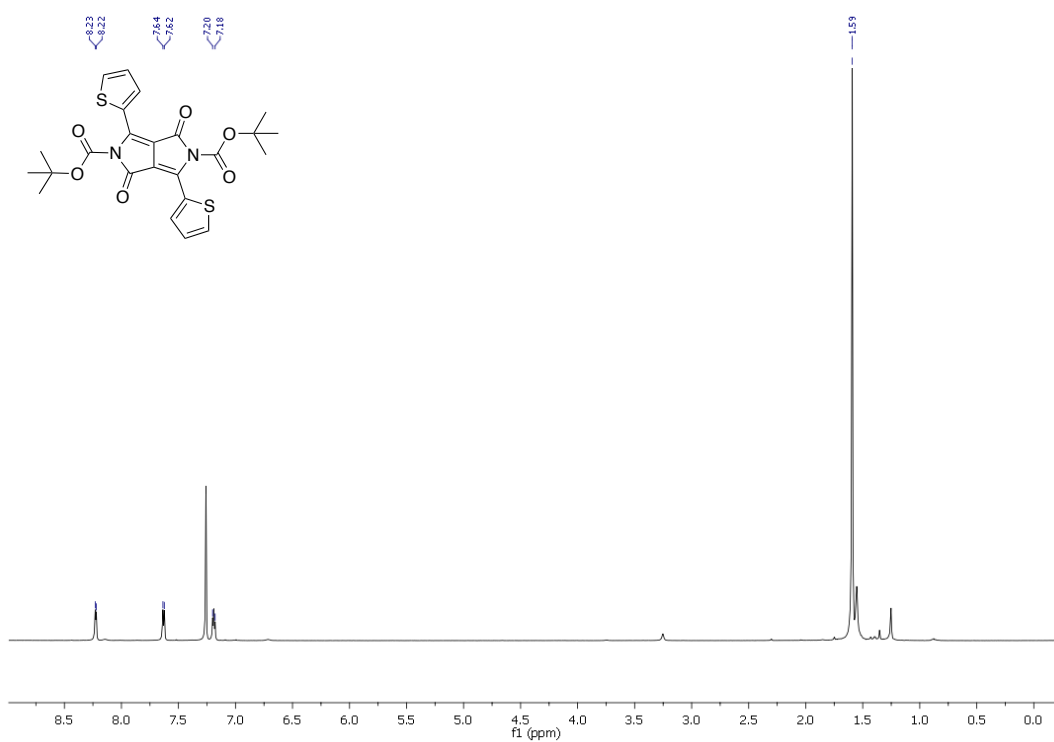
11. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO , 100MHz), δ (ppm): 166.4, 147.5, 137.7, 110.2, 79.2, 75.0, 31.3.



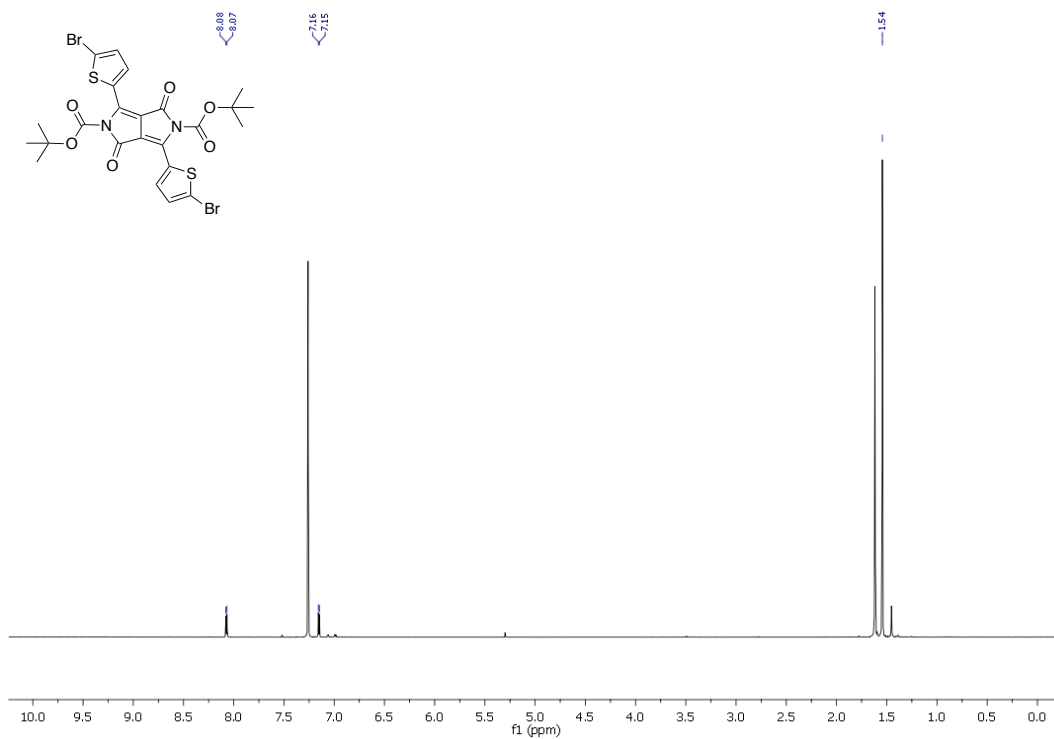
12. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz), δ (ppm): 11.24 (2H, s), 8.21-8.20 (2H, m), 7.97-7.95 (2H, m), 7.31-7.29 (3H, m).



