

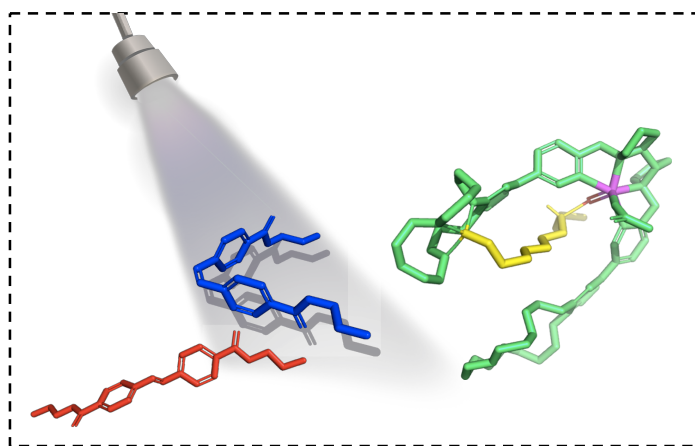


SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

Inibitori Fotomodulabili per un Catalizzatore Supramolecolare



Supervisore
Prof. Stefano Di Stefano

Candidato
Luis Claudio Pantaleone

Matricola
1614920

Anno Accademico 2018/2019

“The crises of our time, it becomes increasingly clear, are the necessary impetus for the revolution now under way. And once we understand nature's transformative powers, we see that it is our powerful ally, not a force to feared our subdued”

Thomas Kuhn

Sommario

INTRODUZIONE	4
CHIMICA SUPRAMOLECOLARE PER LA CATALISI BIOMIMETICA	4
I PRIMI ENZIMI ARTIFICIALI	6
OSSIDAZIONE REGIOSELETTIVA DI LEGAMI C-H ALIFATICI	8
FOTOREGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ CATALITICA NEGLI ENZIMI ARTIFICIALI	12
SCOPO DELLA TESI	16
RISULTATI E DISCUSSIONE	19
TEST PRELIMINARI SULLA RESISTENZA ALL'OSSIDAZIONE DEL PONTE AROMATICO	19
SINTESI DELL'INIBITORE DALL'ACIDO P-AMMINO BENZOICO	20
SINTESI DELL'INIBITORE DALL'ACIDO P-NITRO BENZOICO	23
STUDI PRELIMINARI SULLE PROPRIETÀ DELL'INTERRUTTORE MOLECOLARE	28
SVILUPPI FUTURI	33
CONCLUSIONI	35
PARTE SPERIMENTALE	37
STRUMENTAZIONE	37
MATERIALI	37
PROVE DI OSSIDAZIONE SUL PONTE AROMATICO	38
SINTESI DELL'(E)-4,4'-(DIAZENE-1,2-DIYL)DIBENZOIC ACID (9)	40
SINTESI DEL BIS(2-((TERT-BUTOXYCARBONYL)AMINO)ETHYL) 4,4'-(DIAZENE-1,2-DIYL)(E)-DIBENZOATE (10)	42
PROVE DI COUPLING OSSIDATIVO SUL P-AMMINO BENZOATO DI ETILE	47
SINTESI DEL 2-((TERT-BUTOXYCARBONYL)AMINO)ETHYL 4-NITROBENZOATE (11)	50
SINTESI DEL 2-((TERT-BUTOXYCARBONYL)AMINO)ETHYL 4-AMINOBENZOATE (12)	52
SINTESI DEL BIS(2-((TERT-BUTOXYCARBONYL)AMINO)ETHYL) 4,4'-(DIAZENE-1,2-DIYL)(E)-DIBENZOATE (10)	56
SINTESI DEL (E)-2,2'-((4,4'-(DIAZENE-1,2-DIYL)BIS(BENZOYL))BIS(OXY))BIS(ETHAN-1-AMINIUM) TETRAFLUOROBORATE (8)	58
(Z)-2,2'-((4,4'-(DIAZENE-1,2-DIYL)BIS(BENZOYL))BIS(OXY))BIS(ETHAN-1-AMINIUM) TETRAFLUOROBORATE (8)	62
BIBLIOGRAFIA	64

Introduzione

Chimica supramolecolare per la catalisi biomimetica

Uno dei compiti più ardui della scienza è quello di mediare il rapporto tra la l'uomo e la Natura dove quest'ultima rappresenta primariamente una fonte inesauribile di ispirazione ed insegnamento. Uno dei campi di ricerca dove tecnica e progresso scientifico non hanno che esplorato la punta dell'iceberg è la catalisi enzimatica. Lo studio dei meccanismi, plasmati in migliaia di anni dal processo evolutivo, rivela come la Natura si avvalga di straordinari ingranaggi come enzimi, ribozimi ed abzimi per realizzare reazioni indispensabili alla vita.

Il processo di fissazione dell'azoto molecolare ad opera dei microrganismi diazotrofi è una prova della perfezione raggiunta dai sistemi biologici nel campo della catalisi chimica. La riduzione dell'azoto ad ammoniaca è un processo costoso in termini termodinamici e che presenta una proibitiva barriera di attivazione di $100 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Le condizioni di reazione sfruttate nel processo Haber, la principale fonte di azoto ammoniacale per l'industria mondiale del fertilizzante, prevedono oltre all'uso della magnetite come catalizzatore artificiale, una temperatura compresa tra 400-850 K e una pressione di 50-200 atm.¹ I batteri responsabili dello stesso processo in natura, attraverso l'impiego delle nitrogenasi, sono in grado di fissare l'azoto a temperatura ambiente e in condizioni fisiologiche.

L'efficienza non è la sola caratteristica invidiabile della catalisi enzimatica. La selettività e la specificità sorprendenti con le quali gli enzimi riconoscono e reagiscono con i substrati naturali, meccanismo descritto da Emil Fischer come "lock and key", è tra gli strumenti più sofisticati mai osservati nei processi biochimici.²

Tra gli aspetti certamente più apprezzati dei sistemi biologici troviamo inoltre la costante catalitica. Negli enzimi perfetti come l'acetilcolina esterasi, sfruttata nella comunicazione sinaptica, la velocità di conversione può raggiungere valori prossimi a

quelli diffusionali. Riprodurre l'elevatissimo turnover osservato negli enzimi costituisce quindi un terzo obiettivo nel campo della catalisi chimica.^{3, 4}

Infine, lo studio dei meccanismi di inibizione e attivazione, attraverso i quali gli organismi possono modulare l'attività enzimatica, costituisce una grande fonte di ispirazione per lo sviluppo di nuovi catalizzatori artificiali e biosensori.

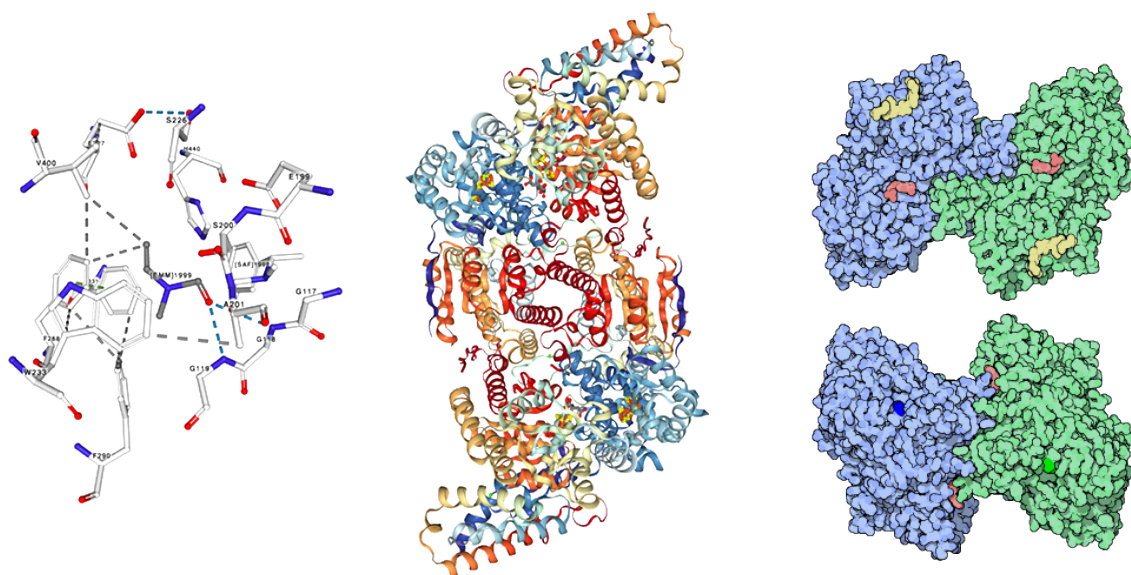


Figura 1: sito attivo della acetilcolina esterasi (sinistra); struttura terziaria della rodopsina (centro); enzima nitrogenasi (destra).³

La catalisi biomimetica è quindi un approccio che punta alla riproduzione dei processi biologici, mettendo in campo i principi chiave e le tecniche della catalisi enzimatica. Secondo l'interpretazione di Pauling⁵ il potere catalitico è frutto della stabilizzazione selettiva dello stato di transizione rispetto ai reagenti. Uno degli aspetti più delicati nella progettazione degli enzimi artificiali consiste infatti nello sviluppo di siti di riconoscimento in grado di legare il substrato ma che mostrino contemporaneamente un'affinità ancora maggiore per il complesso attivato la cui natura è difficilmente accessibile per definizione.

Una delle strategie meglio riuscite in questo intento è l'approccio supramolecolare che si basa sull'impiego di interazioni deboli e reversibili che non prevedono l'uso di legami covalenti. Il meccanismo di funzionamento di gran parte degli enzimi sfrutta una chimica molto simile: il riconoscimento del substrato nel sito attivo e la

stabilizzazione dello stato di transizione avviene infatti attraverso questa famiglia di interazioni. Tra gli esempi più ricorrenti riscontrati nella catalisi enzimatica vi sono il legame idrogeno, interazioni idrofobe, coppie ioniche, interazioni $\pi - \pi$, interazioni $\text{ione}-\pi$ e molte altre forze riproducibili in un contesto di chimica supramolecolare.⁶

I primi enzimi artificiali

L'applicazione della chimica supramolecolare al servizio della catalisi biomimetica è un'intuizione che risale agli anni settanta quando lo studio dei meccanismi enzimatici aveva portato alla diffusione dei primi strumenti in grado di riprodurre il riconoscimento molecolare come gli eteri corona, criptandi, ciclodestrine e i calixareni.⁷ Uno dei primi catalizzatori artificiali, fortemente ispirato dai meccanismi enzimatici, è stato sviluppato da Cram e collaboratori.⁸ In questo lavoro pionieristico è stato riportato come la transacilazione di sali di α -ammino esteri può essere promossa da un catalizzatore chirale dotato di polieteri macrociclici per il riconoscimento supramolecolare (Figura 2).

In particolare, il catalizzatore di Cram riproduce artificialmente il sito attivo di enzimi come la tripsina che sfruttano residui amminoacidici con gruppi tiolici per mediare la transacilazione di proteine o peptidi via tioesteri. La stabilizzazione selettiva dello ST è dovuta alla presenza degli eteri corona che agendo da accettori di legami idrogeno sono in grado di legare l' α -ammonio donatore nel substrato. Questo effetto è stato

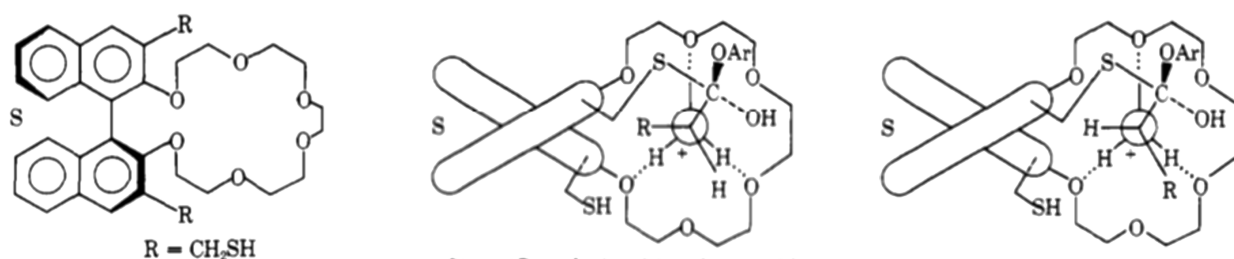


Figura 2: a sinistra rappresentazione del catalizzatore di Cram; al centro interazione favorita tra catalizzatore (S) con substrato (L); a destra interazione sfavorita tra catalizzatore (S) con substrato (D).⁸

verificato confrontando la velocità della reazione condotta con ditioli funzionalizzati con eteri corona e i loro corrispettivi a catena aperta, osservando un incremento della costante di velocità di un fattore da 10^2 a 10^3 in solventi apolari.

Il riconoscimento supramolecolare introduce inoltre una seconda caratteristica molto diffusa negli enzimi naturali: l'enantioselettività. Essendo il catalizzatore un derivato del binaftile, la presenza di un asse stereogenico nella struttura induce velocità di reazione diverse con gli enantiomeri di α -ammino esteri chirali. In particolare è stato osservato che gli L-ammino esteri stericamente ingombrati reagiscono più rapidamente con l'S-ditiolo piuttosto che con il suo enantiomero.

Un secondo obiettivo perseguito dalla catalisi supramolecolare consiste nel riprodurre la reversibilità e la possibilità di modulare le interazioni di riconoscimento. Questa strategia è la chiave che permette di prevenire i meccanismi di inibizione da prodotto.

Seguendo questi principi, Breslow e i suoi collaboratori⁹ hanno sviluppato un enzima artificiale equipaggiato con β -ciclodestrine in grado di promuovere l'idrolisi di esteri attraverso il riconoscimento di gruppi funzionali terbutilici o adamantanici (Figura 3). In ambiente acquoso le estremità idrofobe del substrato si inseriscono all'interno dei siti di riconoscimento ottenendo la pre-organizzazione del sito catalitico. Il substrato, rigidamente bloccato nel catalizzatore di Breslow, espone la funzione carbonilica ad un'unità bipyridinica che coordina uno ione rame (II) in grado di promuoverne l'idrolisi. Questo esempio di catalizzatore supramolecolare sfrutta la spinta entropica data dall'idrolisi del substrato per favorire il rilascio del prodotto. Passando da

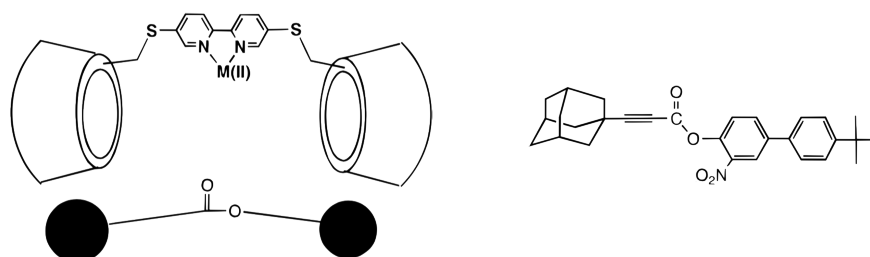


Figura 3: Catalizzatore di Breslow e rappresentazione schematica del substrato (sinistra); struttura dell'estere utilizzato come substrato (destra).⁹

un'interazione 1:1 catalizzatore-reagente ad un'interazione 1:2 catalizzatore-prodotti dopo la scissione idrolitica, il guadagno entropico offerto dalla dissociazione è sufficiente a scongiurare l'inibizione da prodotto.

Ossidazione regioselettiva di legami C-H alifatici

Uno dei campi di ricerca dove l'approccio supramolecolare ha portato ad interessanti sviluppi è la catalisi ossidativa di legami C-H alifatici. L'introduzione di gruppi funzionali in posizioni specifiche e difficilmente distinguibili, come nelle lunghe catene alifatiche, è un obiettivo ambizioso in sintesi organica. Il rinnovato interesse nella ricerca di catalizzatori in grado di promuovere ossidazioni regioselettive di idrocarburi saturi è quello di sviluppare dei processi in grado di valorizzare substrati dal basso valore commerciale e largamente diffusi come sottoprodotti dell'industria petrolchimica.

Il principale ostacolo all'ossidazione regioselettiva consiste nell'impossibilità di discriminare la reattività nelle posizioni intermedie della catena, vista la presenza di un intorno chimico pressoché equivalente. La soluzione offerta dall'approccio supramolecolare è molto semplice e ricalca concettualmente il funzionamento di un sito attivo di un catalizzatore naturale. Come accennato in precedenza, una componente importante della struttura terziaria di molte proteine enzimatiche è infatti la presenza di un sito di riconoscimento: la funzione principale di questa struttura è quella di legare reversibilmente il substrato e preorganizzare la molecola orientandola correttamente verso i residui catalitici.

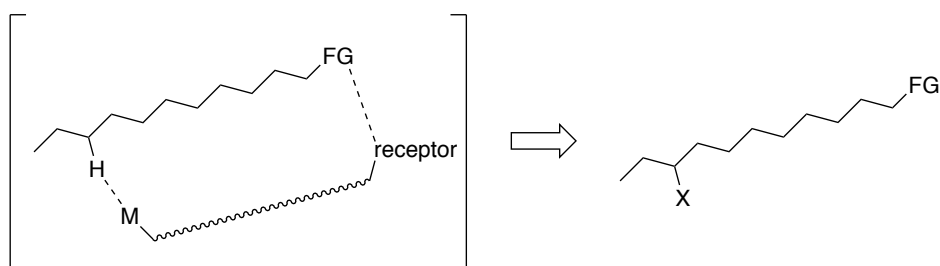


Figura 4: rappresentazione schematica dell' meccanismo d'azione di un catalizzatore supramolecolare per ossidazioni regioselettive di idrocarburi saturi

Allo stesso modo un catalizzatore supramolecolare è costituito da un recettore, in grado di legare un gruppo funzionale terminale della catena alifatica, collegato tramite uno spacer al sito catalitico, tipicamente costituito da un centro metallico in grado di promuovere l'ossidazione (Figura 4). Attraverso il riconoscimento supramolecolare è possibile fronteggiare la mancanza di effetti elettronici o di una forte discriminazione sterica sul substrato.