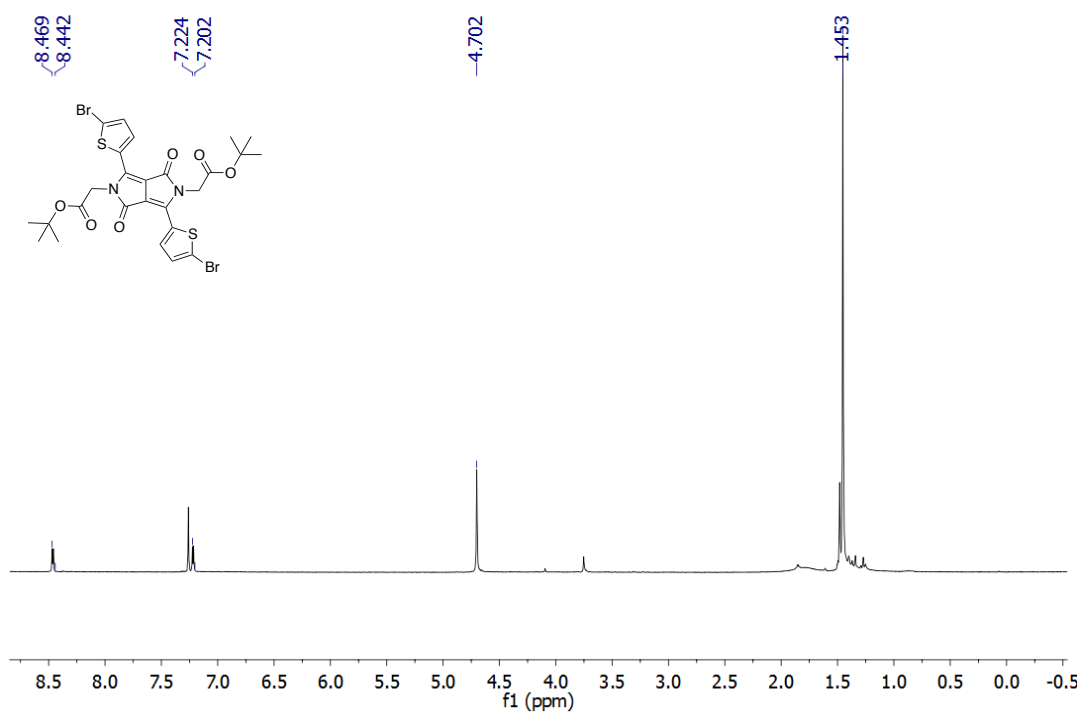
13. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 8.23-8.22 (2H, m), 7.64-7.62 (2H, m), 7.20-7.18 (2H, m), 1.59 (18H, s).



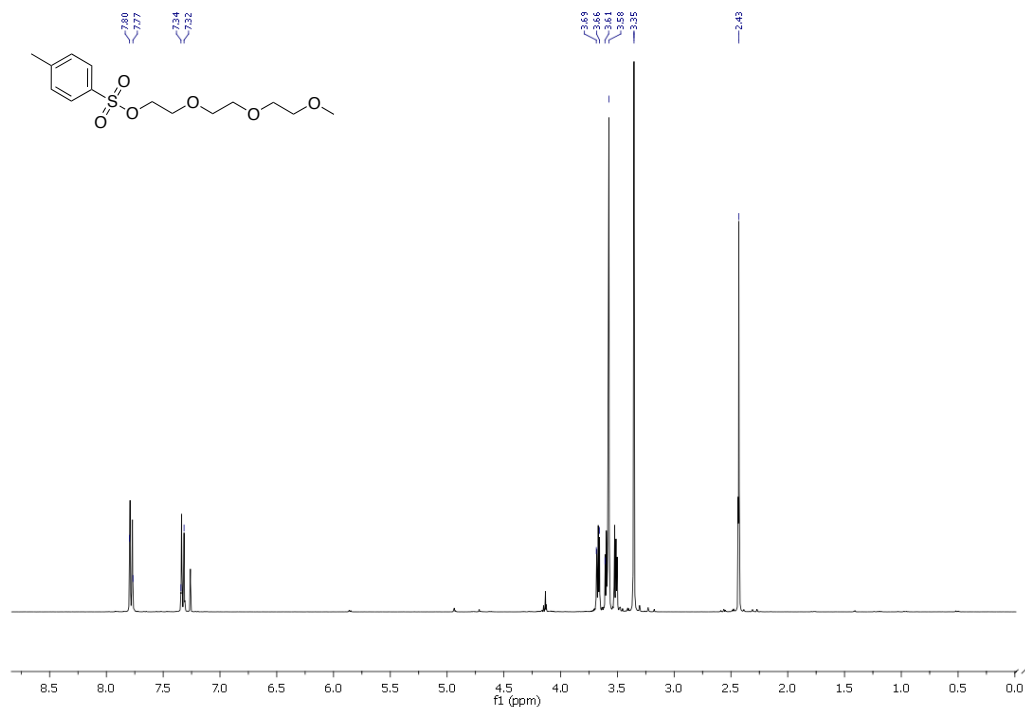
14. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 8.08-8.07 (2H, m), 7.16-7.15 (2H, m), 1.54 (18H, s).