In questo contesto si colloca il lavoro recentemente pubblicato da Di Stefano e collaboratori che riportano come un complesso di Mn funzionalizzato con eteri corona per il riconoscimento supramolecolare sia in grado di ossidare regioselettivamente ammine alifatiche a catena estesa.¹⁰ Il catalizzatore **1** (Figura 6) deriva da un complesso PDP del tipo White-Chen che in presenza di H₂O₂ può notoriamente ossidare legami C-H alifatici attraverso un meccanismo HAT.¹¹ La formazione della specie responsabile del processo catalitico, un manganese osso-complesso, è descritta in Figura 5.

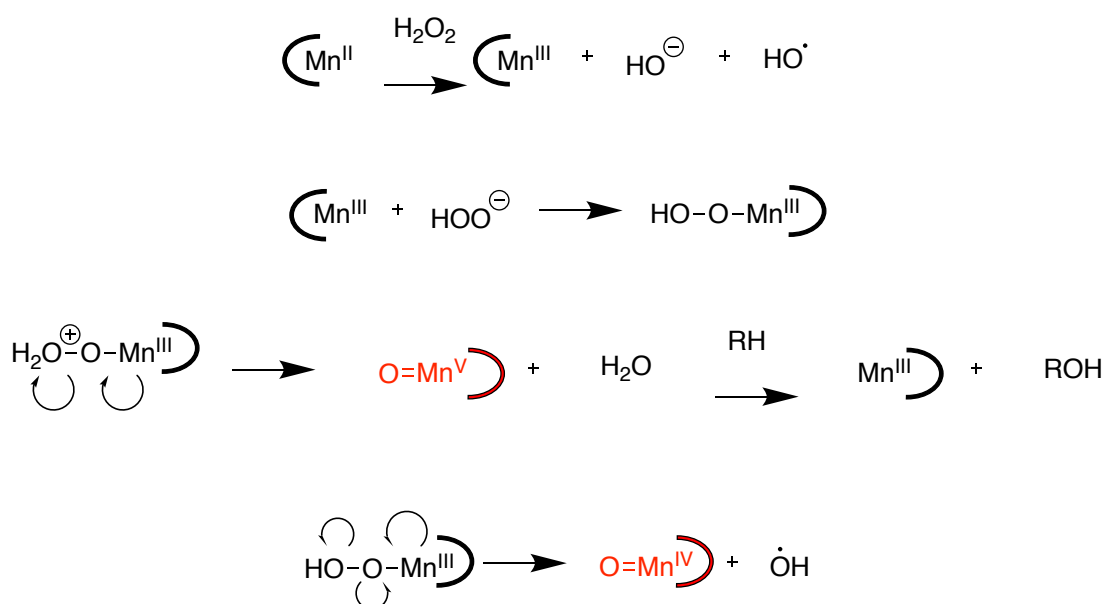


Figura 5: meccanismo di formazione del manganese osso-complesso. In competizione con il processo di ossidazione catalitica promossa dal Mn(V) concorre la formazione del Mn(IV) (ossidante stechiometrico). Il meccanismo catalitico è favorito in presenza di un eccesso di acido.

Confrontando i prodotti ottenuti ossidando diverse ammine alifatiche con i catalizzatori **1** e **2** si osserva come l'introduzione dei siti di riconoscimento, in grado di

legare lo ione ammonio, influenzi profondamente la regioselettività della reazione (Figura 7). Mentre il complesso **2** non è in grado discriminare le posizioni della catena alifatica, il complesso **1** esibisce una preferenza per l'ossidazione delle posizioni C8 e C9 ed i chetoni risultanti raggiungono l'81% della miscela di prodotti. Questa regioselettività si mantiene anche variando la lunghezza della catena alifatica nel substrato. Il meccanismo di interazione proposto da Di Stefano ipotizza che l'ossidazione sia favorita dall'intramolecolarità e che nello stato di transizione l'ammina alifatica sia organizzata per interagire con il sito catalitico esponendo le posizioni attivate al metallo osso complesso.

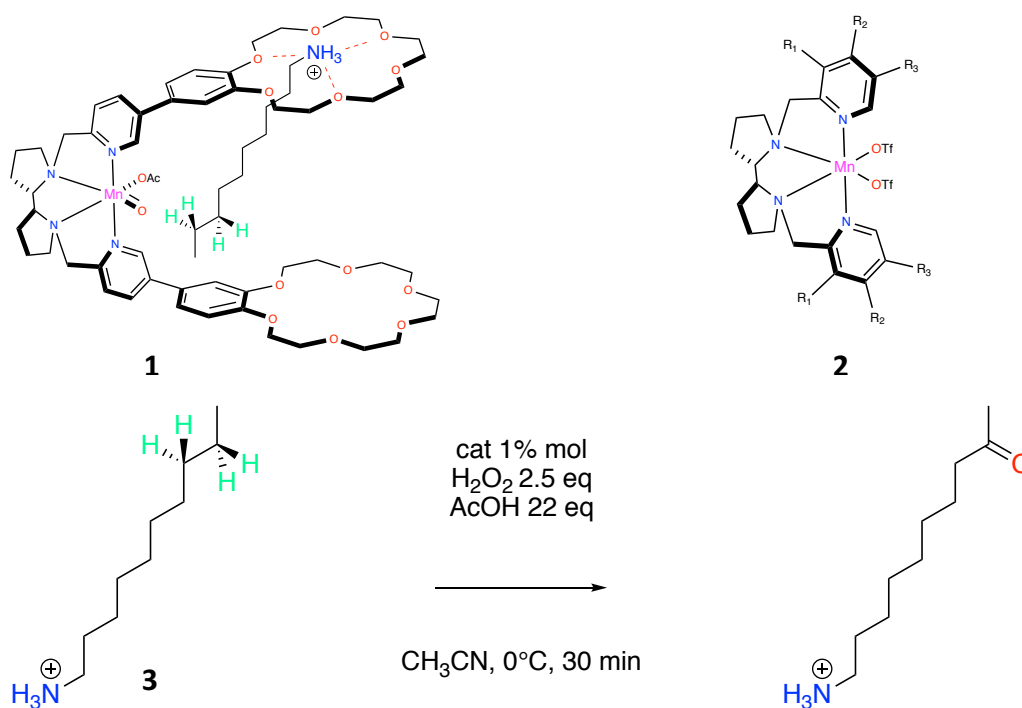


Figura 6: complesso **1** rappresentato sotto forma di osso complesso legato ad un'ammina alifatica (in alto a sinistra); $R_1=R_2=R_3=H$ complesso **2** di White-Chen, $R_1=R_2=H$ $R_3=$ triisopropilsilil complesso **TIPS₂**, $R_1=R_3=CH_3$ $R_2=OCH_3$ complesso **DMM₂** (in alto a destra); schema di reazione d'ossidazione regioselettiva di ammine alifatiche con complesso **1** (in basso al centro)

È stato inoltre osservato che il riconoscimento supramolecolare a carico degli eteri corona è in grado di ossidare selettivamente le ammine alifatiche anche in presenza di altri substrati favoriti in termini di BDE come nel caso dell'isomentile acetato (**4**).¹² L'effetto della preorganizzazione, stato stimato in termini di energia libera di attivazione, è pari a $3.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

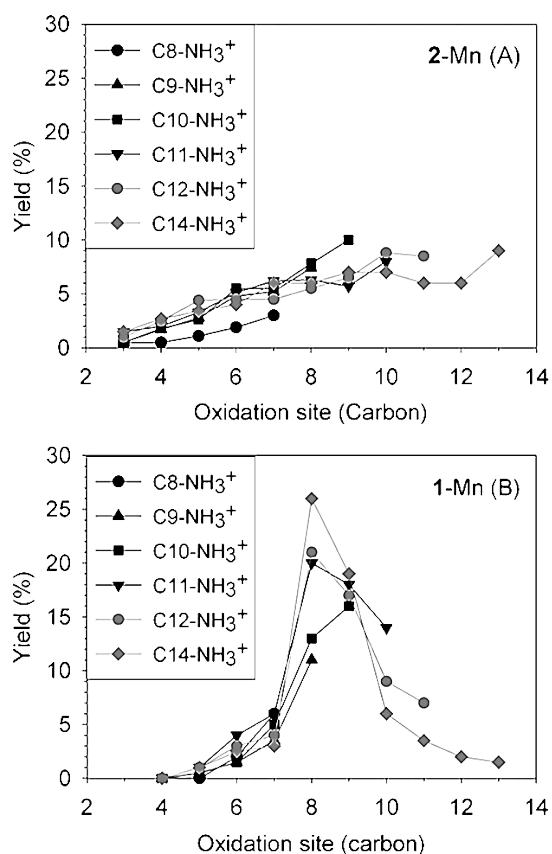


Figura 7: distribuzione dei siti ossidati nelle ammine alifatiche ottenuta con il complesso **2** (A) e con il complesso **1** (B) al variare della lunghezza della catena del substrato





Entry	Cat.	Competing subs.	3 oxid (%)	Subs. oxid (%)	3 : subs product ratio ^b
1	2	4	6	25	1:4
2	TIPS ₂	''	29	56	1:2
3	DMM ₂	''	8	40	1:5
4	1	''	40	0.7	57:1
5 ^c	1 + Ba ²⁺	''	11	40	1:4
6	1		27	0.7	39:1
7	2	''	1.5	14	1:8
8	1		26	5	5:1
9	2	''	1	30	1:30
10	1		21	15	1.4:1
11	2	''	0.4	30	1:75
12	1		32	14	2.3:1
13	2	''	0.3	60	<1:99

Tabella 1: studio della ripartizione dei prodotti di ossidazione competitiva tra decan-1-ammonio **3** e diversi substrati favoriti in termini di BDE (isomentile acetato **4**), confronto tra i risultati ottenuti con il complesso **1**, **2**, TIPS₂, DMM₂

Per evidenziare come alla base dell'inversione di reattività non vi sono effetti elettronici o sterici ma il riconoscimento supramolecolare, sono stati effettuati esperimenti di ossidazione competitiva comparando i risultati ottenuti utilizzando il complesso **1** con quelli ricavati in presenza di catalizzatori di White stericamente ingombrati o attivati da gruppi ERG (Tabella 1). Come ulteriore prova a supporto del ruolo svolto dai polieteri macrociclici, conducendo la reazione catalizzata dal complesso **1** in presenza di Ba²⁺, gli effetti del riconoscimento supramolecolare sono completamente neutralizzati ripristinando le regio- e chemoselettività riscontrate nel complesso **2**.

Questi risultati dimostrano come il riconoscimento supramolecolare sia uno strumento potente che consente di trasferire proprietà enzimatiche ai catalizzatori artificiali. L'applicazione di queste tecniche rappresenta una soluzione innovativa a problemi complessi della sintesi organica come nel campo delle ossidazioni regioselettive degli idrocarburi saturi.

Fotoregolazione dell'attività catalitica negli enzimi artificiali

Come accennato in precedenza una caratteristica essenziale della catalisi enzimatica è la modulazione. La glicogeno fosforilasi ad esempio è un enzima che risponde sensibilmente alla concentrazione di glucosio nel sangue e che controlla lo stadio lento della glicogenolisi.¹³ Dopo un picco glicemico l'inibizione di questo enzima consente di rallentare un processo metabolico pleonastico attuando una strategia di risparmio energetico a vantaggio dell'organismo.

In realtà, la capacità di rispondere agli stimoli esterni non è una prerogativa delle proteine enzimatiche ma una proprietà che contraddistingue più in generale la chimica della vita. Il controllo e la regolazione dei processi biochimici sono infatti un presupposto indispensabile alla sopravvivenza degli organismi.

Tra i molti meccanismi di controllo osservati in natura la fotoregolazione rappresenta uno dei fenomeni più riprodotti in campo biomimetico. La ragione primaria è l'efficacia e la semplicità operativa nell'impiego della luce come stimolo esterno, che in combinazione con l'ampia offerta di sistemi fotoregolabili, hanno portato ad una vasta gamma di applicazioni che vanno dalla drug delivery allo sviluppo di biosensori.

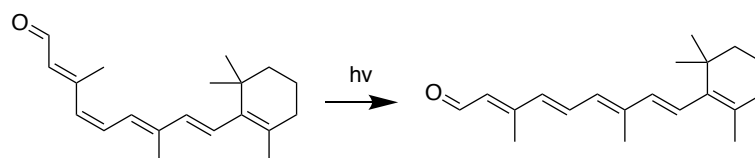


Figura 8: isomerizzazione fotoindotta del 11-cis-retinale, cofattore della rodopsina. La conversione nella forma trans genera il potenziale d'azione che si propaga attraverso il nervo ottico

Tra i recettori fotosensibili presenti in natura, un caso che ha notoriamente ispirato la ricerca e lo sviluppo dei primi photoswitch artificiali, è rappresentato dalle opsine.¹⁴ Queste proteine transmembrana situate nella retina consentono la conversione dei segnali luminosi in stimoli sensoriali. Il cofattore responsabile dei cambiamenti conformazionali dell'opsina è il retinale (vitamina A) la cui foto-stimolazione induce un'isomerizzazione cis-trans che attiva la risposta sensoriale (Figura 8).¹⁵ Il principio

di interazione con la luce osservato nelle opsine è stato riprodotto artificialmente attraverso diversi cromofori utilizzati nella sintesi degli interruttori molecolari come i diarileteni, lo spiropirano o l'azobenzene.¹⁶

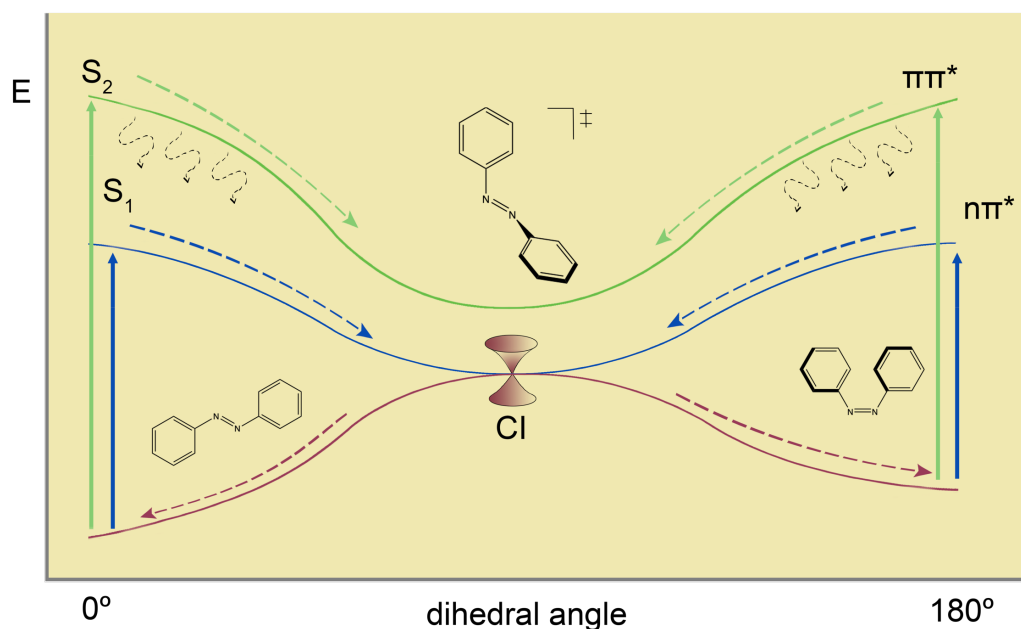


Figura 9: fotoisomerizzazione dell'azobenzene. In seguito alla transizione elettronica l'indebolimento del legame N=N nello stato eccitato ne facilita la rotazione.

La foto-isomerizzazione dell'azobenzene, forse il più classico tra gli esempi sopracitati, è rappresentata in Figura 9 dove è mostrata la conversione dell'isomero E (quasi planare nella sua forma metastabile Z.¹⁷ Il processo avviene grazie alla presenza di due stati elettronici eccitati S₁ o S₂ (ciascuno con la propria resa quantica) e l'effetto è promosso dalla presenza di un'intersezione conica (CI). Le bande di assorbimento elettronico responsabili della foto-eccitazione dipendono fortemente dalla presenza di gruppi π donatori/accettori sugli anelli aromatici. L'effetto dei sostituenti sul cromoforo si ripercuote quindi sulle diverse caratteristiche dell'interruttore molecolare come la resa quantica, la stabilità termica o l'emivita degli isomeri. La fotoisomerizzazione induce netti cambiamenti di polarità e geometria molecolare che possono essere sfruttati come innesco nei meccanismi di regolazione.

Uno dei primi casi di fotoregolazione accoppiata allo sviluppo di enzimi artificiali consiste nel complesso “farfalla” ideato da Cacciapaglia e dai suoi collaboratori.¹⁸ Questo catalizzatore supramolecolare è un complesso di bis-bario costituito da due eteri corona e da un’unità di azobenzene che funge da spaziatore (Figura 10). Il complesso “farfalla” **5** è in grado di catalizzare l’etanolisi di anilidi ed esteri del substrato grazie al riconoscimento supramolecolare.

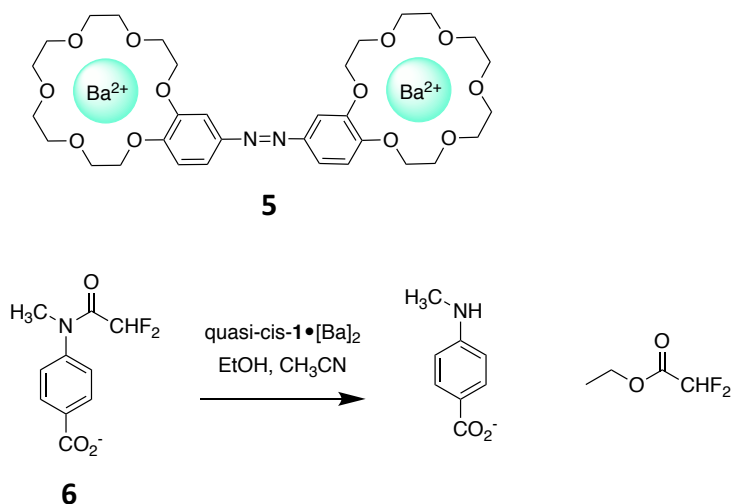


Figura 10: complesso “farfalla” **5** (in alto); schema di reazione dell’etanolisi dell’anilide **6** catalizzata da quasi-cis-5[Ba]²⁺ (in basso)

Il bario coordinandosi al carbossilato può fissare un’estremità del reagente mentre l’altro catione esalta l’elettrofilia del carbonile predisponendolo all’attacco nucleofilo dell’etossido, inoltre il catione rende le molecole di etanolo coordinate più acide e facilita la catalisi acida nella decomposizione dell’intermedio tetraedrico (Figura 11).

La modulazione dell’attività deriva dall’isomerizzazione fotostimolata

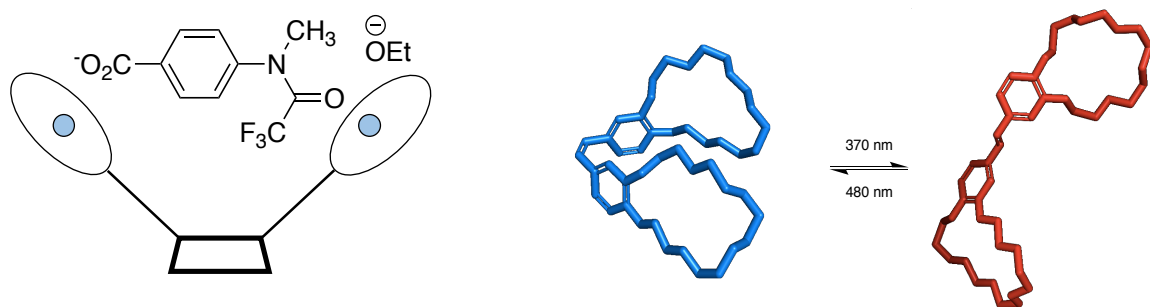


Figura 11: schema raffigurante il meccanismo dell’etanolisi di anilidi catalizzata da quasi-cis-5[Ba]²⁺ (a sinistra); isomerizzazione fotostimolata di **5**

dell'azobenzene: nella forma quasi-cis il catalizzatore possiede infatti la geometria adatta alla preorganizzazione ideale del sito poiché l'orientazione e la distanza tra i recettori supramolecolari rispecchiano quelle riscontrate nel substrato. Tuttavia, dato che l'attività catalitica nell'isomero trans non è completamente azzerata, il complesso "farfalla" non è propriamente un interruttore molecolare ma è preferibile riferirsi ai due isomeri come forme ad elevata o ridotta attività catalitica.

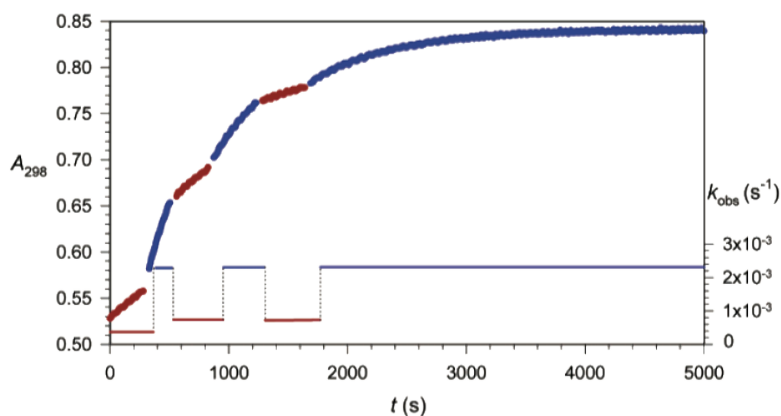


Figura 12: cinetica di formazione del prodotto di etanolisi basica di **6** promuovendo ripetutamente la fotoconversione del catalizzatore **5**: 480 nm per 20 s ($trans\text{-}5\text{-}[\text{Ba}]^{2+} \rightarrow \text{quasi-cis}\text{-}5\text{-}[\text{Ba}]^+$), 370 nm per 20 s ($\text{quasi-cis}\text{-}5\text{-}[\text{Ba}]^{+2} \rightarrow \text{trans}\text{-}5\text{-}[\text{Ba}]^{2+}$)¹⁸

In ogni caso, la modulazione dell'attività consente di esercitare un controllo efficace sulla velocità del processo catalizzato come testimoniato dalla cinetica rappresentata in Figura 12 dove la fotoconversione $trans\text{-}5\text{-}[\text{Ba}]_2 \rightarrow \text{quasi-cis}\text{-}5\text{-}[\text{Ba}]_2$ dell'catalizzatore è accompagnata da un incremento della velocità di formazione del prodotto. Il complesso "farfalla" rappresenta un esempio di come è possibile estendere la capacità di controllo nei processi catalizzati da enzimi artificiali attraverso l'uso della fotoregolazione come strumento di modulazione dell'attività.

Scopo della Tesi

Lo scopo di questa tesi magistrale consiste nel sintetizzare un *photoswitch* in grado di inibire, nella sua forma attiva, il catalizzatore supramolecolare **1**. Il principio che ha guidato questo lavoro sperimentale è la volontà di estendere le caratteristiche “enzimatiche” del complesso **1** che ha già dimostrato precedentemente di catalizzare l’ossidazione regioselettiva e chemoselettiva di legami C-H nelle ammine alifatiche. Sviluppando un inibitore con un’affinità modulabile per il complesso **1** sarebbe possibile controllare la velocità del processo ossidativo, verificando inoltre fino a che punto il riconoscimento supramolecolare possa essere sfruttato per riprodurre meccanismi biochimici complessi come la fotoregolazione.

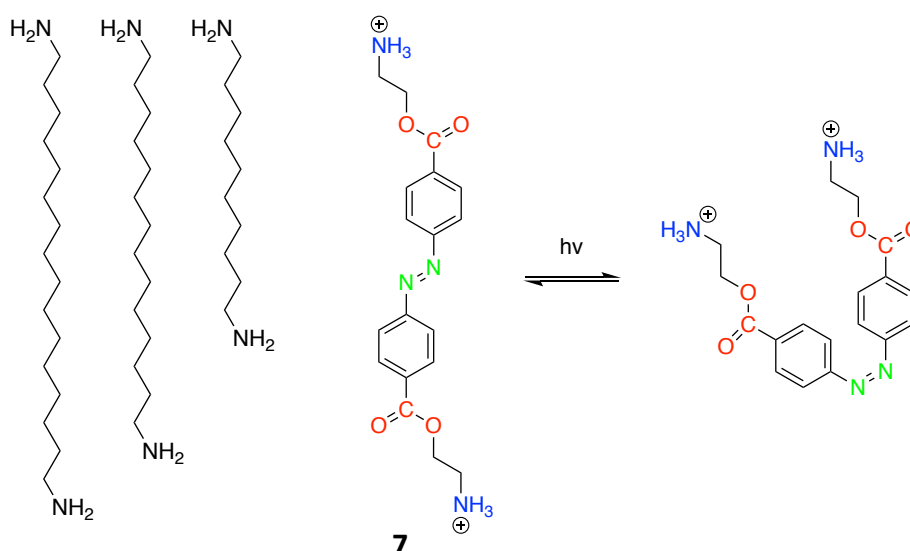


Figura 13: diammine alifatiche a 12, 14 e 16 termini (a sinistra). Solamente i due idrocarburi a catena più lunga sono inibitori competitivi del catalizzatore **1**; foto-isomerizzazione della diazina **7** (a destra). La distanza interatomica tra le funzioni ammonio nell' isomero E è paragonabile alle diammine a 14 e 16 termini.

Al fine di raggiungere tale obiettivo è stato sviluppato il design molecolare della diazina (**7**) che esprime molti dei principi riscontrati precedentemente nella progettazione degli enzimi artificiali. La struttura dell'inibitore possiede tre caratteristiche fondamentali riassunte in Figura 13.

1. La presenza di due funzioni ammonio, in grado di legare reversibilmente i recettori eteri corona sul catalizzatore supramolecolare, è necessaria per sviluppare una costante di *binding* sufficientemente elevata. Associandosi al catalizzatore, l'inibitore **7** renderebbe stericamente inaccessibile alle ammine alifatiche il sito di ossidazione. La presenza di due donatori di legame idrogeno consentirebbe inoltre un'inibizione competitiva efficace anche in presenza di concentrazioni elevate di substrato.
2. Per introdurre la possibilità di modulare l'affinità tra catalizzatore ed inibitore un azogruppo è stato inserito all'interno dello spaziatore aromatico che congiunge le due teste d'ammonio. Come accennato in precedenza, questo gruppo funzionale se foto-stimolato può isomerizzare il doppio legame N=N, passando reversibilmente da una geometria trans ad una cis. Confrontando le distanze interatomiche tra le teste d'ammonio nei due isomeri con le dimensioni di diammine alifatiche, precedentemente utilizzate come inibitori irreversibili di **1**, ragionevolmente solo la forma trans (isomero generalmente più stabile a T_{amb}) consentirebbe di legare efficacemente entrambi i recettori supramolecolari.
3. Affinché il meccanismo di inibizione sia reversibile è importante prevenire l'idrossilazione delle unità aromatiche nell'inibitore che saranno esposte al sito di ossidazione del Mn=O complesso. È stato riportato in letteratura che in presenza di fenossidi l'efficienza di catalizzatori N2Py2 è compromessa a causa del *binding* irreversibile con il centro metallico.¹⁹ Per sfavorire il processo di HAT che porterebbe all'inattivazione del catalizzatore sono stati introdotti gruppi EWG esterei sugli anelli aromatici dell'inibitore.

L'esperimento finale attorno al quale è stato modellato il design molecolare di **7** consiste nell'osservazione degli effetti prodotti sulla cinetica di ossidazione delle ammine alifatiche catalizzata da **1** ripetendo ciclicamente accensione e spegnimento dello *switch*/inibitore attraverso la sua isomerizzazione foto-indotta (Figura 14).

L'ipotesi avanzata in questo lavoro di tesi sperimentale è che l'interruttore molecolare progettato possieda quindi i presupposti per esercitare, nelle opportune condizioni, un'inibizione foto-modulabile del complesso **1**.

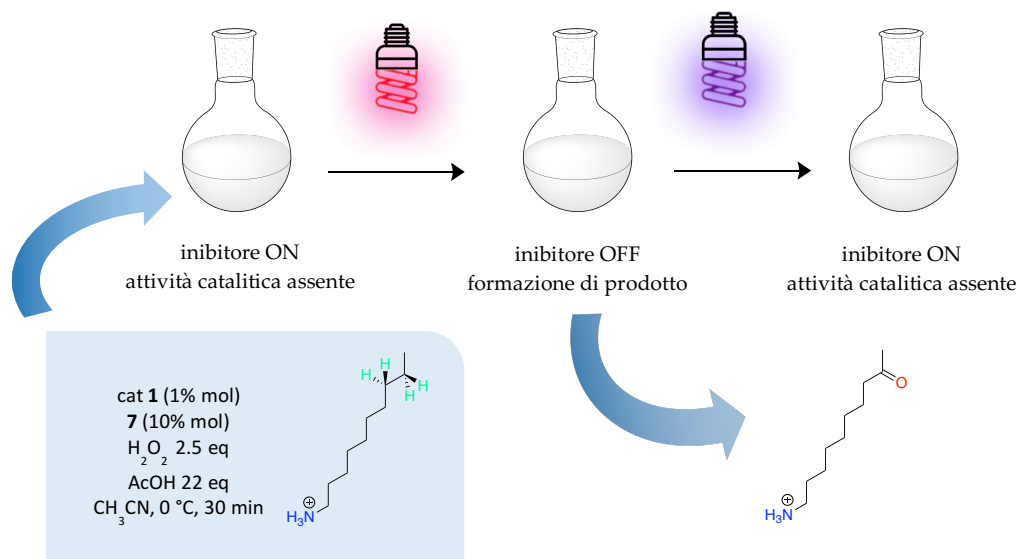


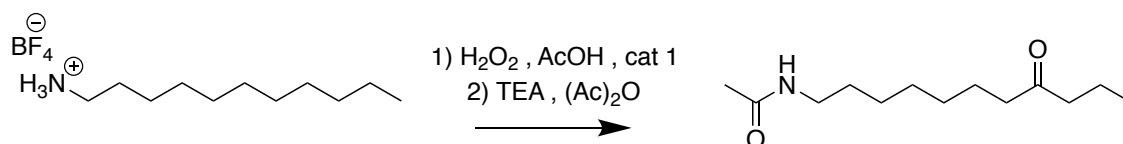
Figura 14: schema riassuntivo delle condizioni sperimentali ipotizzate per un esperimento di inibizione foto-controllata del catalizzatore supramolecolare **1** in presenza del photoswitch **7**

Chiarito il *target* sintetico di questo studio e la sua funzione, un obiettivo secondario di questa tesi consiste nel fornire un'analisi qualitativa delle proprietà dell'interruttore molecolare sintetizzato. In particolare, attraverso una stima dei tempi di foto-stimolazione e rilassamento termico, sarebbe possibile determinare la compatibilità dello *switch*/inibitore con le condizioni sperimentali di catalisi ossidativa.

Risultati e Discussione

Test preliminari sulla resistenza all'ossidazione del ponte aromatico

Durante la prima fase del progetto è stato selezionato lo spaziatore più adatto al design molecolare dell'inibitore. Come accennato in precedenza un requisito importante nella scelta del ponte aromatico è la presenza di gruppi elettron-attrattori in grado di prevenire il trasferimento di atomo di idrogeno con il quale il centro metallico potrebbe ossidare lo stesso inibitore. Il metodo scelto per verificare se il complesso **1** sia avvelenato dalla formazione di fenossidi derivanti dall'ossidazione degli *spacer* consiste nell'ossidare le ammine alifatiche in presenza di composti modello; il consumo di reagente è stato poi confrontato con i risultati ottenuti per la stessa reazione in assenza di interferenti. I composti scelti per rappresentare il ponte aromatico disattivato nell' inibitore sono l'acetofenone e il benzoato di etile mentre l'analisi quantitativa del grezzo di reazione è stata eseguita ricorrendo alla gascromatografia, utilizzando il bifenile come standard interno. I risultati ottenuti, riassunti in Tabella 2 sono molto incoraggianti: i rapporti tra le aree dei cromatogrammi rivelano che il consumo di reagente non è significativamente alterato dalla presenza degli *spacer* aromatici.



Analisi GC-MS			
	Riferimento	Acetofenone 5eq	Benzoato di etile 5 eq
A_s/A_{strd^*}	0.474	0.503	0.527
$(A_s/A_{strd^*})/(A_s/A_{strd^*})_R$	1	1.06	1.11

Tabella 2: l'analisi GC-MS è stata realizzata iniettando il grezzo di reazione dopo aver derivatizzato le ammine con anidride acetica. Dopo aver identificato il reagente attraverso la spettrometria di massa ad impatto elettronico, è stata confrontata l'area del picco nei tre cromatogrammi utilizzando il bifenile* come standard interno.

L'esito positivo di questi test preliminari è supportato da due necessarie considerazioni: se l'attività catalitica del complesso immino-piridinico fosse compromessa non sarebbe possibile ottenere un consumo di reagente paragonabile attraverso meccanismi secondari di tipo Fenton.^{20,21} Inoltre l'ossidazione è stata realizzata in presenza di concentrazioni di acetofenone e di benzoato di etile cinque volte superiori a quella del substrato mentre nell'esperimento di inibizione foto-controllata, l'inibitore (e quindi lo spaziatore aromatico) è presente in quantità catalitiche.

Alla luce di questi risultati è stato quindi scelto di impiegare come *linker* aromatico un diestere simmetrico derivante dall'azobenzene 4,4' disostituito. Una volta definito il design molecolare dell'inibitore **7** è iniziata la fase di sintesi del progetto.

Sintesi dell'inibitore dall'acido p-ammino benzoico

Prima di introdurre lo schema retrosintetico è necessario circoscrivere più dettagliatamente il target della sintesi. La diazina **7**, progettata per inibire il catalizzatore supramolecolare **1**, sarà isolata sotto forma di sale di diammonio (**8**), preferibilmente tetrafluoroborato. Il $(\text{BF}_4)^-$ è uno ione spettatore ideale, già utilizzato come controione dell'ammonio alifatico ossidato da **1** negli esperimenti di catalisi supramolecolare. Questi sali inoltre possiedono generalmente una discreta solubilità in acetonitrile, mezzo scelto per la reazione.

A questo punto è possibile introdurre lo schema raffigurato in Figura 15 che riassume la strategia adottata per la sintesi del sale di diammonio **8**.

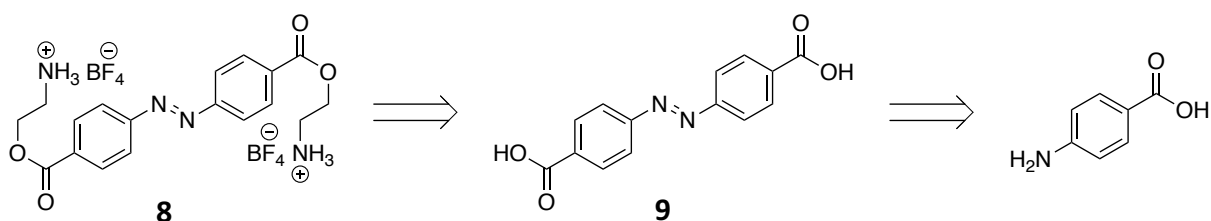


Figura 15: schema retrosintetico del sale di diammonio **8** dall'acido p-ammino benzoico (precursore commerciale)

L'approccio retrosintetico scelto è molto semplice: la prima disconnessione ci consente di derivare il diestere dal diacido sfruttando la simmetria dell'inibitore che si presta bene alle reazioni difunzionali. Successivamente, la formazione dell'azogruppo è stata ricondotta all'accoppiamento di due aniline ottenendo quindi come precursore commerciale l'acido *p*-amminobenzoico.