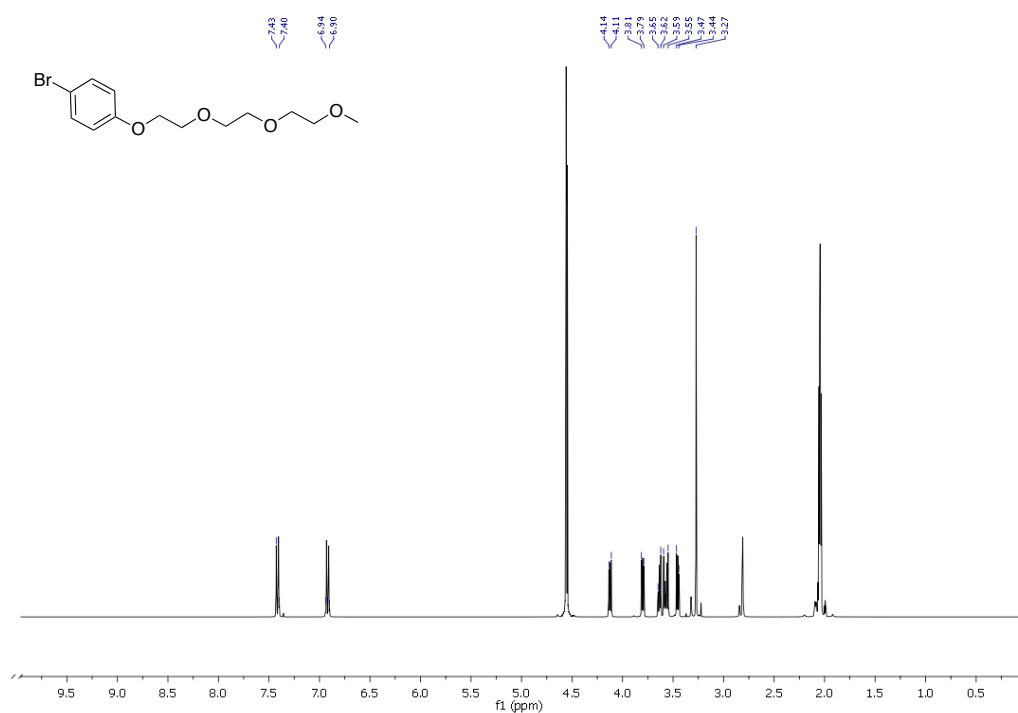
15. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 8.47-8.44 (2H, m), 7.22-7.20 (2H, m), 4.70 (4H, s), 1.45 (18H, s).



16. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.80-7.77 (2H, m), 7.34-7.32 (2H, m), 3.69-3.55 (2H, m), 3.61-3.58 (10H, m), 3.35 (3H, s).



17. $^1\text{H-NMR}$ (Acetone-d_6 , 400 MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.43-7.40 (2H, m), 6.94-6.90 (2H, m), 4.14-4.11 (2H, m), 3.81-3.79 (2H, m), 3.65-3.62 (2H, m), 3.59-3.55 (4H, m), 3.47-3.44 (2H, m), 3.27 (3H, s).



19. ¹H-NMR (Acetone-d₆, 400 MHz), δ(ppm): 7.23-7.18 (2H, m), 7.03-6.95 (4H, m), 6.85-6.74 (6H, m), 4.12-4.06 (4H, m), 3.87-3.72 (4H, m), 3.77-3.72 (4H, m), 3.70-3.64 (8H, m), 3.57-3.52 (4H, m), 3.38 (6H, s).