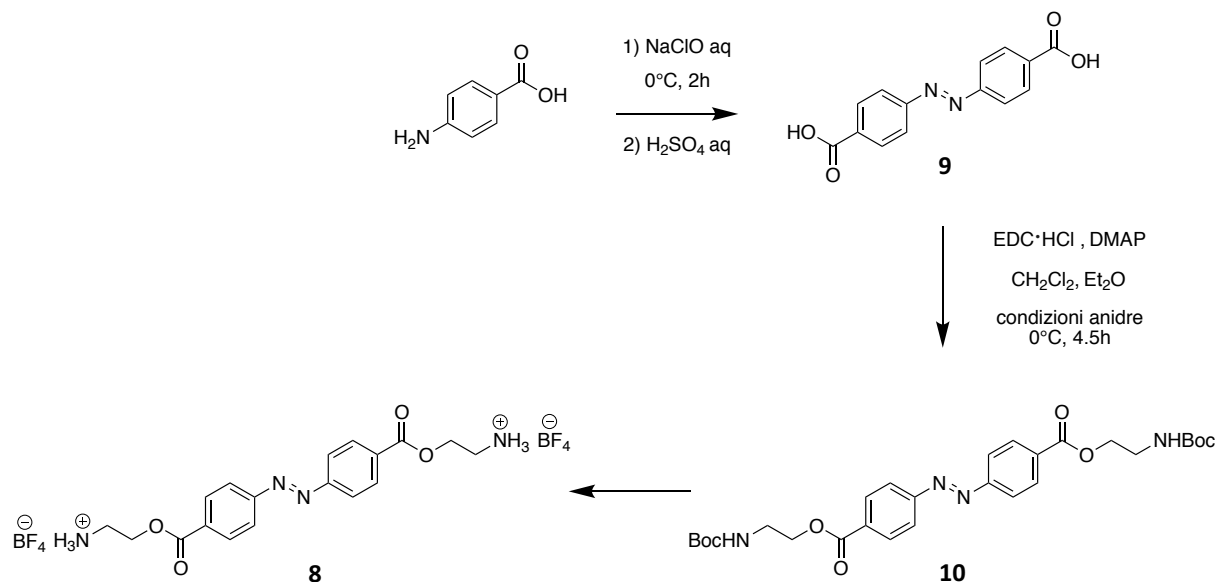


Figura 16: schema di sintesi del sale di diazonio **8** dall'acido *p*-amminobenzoico (precursore commerciale)

Nella sintesi corrispondente (Figura 16), il primo passaggio è stato scelto confrontando i metodi per la preparazione dell'azobenzene e dei suoi derivati. La nostra scelta è ricaduta sull'*coupling* ossidativo con ipoclorito di sodio che procede con un meccanismo via nitrene (Figura 17).

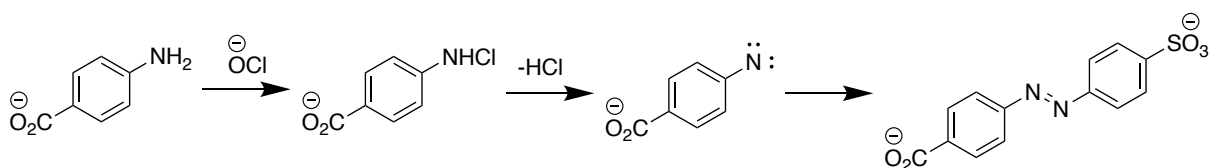


Figura 17: meccanismo di *coupling* ossidativo via nitrene

La procedura riportata in letteratura,²² originariamente utilizzata per ossidare l'acido solfanilico, è stata adattata al nostro reagente sfruttando l'analogia in termini di reattività ed effetti elettronici tra i due substrati. La differenza principale tra le due procedure consiste nella lavorazione del grezzo, che nel caso del diacido carbossilico (9) non precipita spontaneamente in soluzione acquosa nella forma dissociata. È stato quindi necessario riprotonare il sale sodico del prodotto prima di poterlo filtrare.

Dall'analisi ¹H-NMR del grezzo si osserva lo spostamento a campi bassi del sistema aromatico AA'XX' compatibile con la conversione del gruppo amminico (elettron-donatore) in azogruppo (elettron-attrattore). Dagli spettri del protone è inoltre possibile constatare che il diacido 9 è il prodotto di ossidazione principale nonostante nel grezzo siano presenti, oltre al reagente, diverse impurezze in quantità non trascurabili. Pertanto non è stato possibile calcolare una resa. A causa della limitata solubilità del prodotto grezzo ottenuto, si è deciso di utilizzarlo nel passaggio di sintesi seguente senza ulteriori purificazioni, con l'intento di applicare delle tecniche di separazione più efficaci sugli intermedi successivi.

La strategia adottata per realizzare il successivo passaggio di sintesi consiste nell'esterificazione difunzionale del diacido carbossilico 9 con N-Boc-etanolamina. L'introduzione di un gruppo di protezione, che aumenta di un passaggio la sintesi dell'inibitore, risulta indispensabile per impedire la formazione di ammidi, favorita nelle stesse condizioni di reazione.

Condizioni di esterificazione con N-Boc etanolamina	
EDC·HCl, DMAP	Et ₂ O, CH ₂ Cl ₂ 0°C, 4.5h
DCC, DMAP	Et ₂ O 25°C, 4.5h
SOCl ₂	DMF reflux, 5h

Tabella 3: agenti attivanti e condizioni di reazione sperimentati per l'esterificazione del diacido 9

La scarsa solubilità dell'intermedio **9** nella maggior parte dei solventi organici si è rivelata un aspetto problematico per la messa a punto di una procedura efficace. Le procedure utilizzate e le relative condizioni di reazione sono riassunte in Tabella 3. Tutti i metodi sperimentati si sono rivelati inefficaci. Il risultato migliore, ottenuto con l'agente attivante EDC·HCl, ha portato dopo la purificazione cromatografica del grezzo ad una resa del 4% di prodotto **10**. La quantità di materiale ottenuto ha comunque permesso la caratterizzazione completa di un precursore chiave con cinque tecniche di analisi ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, UV-VIS, massa ad alta risoluzione, punto di fusione), come mostrato nella parte sperimentale. Per una corretta assegnazione dei segnali nello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati inoltre eseguiti esperimenti bidimensionali (HSQC) di risonanza magnetica nucleare.

Sintesi dell'inibitore dall'acido p-nitro benzoico

A causa delle rese insoddisfacenti ottenute nel secondo passaggio, questa rotta sintetica si è rivelata impraticabile e si è reso necessario un cambio di strategia. Il nuovo schema retrosintetico sviluppato è stato ridisegnato sulla base di tre principi: il passaggio di esterificazione, alla luce delle difficoltà emerse nella fase iniziale del progetto, è stato anticipato nello schema di sintesi, consentendo di sperimentare diverse procedure su un substrato commerciale semplice e disponibile. Il secondo principio adottato consiste nell'esclusione dallo schema retrosintetico di reazioni di difunzionalizzazione che potrebbero aver avuto un ruolo nell'insuccesso della prima strategia. Infine invertendo lo schema di sintesi è possibile sfruttare l'esterificazione per ottenere dal primo passaggio intermedi meno polari rispetto al diacido **9**, che mostrino una maggiore affinità per le fasi organiche.

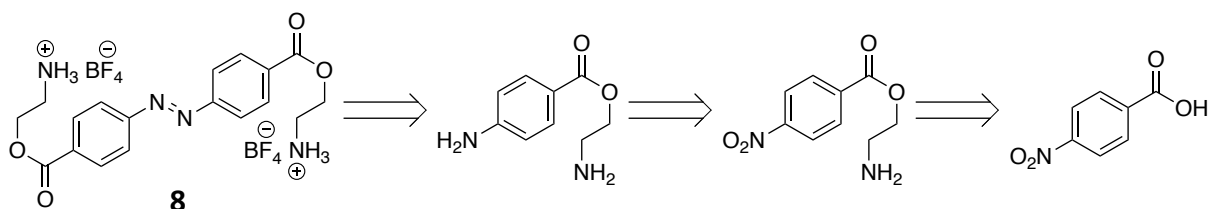


Figura 18: schema retrosintetico del sale di diammonio **8** dall'acido p-nitro benzoico (precursore commerciale)

Il nuovo approccio retrosintetico, raffigurato in Figura 18, prevede inizialmente la disconnessione dell'azogruppo, seguita da un'interconversione funzionale dell'anilina corrispondente. Il p-nitro estere ottenuto è stato nuovamente scomposto attraverso la disconnessione del legame estereo, portando all'acido p-nitro benzoico come precursore commerciale.

Prima di intraprendere la nuova sintesi sono state eseguite alcune prove preliminari per verificare la validità della nuova rotta sintetica. Nello specifico, le condizioni

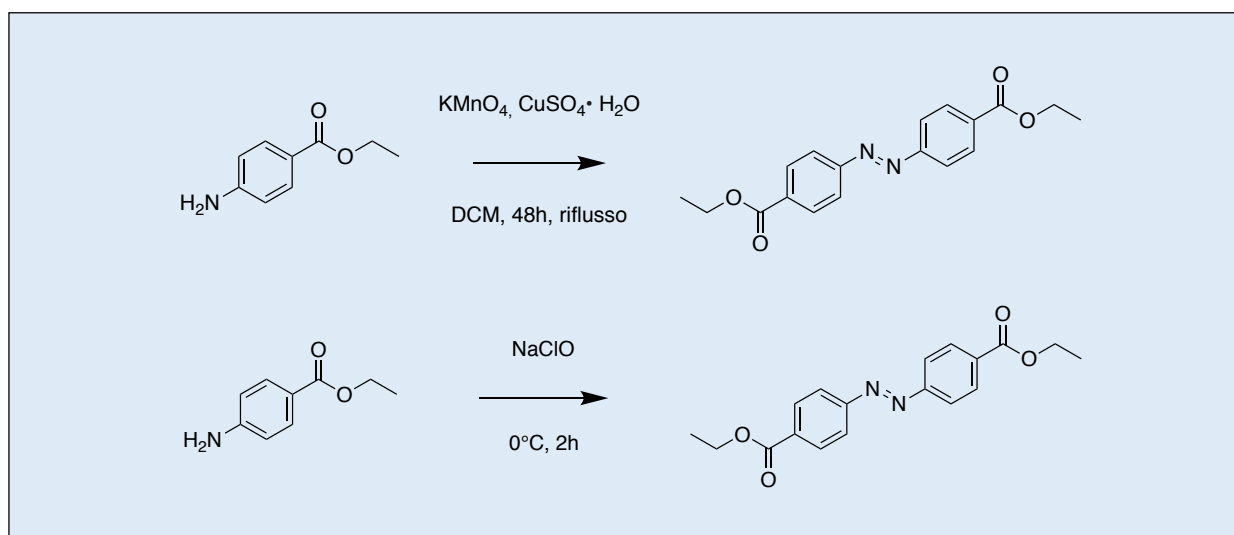


Figura19: metodi utilizzati per il coupling ossidativo del p-ammino benzoato di etile, estere modello utilizzato per testare la solidità del nuovo schema retrosintetico.

precedentemente utilizzate per il *coupling* ossidativo potrebbero rivelarsi troppo drastiche in presenza della funzione esterea poiché l'ipoclorito di sodio, l'agente ossidante utilizzato, è anche una base che in ambiente acquoso potrebbe catalizzare l'idrolisi del reagente. Sono state sperimentate quindi due procedure per la sintesi

dell'azogruppo, utilizzando il *p*-ammino benzoato di etile come composto modello (Figura 19). In base ad un'analisi qualitativa degli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei prodotti grezzi ottenuti, la nuova strategia di sintesi è stata giudicata consistente poiché, con entrambi i metodi utilizzati, la diazina derivante dal *coupling* ossidativo è il prodotto principale di ossidazione. Negli spettri del protone il sistema aromatico AA'XX' del *p*-ammino benzoato di etile, sotto l'effetto deschermante introdotto dall'azogruppo, è spostato a campi bassi. In misura minore lo stesso comportamento del chemical shift è stato osservato sul sistema di spin A_2X_3 .

Verificati i presupposti per la nuova sintesi, il primo passaggio consiste nell'esterificazione dell'acido *p*-nitro benzoico con N-Boc-etanolamina (Figura 20). Anche in questo caso i risultati migliori sono stati ottenuti attivando l'acido carbossilico con EDC·HCl in presenza di una quantità catalitica di DMAP. Questo metodo, una volta ottimizzato, ha consentito di raggiungere una resa del 75%. Inoltre la procedura messa a punto per la lavorazione del grezzo, che prevede diversi lavaggi in soluzione acquosa, consente di ottenere il prodotto (**11**) senza necessità di ulteriori tecniche di purificazione. Attraverso la spettroscopia NMR è possibile verificare la formazione dell'estere osservando lo spostamento dei segnali relativi ai protoni metilenici dell'N-Boc-etanolamina a campi bassi a causa dell'effetto deschermante del carbonile estereo.

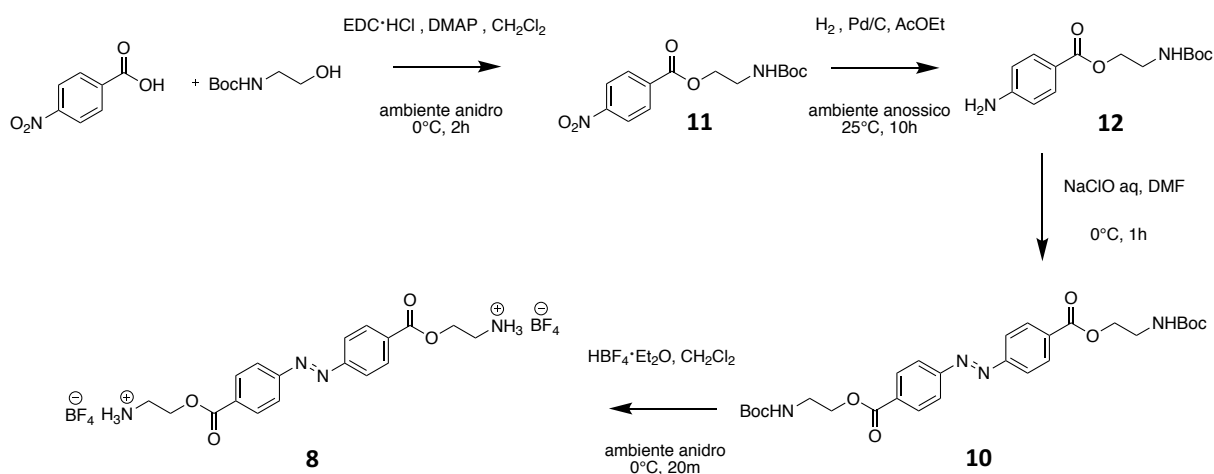


Figura 20: Sintesi del sale di diammonio **8** dall'acido *p*-nitro benzoico (precursore commerciale)

Il passo successivo consiste in un'idrogenazione catalitica finalizzata alla riduzione del nitrogruppo sull'anello aromatico. Il metodo adottato è stato scelto confrontando le condizioni sperimentali riportate in letteratura per substrati affini e consiste nell'impiego di un catalizzatore eterogeneo di Pd su carbone attivo (10% Pd). Poiché è stata osservata in metanolo la formazione del prodotto di transesterificazione, la procedura iniziale è stata riadattata sostituendo il solvente con l'acetato di etile. La reazione ottimizzata raggiunge una resa del 93% e il prodotto ottenuto è sufficientemente puro da poter essere utilizzato nel successivo passaggio di sintesi. Confrontando gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di prodotto (**12**) e reagente **11**, i segnali più diagnostici interessano sicuramente la regione aromatica, dove in seguito alla riduzione del nitrogruppo il sistema del secondo ordine AA'XX' appare notevolmente schermato. L'effetto di donazione elettronica dell'ammina aromatica è trasmesso persino ai tripletti metilenici che risultano entrambi spostati a chemical shift leggermente inferiori. A causa della sensibilità degli effetti elettronici dell'anilina all'acidità residua in CDCl_3 , l'interpretazione della risonanza magnetica del protone è stata notevolmente semplificata dopo aver filtrato il solvente deuterato su allumina basica.

La terza reazione nella sintesi dell'inibitore consente l'introduzione dell'azogruppo attraverso il coupling ossidativo dell'ammina aromatica. L'intermedio **12** è stato ossidato applicando entrambe le procedure sperimentate durante i test preliminari: il NaClO si è dimostrato un ossidante più rapido ed efficace rispetto alla miscela di KMnO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Tuttavia, a causa della scarsa solubilità di **12** nella soluzione acquosa di ipoclorito, il protocollo è stato modificato utilizzando la DMF come cosolvente per permettere la completa solubilizzazione del reagente. Successivamente le condizioni di reazione sono state ottimizzate, osservando come tempo e rapporto stechiometrico di ossidante influenzino la formazione di **10**. I dati raccolti, analizzando gli integrali negli spettri del grezzo, indicano che non è possibile incrementare la conversione del reagente oltre il 60% senza favorire la formazione di prodotti

secondari. L'identificazione del prodotto **10**, isolato mediante separazione cromatografica, è stata facilitata dalla precedente caratterizzazione di questo intermedio durante la prima sintesi. Anche in questo caso confrontando lo spettro $^1\text{H-NMR}$ di reagente e prodotto è possibile constatare l'effetto deschermante dovuto alla formazione dell'azogruppo che si riflette sul sistema aromatico e in misura minore sui protoni metilenici.

L'ultimo step di sintesi prevede la rimozione dei gruppi di protezione ter-butossicarbonilici. Generalmente questo passaggio è realizzato trattando i carbammati con un'aggiunta di acido forte in grado di favorire l'eliminazione del un carbocatione t-butilico seguita dalla liberazione di CO_2 .²³ La diammina prodotta verrà infine neutralizzata per dare il sale di diammonio corrispondente.

L'aspetto più problematico di questo passaggio di sintesi consiste nel trovare delle condizioni per la deprotezione di **10** in cui l'aggiunta di acido non catalizzi l'idrolisi dei gruppi esterei. Inoltre, dai primi risultati ottenuti è stato evidenziato come la purificazione del prodotto, il sale di diammonio **8**, non sia un problema banale nonostante la sua solubilità inferiore nei solventi organici rispetto al reagente.

Un'aggiunta di un eccesso di $\text{HBF}_4 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in ambiente anidro si è dimostrata il metodo più conveniente poiché consente una rimozione quantitativa dei carbammati e la formazione diretta del sale **8** senza necessità di isolare la diammina corrispondente. Attraverso la risonanza magnetica nucleare è stato possibile accertare la completa scomparsa dei segnali relativi al ter-butossicarbonile. Inoltre, in seguito alla ricristallizzazione del grezzo da una soluzione di CH_3CN per diffusione di Et_2O , è possibile ottenere un prodotto sufficientemente puro per poter essere utilizzato negli esperimenti di inibizione fotocontrollata. Il sale di diammonio **8** è stato quindi caratterizzato con cinque tecniche di analisi ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, UV-VIS, massa ad alta risoluzione, punto di fusione) come riportato nella sezione sperimentale.

Studi preliminari sulle proprietà dell'interruttore molecolare

Una volta sintetizzato il target della sintesi, sono stati condotti una serie di esperimenti per valutarne le proprietà come interruttore molecolare. Il primo passo consiste nel verificare la possibilità di isomerizzare la diazina **8** attraverso la foto-stimolazione. È possibile seguire il processo di conversione (E → Z) grazie alle bande UV-VIS caratteristiche di ciascun isomero. Per foto-stimolare la diazina, il fluorimetro rappresenta lo strumento più adatto disponendo di una sorgente sufficientemente intensa ed accordabile.

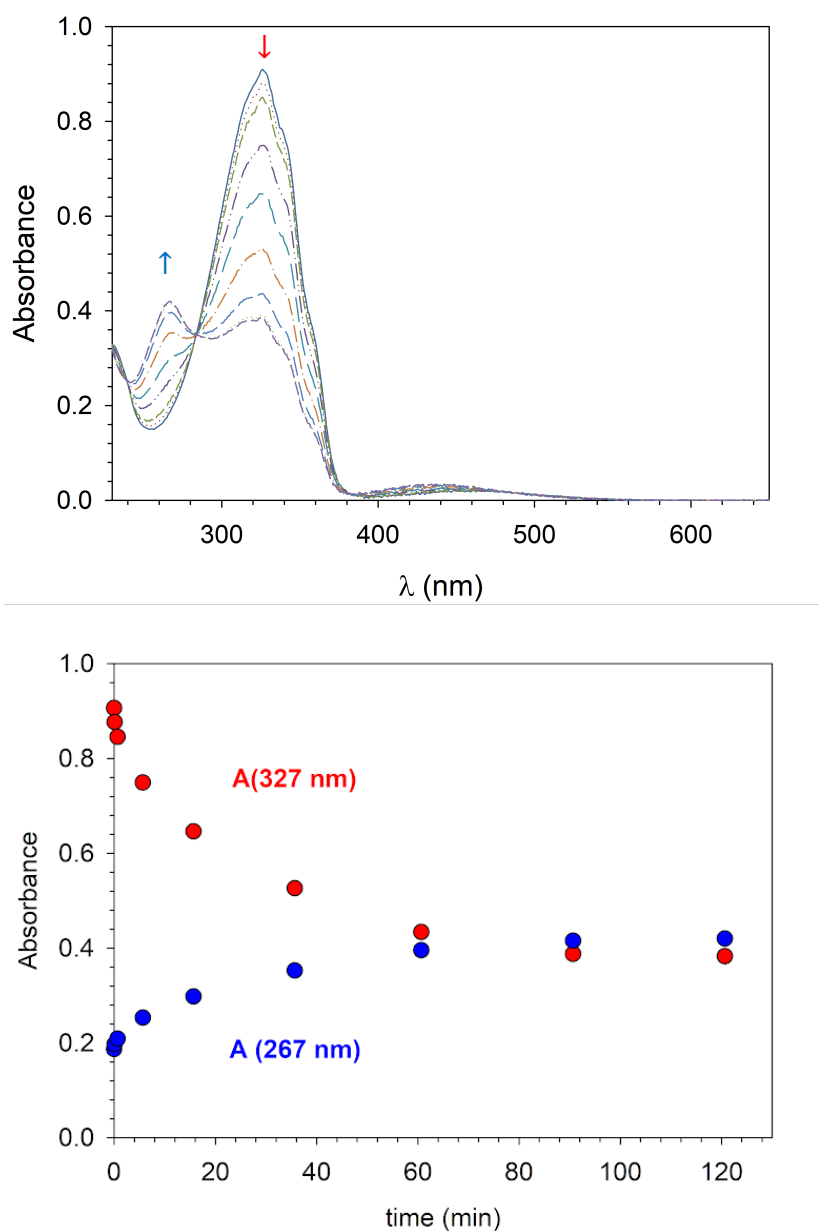


Figura 21: Spettri di assorbimento elettronico di una soluzione 0.03 mM di **8** in CH₃CN al variare del tempo di fotostimolazione. Il campione è stato irradiato ($\lambda_{ecc} = 327$ nm) in una cella di quarzo termostatando il sistema a 25°C

Avendo già a disposizione lo spettro UV-VIS, ottenuto durante la caratterizzazione di **8**, si conosce la lunghezza d'onda di massimo assorbimento dell'isomero E (forma più stabile a T_{amb}). Un campione è stato quindi irradiato ($\lambda_{ecc} = 327 \text{ nm}$) in CH_3CN a 25°C . Le variazioni nello spettro sono state monitorate a tempi di esposizione sempre crescenti come riportato in Figura 21.

È stata effettivamente riscontrata la decrescita nel tempo delle due bande di assorbimento caratteristiche dell'isomero E (rispettivamente a $\lambda_{max} = 327 \text{ nm}$ e $\lambda = 457 \text{ nm}$) in concomitanza della comparsa di due nuovi segnali ($\lambda_{max} = 267 \text{ nm}$ e $\lambda = 434 \text{ nm}$) compatibili con un incremento di concentrazione dell'isomero Z. Dopo aver irradiato il campione per un tempo complessivo di due ore, la convergenza delle bande di assorbimento verso uno spettro-limite ha confermato il raggiungimento dello Stato Foto Stazionario (SFS).

I dati raccolti possono essere interpretati alla luce di alcune considerazioni. I cambiamenti osservati nello spettro UV-VIS sono in accordo con le informazioni presenti in letteratura, secondo le quali per ciascun isomero sono attese due bande di assorbimento relative alle transizioni elettroniche $\pi\pi^*$ e $n\pi^*$. Confrontando lo spettro all'equilibrio termico con quello allo SFS, è ragionevole ipotizzare che le bande di massimo assorbimento dei due isomeri ($\lambda_{max}^E = 327 \text{ nm}$; $\lambda_{max}^Z = 267$) siano parzialmente sovrapposte. In queste condizioni, il contributo di diverse specie all'assorbimento non consente la determinazione delle concentrazioni allo Stato Foto-Stazionario.

I risultati ottenuti hanno comunque consentito di verificare la capacità della diazina di isomerizzare in risposta ad uno stimolo luminoso. Inoltre, la presenza di punti isosbistici ($\lambda = 239 \text{ nm}$; 284 nm ; 380 nm) esclude la formazione di specie terze, confermando che la foto-stimolazione non innesca meccanismi fotochimici parassitari.

A questo punto per studiare il rilassamento termico è stata analizzata l'evoluzione nel tempo delle bande elettroniche. Interrompendo la foto-stimolazione è infatti possibile osservare il ritorno dell'assorbanza verso i valori iniziali come mostrato in Figura 22.

Un aspetto importante emerso durante questa indagine preliminare consiste nel riscontrare che dopo 13 ore di oscurità, il sistema non è tornato completamente all'equilibrio. Nonostante non sia stato calcolato il tempo di dimezzamento, appare evidente che la cinetica di questo processo del primo ordine non sia caratterizzata da una costante di velocità elevata.

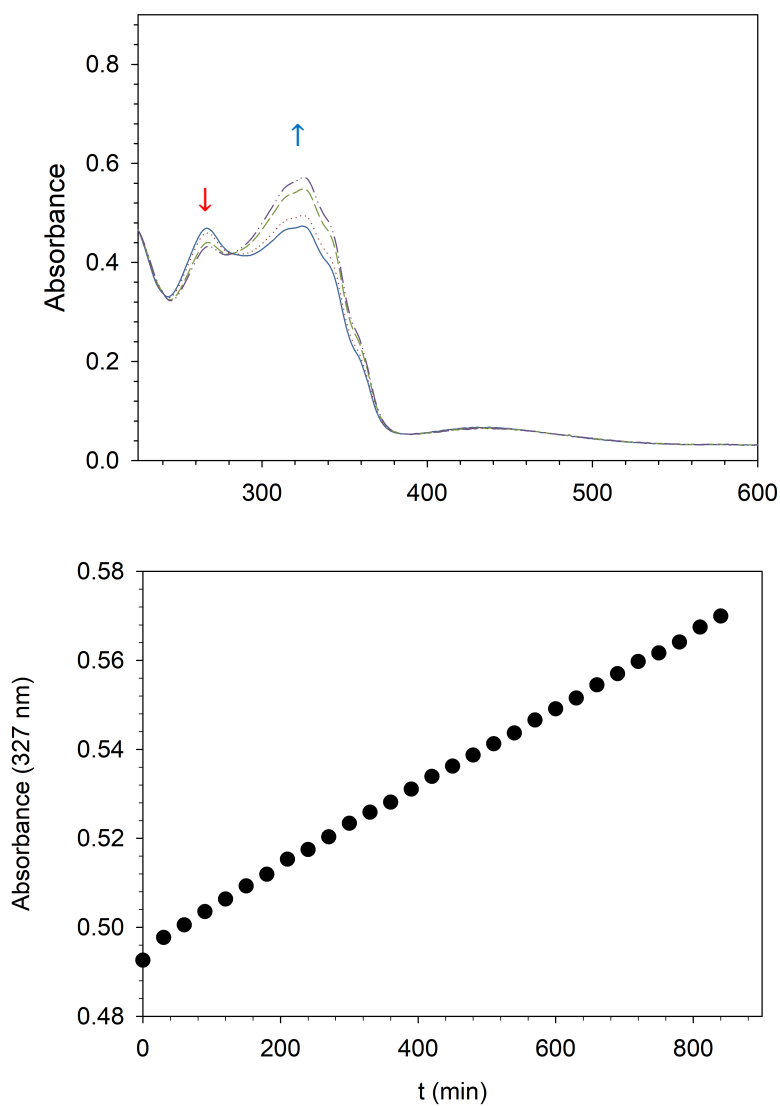


Figura 22: rilassamento termico in assenza di foto-stimolazione osservato con spettroscopia UV-VIS (in alto). Incremento dell'assorbanza nel tempo a 327 nm (in basso).

La stabilità termica mostrata dall'isomero Z è una caratteristica fondamentale per la compatibilità dell'interruttore molecolare con gli esperimenti di inibizione foto-controllata.

Per raccogliere nuove informazioni sull'efficienza del processo è stato ideato un nuovo esperimento: una soluzione satura di **8** in CD₃CN, precedentemente analizzata con spettroscopia ¹H-NMR, è stata irradiata in una cuvetta di quarzo ($\lambda_{ecc} = 327$ nm) mantenendo la soluzione sotto agitazione magnetica per sei ore consecutive. Confrontando gli spettri prima e dopo la foto-stimolazione è possibile constatare la comparsa di due nuovi sistemi di spin AA'XX' e A₂X₂, deschermati rispetto ai segnali "gemelli" dell'isomero E (Figura 23). Normalizzando la somma degli integrali è stato stimato che il rapporto molare [Z]/[E] raggiunto è pari a 0.25, corrispondente ad una conversione del 20%.

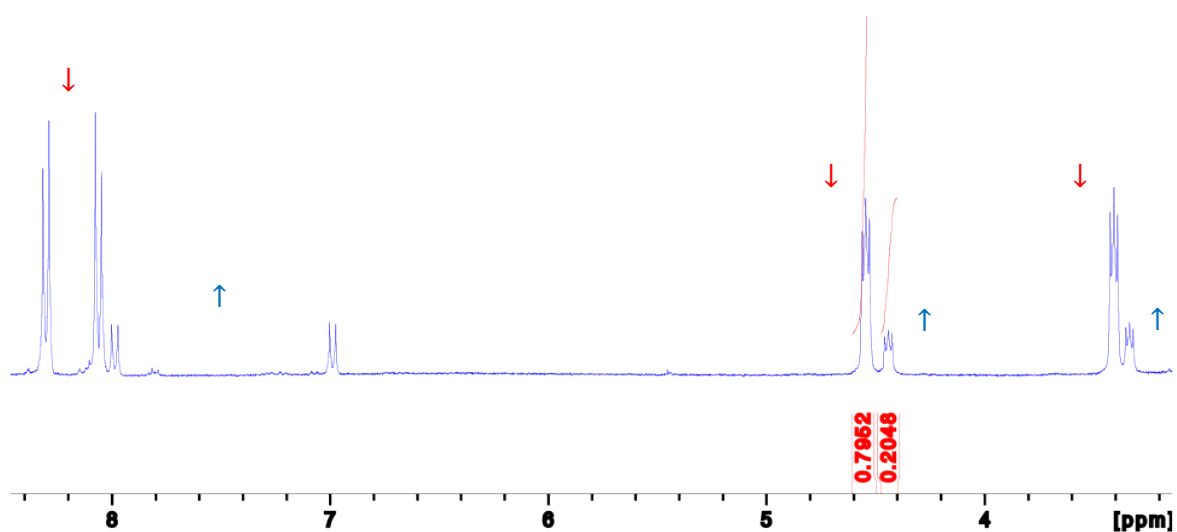


Figura 23: Spettro ¹H-NMR di una soluzione di **8** in CD₃CN precedentemente fotostimolata ($\lambda_{ecc} = 327$ nm) in una cuvetta di quarzo mantenendo il campione sotto agitazione magnetica per 6h in un sistema termostato a 25°C.

Il processo inverso di isomerizzazione foto-indotta (Z → E) è stato l'ultimo oggetto di indagine di questo studio. Per osservare tale fenomeno un terzo campione di diazina **8** è stato inizialmente irradiato ($\lambda_{ecc} = 360$ nm), fino al raggiungimento dello SFS, per poi riportare indietro il sistema irradiando nella frequenza di massimo assorbimento dell'isomero Z ($\lambda_{ecc} = 267$ nm). L'intero esperimento è stato seguito ancora una volta attraverso la spettroscopia UV-VIS (Figura 24).

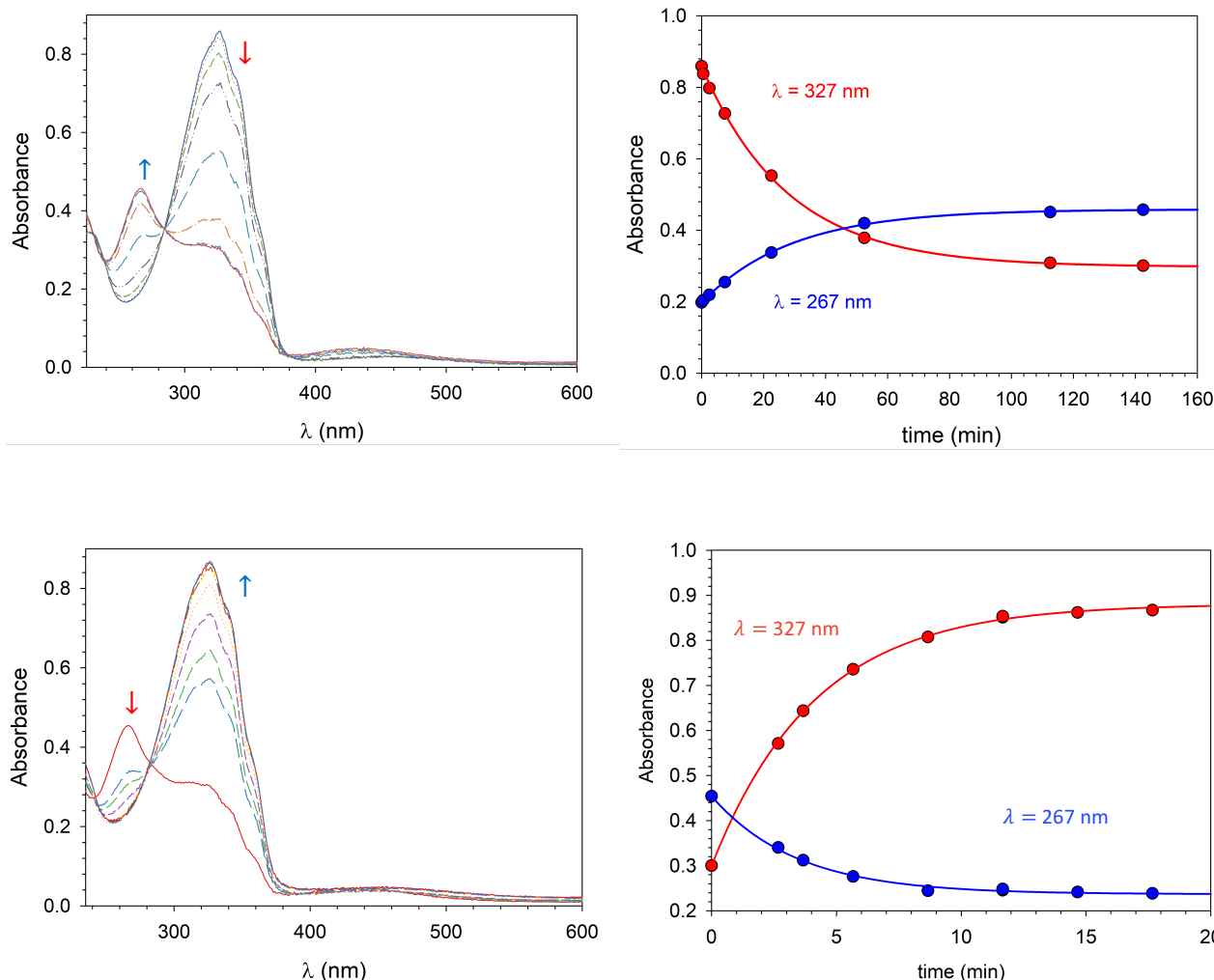


Figura 24: foto-stimolazione ($\lambda_{ecc} = 360 \text{ nm}$) di una soluzione 0.03 mM di **8** in CH_3CN : evoluzione degli spettri di assorbimento elettronico nel tempo fino al raggiungimento dello SFS (in alto a sinistra) e relativo andamento dell'assorbanza a 327 nm e 267 nm (in alto a destra); foto-stimolazione ($\lambda_{ecc} = 267 \text{ nm}$) dello stesso campione precedentemente portato allo SFS: evoluzione degli spettri di assorbimento nel tempo (in basso a sinistra) e relativo andamento dell'assorbanza a 327 nm e 267 nm (in basso a destra).

Per confrontare i due processi, in questa occasione sono state calcolate le costanti di velocità: assumendo che entrambi i fenomeni di isomerizzazione ($E \rightarrow Z$ e $Z \rightarrow E$) seguano una cinetica del primo ordine, l'andamento dell'assorbanza nel tempo può essere interpretato attraverso l'equazione I. dove i valori di A_0 e A_∞ rappresentano rispettivamente l'assorbanza a t_0 e allo stato foto stazionario.

$$\text{I.} \quad A(t) = A_0 \cdot e^{-kt} + A_\infty(1 - e^{-kt})$$

$$k_{E \rightarrow Z} = 0.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{Z \rightarrow E} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Dai valori delle costanti ottenute è possibile affermare che il processo inverso di foto-isomerizzazione risulta molto più rapido. Con il metodo descritto è possibile riportare lo spettro dallo SFS ai valori di assorbanza riscontrati all'equilibrio termico in appena 15 minuti.

In conclusione, nonostante la natura qualitativa delle indagini svolte, i dati raccolti consentono di stabilire che le tempistiche del rilassamento termico e dell'accensione dell'inibitore ($Z \rightarrow E$), sono compatibili con la cinetica delle ossidazioni **1**-catalizzate, mentre la velocità di raggiungimento dello SFS e i rapporti molari finora ottenuti durante la fase di spegnimento dell'inibitore ($E \rightarrow Z$) dovranno essere incrementati in vista dell'esperimento di inibizione foto-controllata.

Sviluppi futuri

La velocità del processo (equazione **II.**) di foto-isomerizzazione dipende dalla resa quantica (ϕ , adimensionale), dal flusso di fotoni che raggiungono il campione (I, s^{-1}) e dalla frazione di fotoni assorbiti dalla specie foto-stimolata (β , adimensionale).²⁴

$$\text{II.} \quad \frac{d[E]}{dt} \propto -\phi_E \cdot I \cdot \beta_E$$

Mentre il contributo del rilassamento termico è trascurabile in base a dati raccolti, poiché sospettiamo che anche l'isomero Z assorba nelle lunghezze d'onda finora utilizzate per foto-stimolare l'isomerizzazione ($E \rightarrow Z$), il processo inverso ($Z \rightarrow E$) potrebbe avere un peso rilevante sia nella velocità di raggiungimento dello SFS che nella scarsa percentuale di conversione ottenuta (equazioni **III.** e **IV.**).

$$\text{III.} \quad \frac{d[E]}{dt} = -\frac{\phi_E \cdot I \cdot \beta_E(t)}{N_A \cdot V} + \frac{\phi_Z \cdot I \cdot \beta_Z(t)}{N_A \cdot V} + k_{t,B \rightarrow A}[Z]$$

$$\text{IV.} \quad \frac{d[E]}{dt} \simeq -\frac{\phi_E \cdot I \cdot \beta_E(t)}{N_A \cdot V} + \frac{\phi_Z \cdot I \cdot \beta_Z(t)}{N_A \cdot V}$$

*volume (V) è espresso in dm³**

L'ottimizzazione delle condizioni di foto-stimolazione non rientra nello scopo di questa tesi. Tuttavia una soluzione che potrebbe essere adottata nei prossimi studi consiste nel selezionare una λ_{ecc} dove il coefficiente di estinzione molare dell'isomero Z assuma valori inferiori, permettendo di spostare la composizione allo SFS (equazione V.) e di raggiungerlo più rapidamente (equazioni VI. e IV.).

$$\text{V.} \quad \frac{\phi_E}{\phi_Z} = \frac{[Z] \cdot \varepsilon_Z}{[E] \cdot \varepsilon_E}$$

$$\text{VI.} \quad \beta_Z(t) = \frac{[Z]\varepsilon_Z}{[Z]\varepsilon_Z + [E]\varepsilon_E} \cdot (1 - 10^{-Abs(t)})$$

La velocità del processo potrebbe inoltre essere significativamente incrementata utilizzando una sorgente più intensa (luce LED, laser) per accrescere il flusso (I) (equazione IV.).

Conclusioni

In questo lavoro di tesi sperimentale è stato sintetizzato il sale di diammonio **8** con un grado di purezza sufficientemente elevata da poter essere utilizzato in esperimenti di inibizione foto-controllata del catalizzatore supramolecolare **1**. Il processo sviluppato consente di ottenere la molecola *target* dall'acido *p*-nitro benzoico attraverso quattro passaggi di sintesi, con una resa complessiva del 24% (Figura 25). Il composto finale ottenuto e gli intermedi di sintesi sono stati caratterizzati con diverse tecniche di analisi.

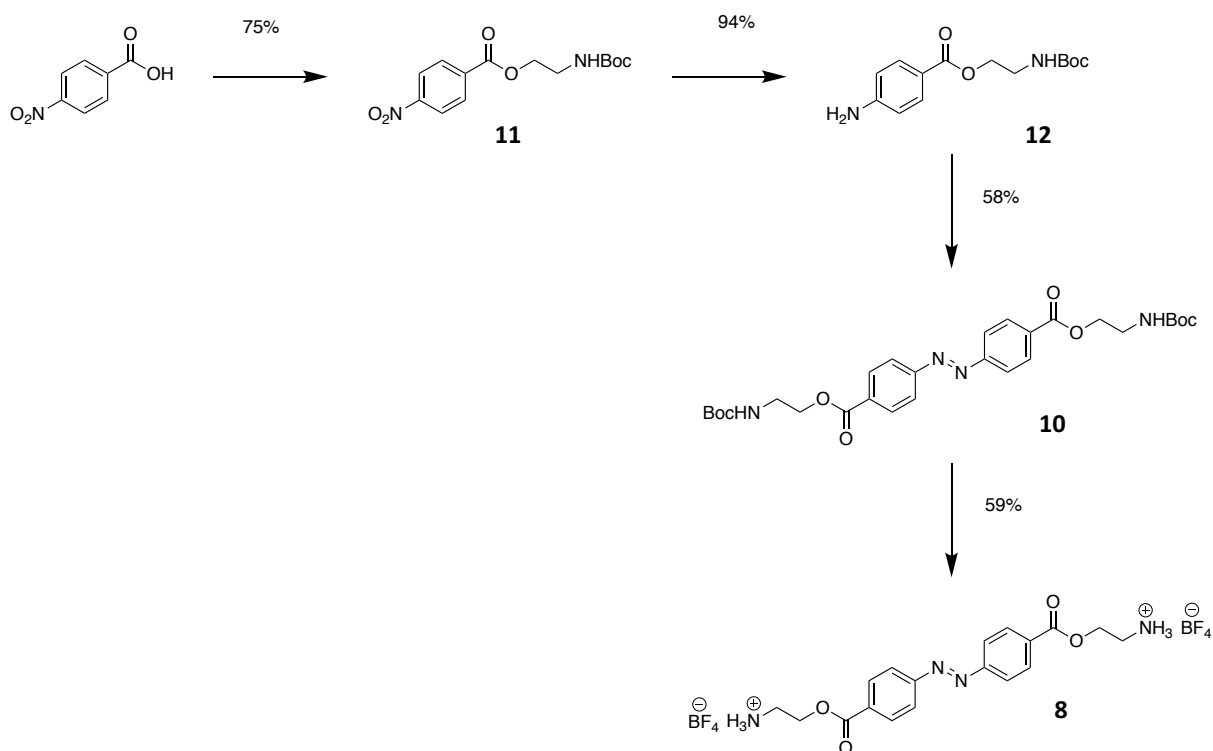


Figura 25: Sintesi dell'inibitore sotto forma di sale **8** con le rispettive rese calcolate per i singoli passaggi

Riguardo alla valutazione del composto sintetizzato come inibitore foto-modulabile e alla sua compatibilità con le condizioni sperimentali ipotizzate per gli esperimenti di catalisi, i risultati ottenuti sono incoraggianti: il composto **8** è un sale solubile in acetonitrile, si è dimostrato un interruttore molecolare la cui isomerizzazione può essere foto-stimolata reversibilmente. I test preliminari su composti-modello hanno

verificato la resistenza all'ossidazione dello spaziatore aromatico. Inoltre il rilassamento termico dell'isomero metastabile Z si è dimostrato sufficientemente lento da poterne considerare trascurabili gli effetti sulla variazione di concentrazione degli isomeri durante l'esperimento di inibizione foto-controllata.

Altri aspetti di questo studio hanno evidenziato alcune criticità del sistema. In particolare, durante gli esperimenti di foto-stimolazione ($E \rightarrow Z$), il raggiungimento dello SFS richiede tempi di irraggiamento prolungati e il rapporto molare raggiunto $[Z]/[E]$ potrebbe non essere sufficiente per mostrare effetti pronunciati sulla cinetica di ossidazione **1**-catalizzata. Alcune strategie, finalizzate all'ottimizzazione del processo di foto-stimolazione, sono state suggerite durante l'esposizione dei risultati. Tuttavia questi esperimenti si collocano in una fase del progetto che oltrepassa gli obiettivi prefissati di questa tesi, incentrata sulla sintesi e l'analisi preliminare delle caratteristiche del *photoswitch*.

Parte Sperimentale

Strumentazione

Gli spettri NMR sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro Bruker AC 300 (300 MHz). I *chemical shift* riportati (δ) sono espressi in *ppm* rispetto al valore della frequenza di risonanza del protone presente nel solvente deuterato utilizzato.

Gli spettri UV-VIS sono stati realizzati attraverso uno spettrofotometro a doppio raggio con cuvetta di quarzo, cammino ottico 1 cm.

La spettrometria di massa ad alta risoluzione è stata eseguita con uno spettrometro con sorgente ESI ed analizzatore a tempo di volo.

Le analisi GC-MS sono state eseguite con uno spettrometro di massa (sorgente EI 70eV) accoppiato ad un gascromatografo sul quale è installata una colonna capillare in silice fusa (30 m x 0.2 mm x 25 μ m) ricoperta di un film in fenilsilicone (5% fenilsilicone, OV5).

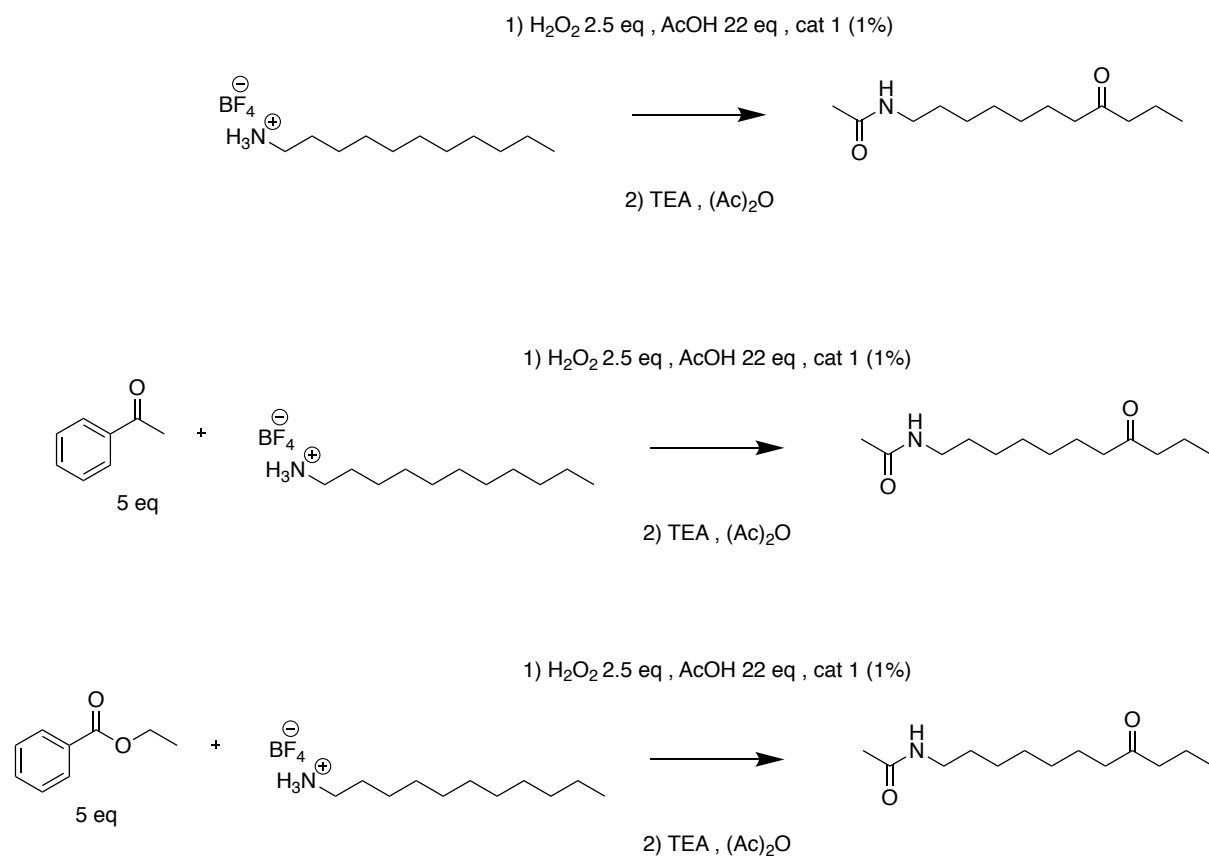
negli esperimenti di foto-isomerizzazione è stata utilizzato un fluorimetro Horiba fluoromax-4 con dotato di una lampada allo Xenon da 150 W

Le curve di *fitting* che hanno permesso l'estrapolazione delle costanti di velocità dalle cinetiche UV-VIS negli esperimenti di foto-isomerizzazione sono state realizzate con il programma SigmaPlot

Materiali

I solventi e i reagenti commerciali utilizzati non sono stati sottoposti ad ulteriori purificazione, a meno di diversa indicazione.

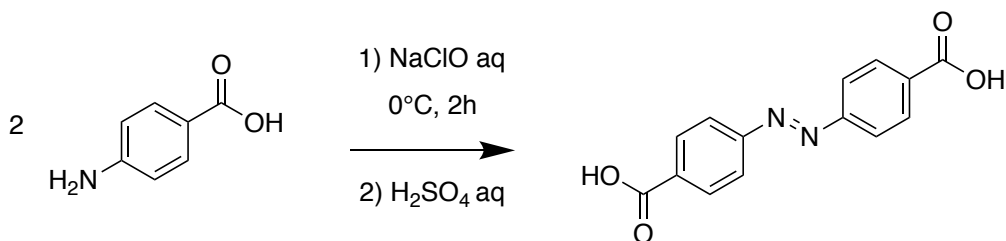
Prove di ossidazione sul ponte aromatico



In una vial da 4 mL sono stati pesati 0.010 g ($3.9 \cdot 10^{-5}$ mol) di ammina sciolti in 100 μ L di acetonitrile. Successivamente, dopo aver aggiunto quando previsto 78 μ L di una soluzione madre 0.5 M di inibitore, si introducono nella *vial* 49 μ L ($85.8 \cdot 10^{-5}$ mol) di acido acetico insieme con 0.263 g ($3.9 \cdot 10^{-6}$ mol) di catalizzatore **2** precedentemente disciolto in 100 μ L di acetonitrile. Mantenendo la soluzione a 0°C e sotto costante agitazione, dopo aver portato se necessario il volume della soluzione a 400 μ L, sono stati aggiunti 24 μ L di una soluzione madre 4 M di H₂O₂ nell'arco di 15 minuti. Terminata l'aggiunta, le ammine alifatiche sono state derivatizzate con un eccesso di TEA e anidride acetica. A questo punto sono stati introdotti 62 μ L di una soluzione madre 0.316 M di bifenile. Dopo aver mantenuto il contenuto della *vial* sotto agitazione per un'ora è stato aggiunto un eccesso di H₂O per spegnere la reazione e il prodotto è

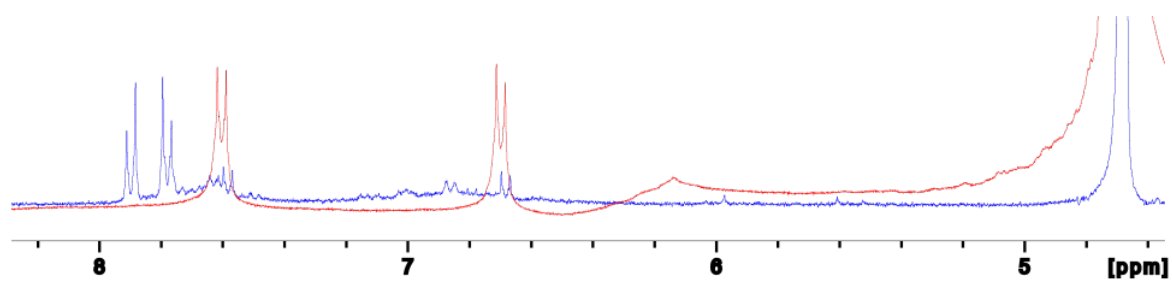
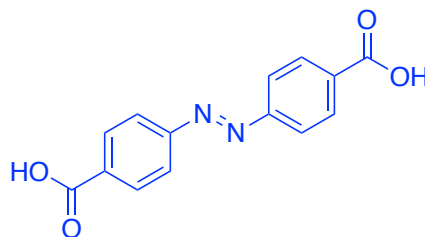
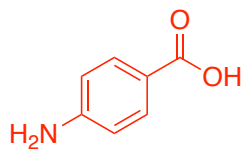
stato estratto in DCM. Le fasi organiche sono state lavate con una soluzione acquosa di H_2SO_4 2N ed una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 , quindi seccata con Na_2SO_4 , filtrata e diluita per l'analisi GC-MS.

Sintesi dell'(E)-4,4'-(diazene-1,2-diyl)dibenzoic acid (9)



In un pallone da 500mL munito di imbuto di gocciolamento 5 g (36.46 mmol) di acido p-ammino benzoico sono stati aggiunti a 65 mL di H₂O insieme con una quantità di Na₂CO₃ sufficiente da portare la soluzione a pH=9. Dopo la completa dissoluzione del reagente sono stati aggiunti nell'arco di due ore 85 mL di una soluzione acquosa di NaClO al 5% mantenendo la miscela sotto agitazione in un bagno a ghiaccio (T=0°C). La soluzione rosso-bruna ottenuta è stata neutralizzata con una soluzione acquosa di H₂SO₄ 2N fino alla completa precipitazione del prodotto. Il solido ottenuto è stato filtrato e lavato con acqua, una volta seccato sono stati raccolti 4.916 g di prodotto grezzo che si presenta come una polvere nera.

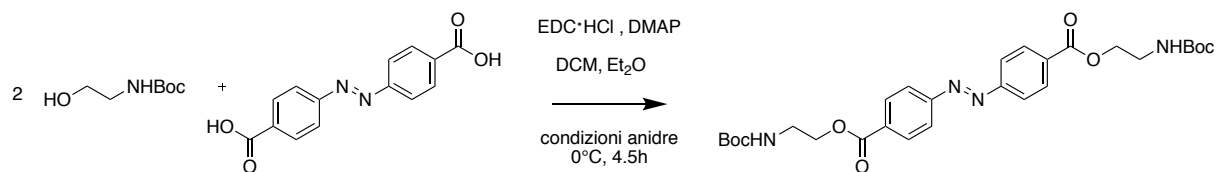
(E)-4,4'-(diazene-1,2-diyl)dibenzoic acid (9)



^1H NMR (300 MHz, D_2O con aggiunta Na_2CO_3)

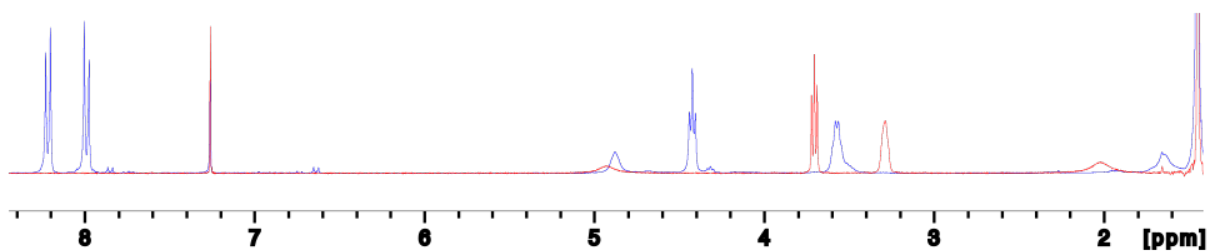
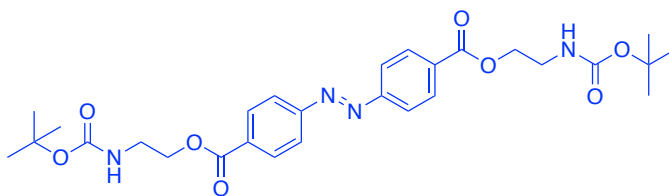
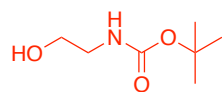
δ : 7.90 (d, $J=9$ Hz, 4H); 7.78 (d, $J=9$ Hz, 4H)

Sintesi del bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (**10**)



In un pallone a due colli da 50 mL precedentemente fiammeggiato 0.887g di EDC·HCl sono stati sciolti in 4 mL di DCM insieme con 0.746 g (4.63mmol) di N-Boc etanolamina e 0.028 g (0.23 mmol) di DMAP. Mantenendo la miscela sotto agitazione in un bagno a ghiaccio (T=0°C) sono stati aggiunti 0.500 g (1.85 mmol) di diacido **9** sciolti precedentemente in 8 mL di etere etilico. Tutte le aggiunte sono state realizzate in ambiente anidro. Dopo aver mantenuto la miscela di reazione sotto agitazione per 4.5h la sospensione ottenuta è stata filtrata. La fase organica raccolta è stata lavata con 15mL di NaHCO₃ soluzione acquosa al 5%, 15mL di HCl soluzione acquosa 0.5 M, 15mL di NaCl soluzione acquosa saturata ed infine stata seccata su Na₂SO₄ ed evaporata per ottenere 0.320 g di prodotto grezzo. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash su silice impiegando come eluente una miscela ternaria di esano/acetato di etile/etere etilico in rapporto 7:3:6 raccogliendo 43 mg (0.08 mmol) di prodotto **10** (resa 4%).

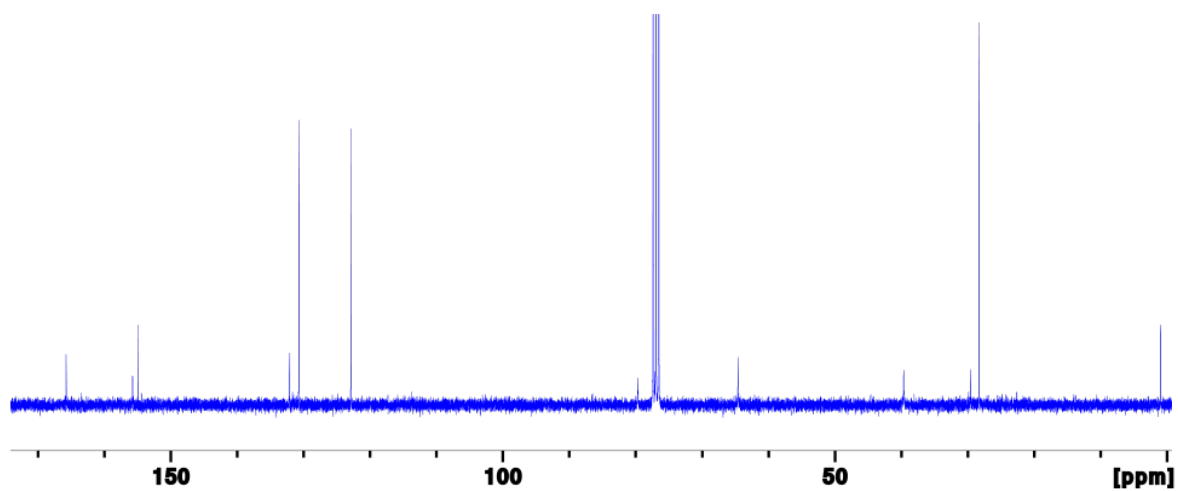
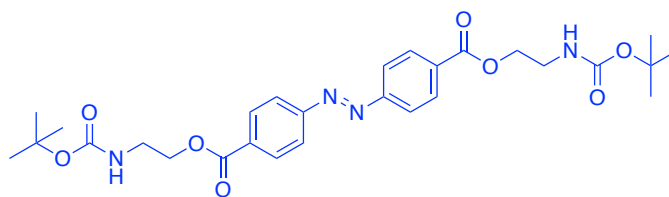
bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (10)



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ : 8.22 (d, J = 9 Hz, 4H); 7.99 (d, J = 9 Hz, 4H); 4.88 (s, 2H); 4.42 (t, J = 5 Hz, 4H) 3.57 (m, 4H); 1.45 (s, 18H)

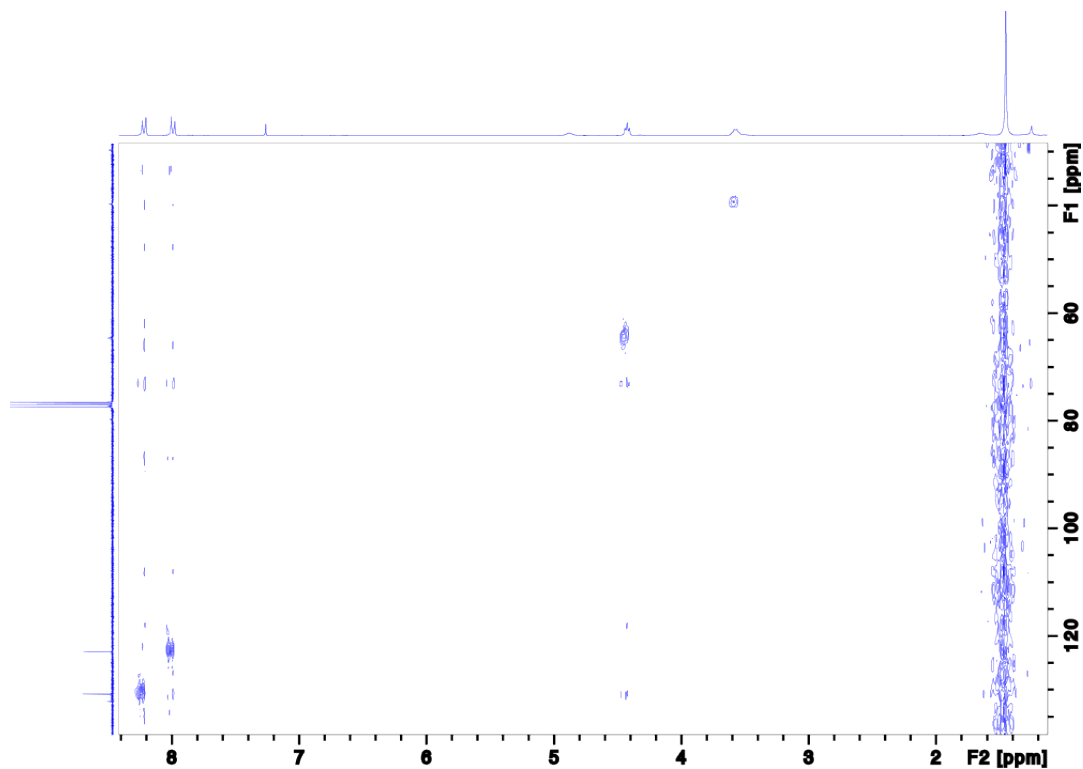
bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (10)



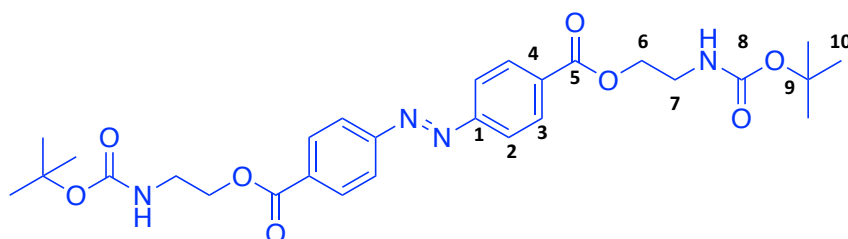
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)

δ : 165.7; 155.7; 154.8; 132.1; 130.7; 122.9; 79.6; 64.6; 39.6; 28.3

bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (10)



HSQC



δ :

165.7 - C5

122.9 - C3

155.7 - C8

79.6 - C9

154.8 - C4

64.6 - C6

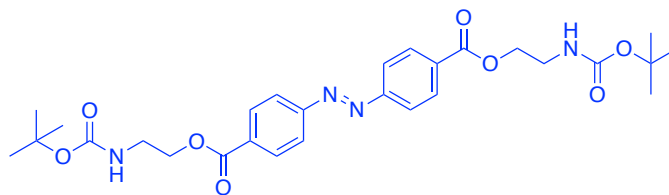
132.1 - C1

39.6 - C7

130.7 - C2

28.3 - C10

bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (10)



M.p.: 164.5 – 166.5 °C

UV-VIS (CH₂Cl₂):

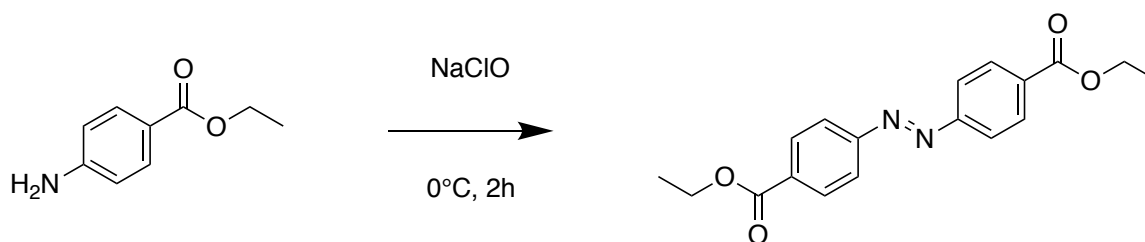
$\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 330 \text{ nm } (2.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$

$\lambda(\epsilon) = 457 \text{ nm } (1.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$

HRMS-ESI TOF (m/z): [M + Na⁺] calcolata per C₂₈H₃₆N₄O₈, 579.2431; trovata

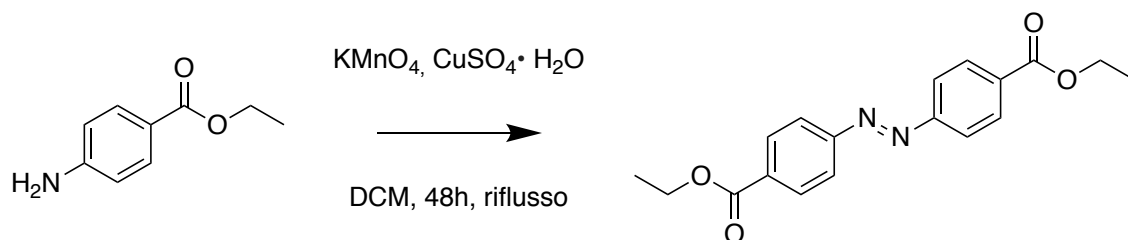
579.2403

Prove di coupling ossidativo sul *p*-ammino benzoato di etile



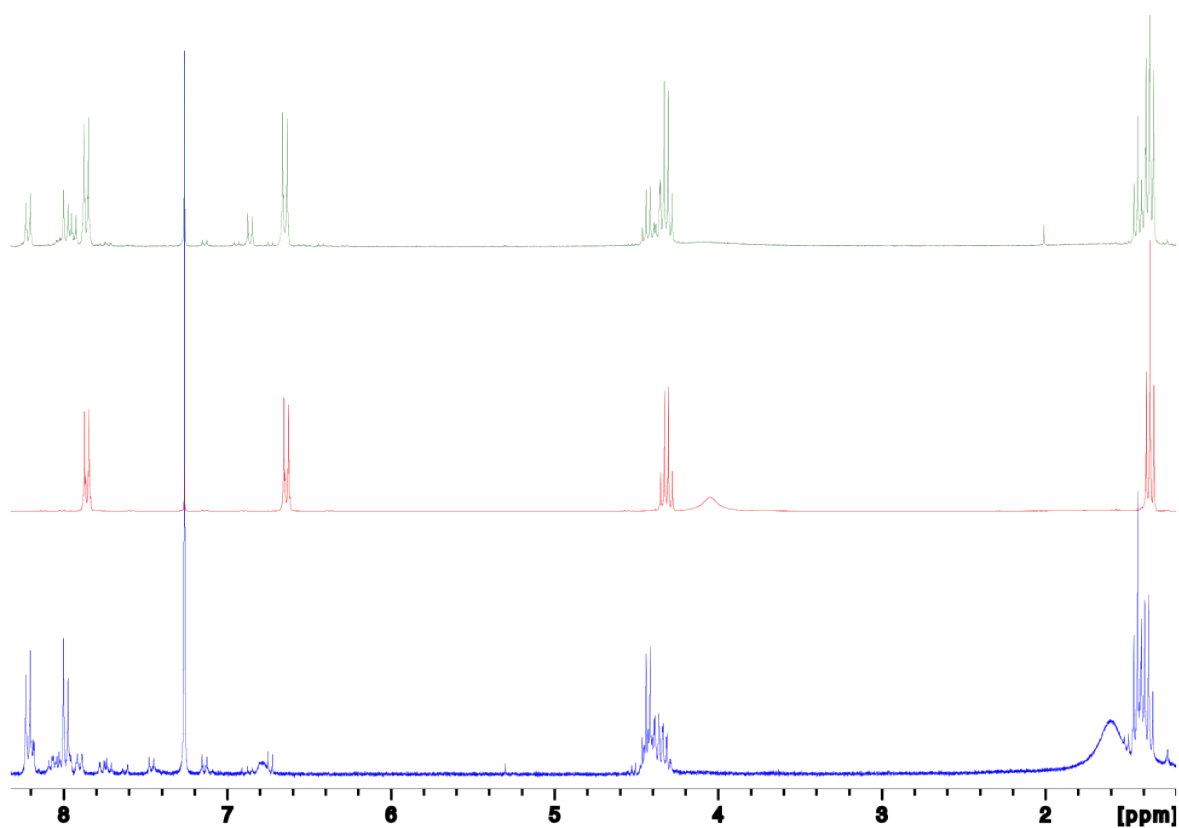
In un pallone da 50 mL munito di imbuto di gocciolamento 1 g (6.05 mmol) di *p*-ammino benzoato di etile è stato aggiunto a 10 mL di H₂O insieme con una quantità di Na₂CO₃ sufficiente da portare la soluzione a pH=9. Dopo la completa dissoluzione del reagente sono stati aggiunti nell'arco di due ore 15 mL di una soluzione acquosa di NaClO al 5% mantenendo la miscela sotto agitazione in un bagno a ghiaccio (T=0°C). Terminata l'aggiunta si ottiene una sospensione il cui precipitato è stato filtrato, lavato con acqua e seccato per dare la frazione (A). Le acque madri sono state successivamente estratte in DCM e dalla fase organica ottenuta, una volta seccata su Na₂SO₄ ed evaporata, è stata raccolta la frazione (B). Complessivamente, riunendo le due frazioni, sono stati ottenuti 0.865 g di prodotto grezzo.

Prove di coupling ossidativo sul *p*-ammino benzoato di etile



In un pallone da 25 mL sono stati introdotti 0.200 g (1.21 mmol) di *p*-ammino benzoato di etile, precedentemente sciolti in 10 mL di DCM. L'ossidante (1.200 g), un amalgama di ottenuta tritutando una pari quantità in grammi di KMnO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, è stato successivamente addizionato al reagente mantenendo la miscela eterogenea ottenuta sotto agitazione magnetica a riflusso ($T=40^\circ\text{C}$) per 48 ore. Dopo aver riportato la miscela di reazione a T_{amb} , la sospensione è stata filtrata su celite ed il solido residuo è stato lavato con 3X30 mL di DCM e 3X30 mL di Et_2O . La fase organica raccolta è stata essiccata ottenendo 0.165 g di grezzo.

Analisi comparativa degli spettri del grezzo, prove di coupling ossidativo



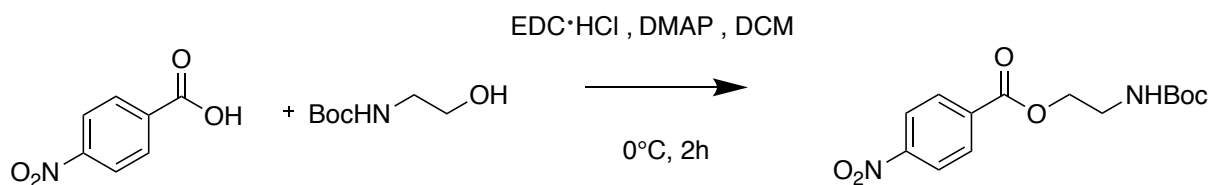
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

(A) Coupling ossidativo del *p*-ammino benzoato di etile con ipoclorito di sodio (in alto)

(B) Spettro del reagente (al centro)

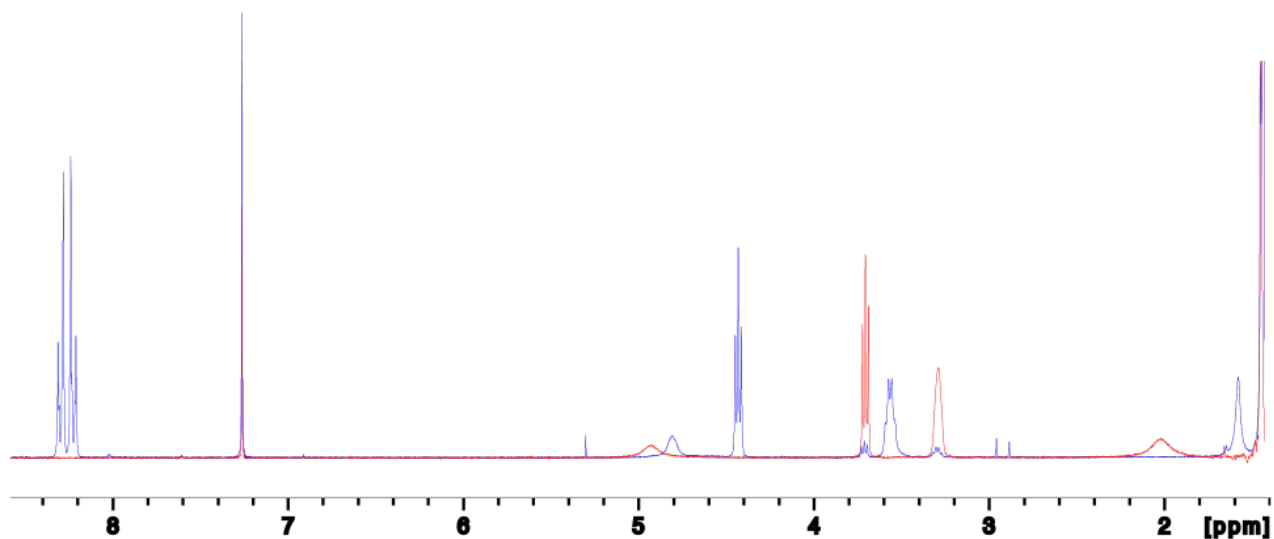
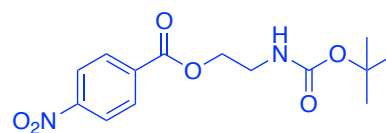
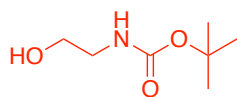
(C) Coupling ossidativo del *p*-ammino benzoato di etile con KMnO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
(in basso)

Sintesi del 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-nitrobenzoate (11)



In un pallone a tre colli da 50 mL precedentemente fiammeggiato sono stati introdotti 0.241 g (1.50 mmol) di N-boc etanolamina, 0.287 g (1.50 mmol) di EDC·HCl e 0.009 g (0.07) mmol di DMAP disciolti in 15 mL di DCM. Mantenendo la miscela sotto agitazione in un bagno a ghiaccio ($T=0^{\circ}\text{C}$) sono stati aggiunti 0.200 g (1.12 mmol) di acido p-nitro benzoico precedentemente disciolto in 2 mL di DMF. Tutte le aggiunte sono state eseguite in ambiente anidro. Trascorse 2 h la miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente ed il grezzo è stato lavato con 20mLX1 di NaHCO_3 soluzione acquosa al 5%, 20mLX1 di HCl soluzione acquosa 0.5 M, 20mL di NaCl soluzione acquosa satura ed infine stata seccata su Na_2SO_4 ed evaporata raccogliendo 0.260 g (0.84 mmol) di prodotto 11 (resa 75%).

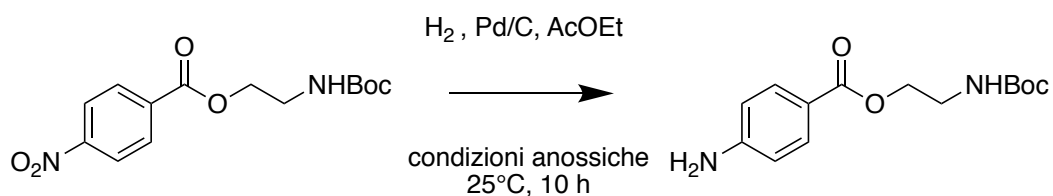
2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-nitrobenzoate (11)



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

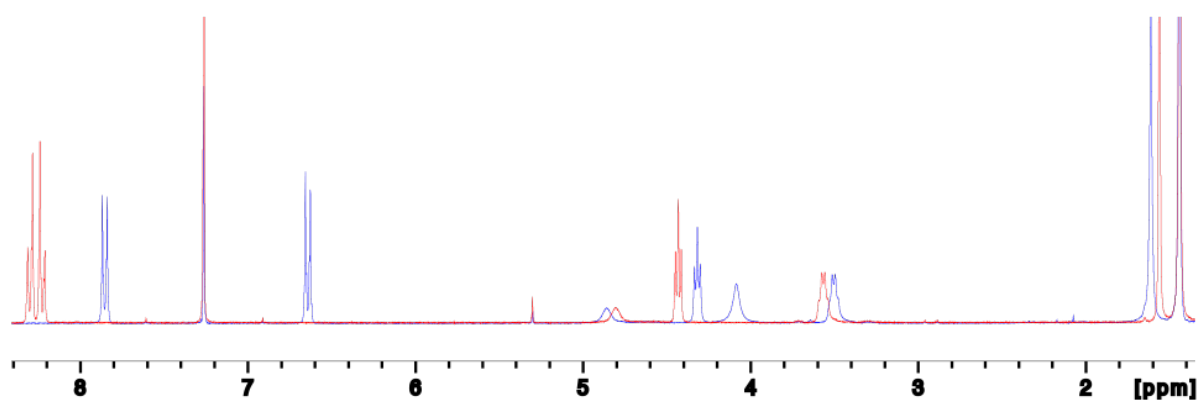
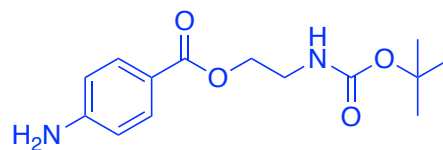
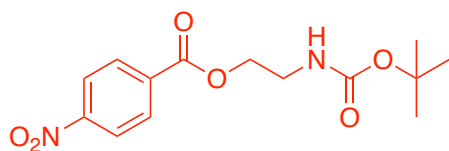
δ : 8.30 (d, J = 9 Hz, 2H); 8.22 (d, J = 9 Hz, 2H); 4.80 (s, 1H); 4.43 (t, J = 5 Hz, 2H) 3.57 (m, 2H); 1.44 (s, 9H)

Sintesi del 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-aminobenzoate (**12**)



In un pallone da 100mL precedentemente fiammeggiato sono stati introdotti 1.197 g (3.86 mmol) di **11** sciolti nella minima quantità di acetato di etile insieme con 0.120 g di catalizzatore Pd/Carbone 10% (p/p). Dopo aver degassato il solvente per sostituzione con gas inerte, l'idrogeno è stato insufflato nella miscela di reazione facendolo gorgogliare nel solvente fino a completa saturazione. La sospensione è stata mantenuta in agitazione sotto pressione di idrogeno a temperatura ambiente ($T=25^\circ\text{C}$) durante la notte. In seguito la sospensione è stata filtrata su cetile e dalla fase organica dopo essere stata evaporata sono stati ottenuti 1.022 g (3.65 mmol) di prodotto **12** (resa 94%).

2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-aminobenzoate (12)

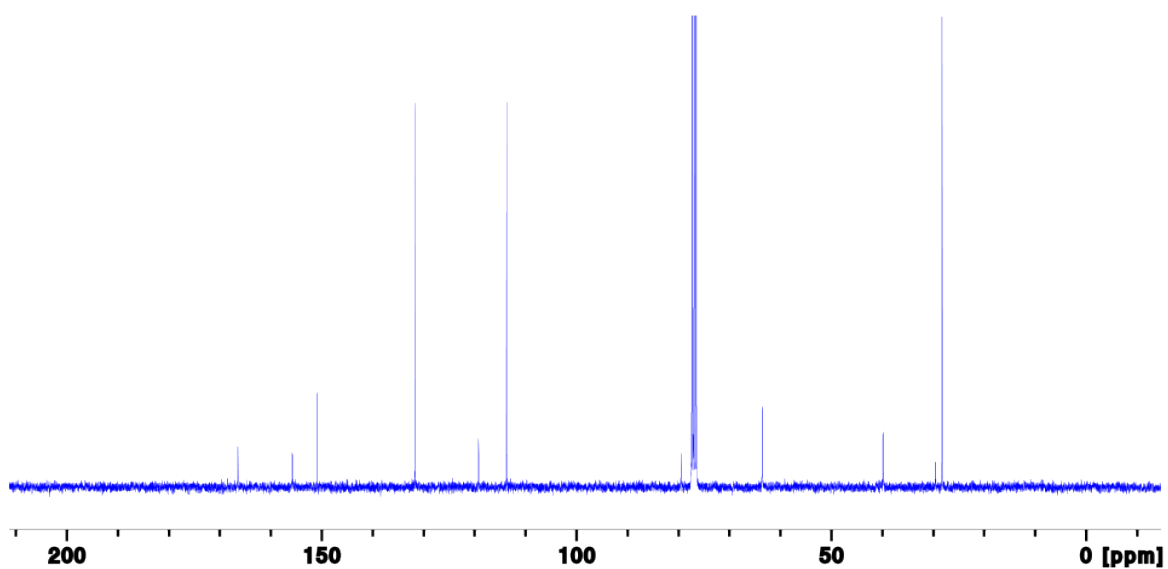
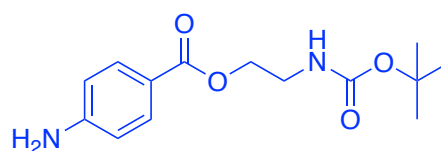


2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-aminobenzoate (12)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ : 7.85 (d, J = 9 Hz, 2H); 6.64 (d, J = 9 Hz, 2H); 4.85 (s, 1H); 4.32 (t, J = 5 Hz, 2H); 4.07 (s, 2H); 3.50 (m, 2H); 1.44 (s, 9H)

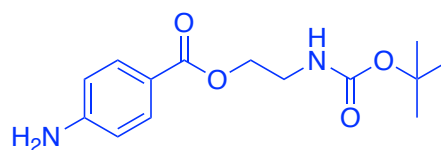
2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-aminobenzoate (12)



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3)

δ : 166.4; 155.7; 150.9; 131.6; 119.2; 113.7; 79.5; 63.6; 39.8; 28.3

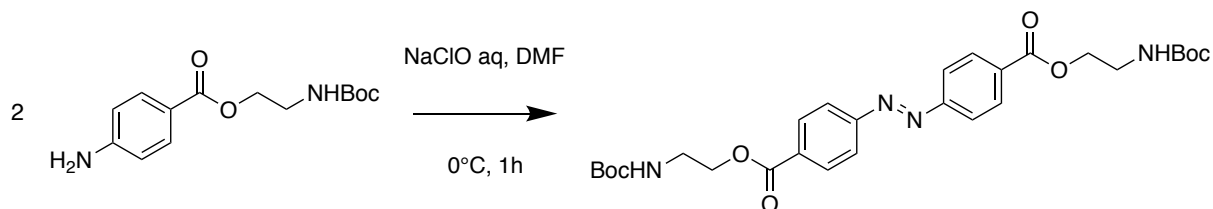
2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl 4-aminobenzoate (12)



M.p.: 135.3-137.1 °C

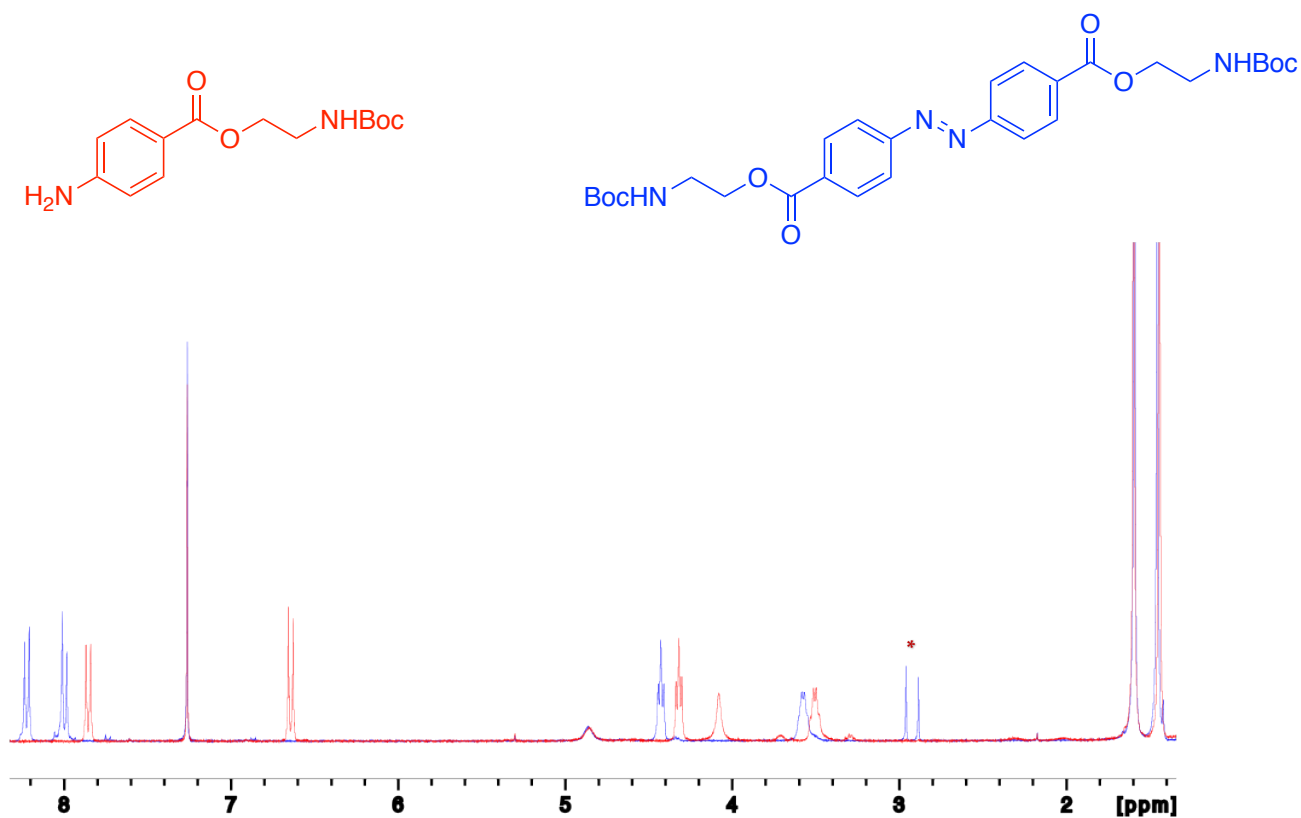
HRMS-ESI TOF (m/z): [M + Na⁺] calcolata per C₁₄H₂₀N₂O₄, 303.1321; trovata 303.1353

Sintesi del bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (**10**)



In un pallone da 25 mL provvisto di imbuto di gocciolamento sono stati introdotti 0.219 g (0.78 mmol) di **12** disciolti in 13 mL di DMF. Mantenendo la miscela di reazione sotto agitazione in un bagno a ghiaccio ($T=0^\circ\text{C}$) sono stati aggiunti nell'arco di un'ora 3.7 mL di una soluzione acquosa di NaClO al 5%. Successivamente alla miscela di reazione sono stati aggiunti 15 mL di NaCl soluzione acquosa satura ed il prodotto, in parte precipitato, è stato estratto in DCM. La fase organica raccolta è stata sottoposta a dei lavaggi con 15 mL di NaCl soluzione acquosa satura e con 15 mL di acqua per eliminare la DMF residua. In seguito la fase organica è stata seccata su Na_2SO_4 ed evaporata raccogliendo 0.211 g di prodotto grezzo. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash su silice impiegando come eluente una miscela di esano/acetato di etile in rapporto 7:3 raccogliendo 0.125g (0.22 mol) di prodotto **10** (resa 58%).

bis(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl) 4,4'-(diazene-1,2-diyl)(*E*)-dibenzoate (10)*



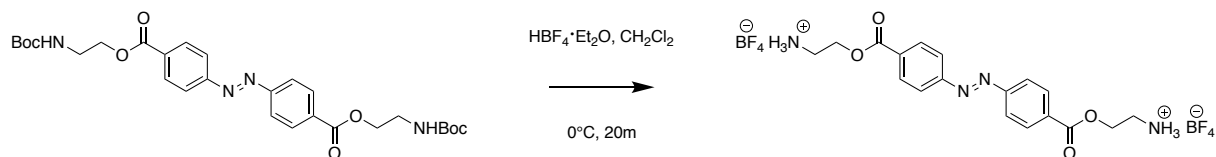
¹HNMR (300 MHz, CDCl₃)

δ: 8.22 (d, J= 9 Hz, 4H); 7.99 (d, J= 9 Hz, 4H); 4.88 (s, 2H); 4.42 (t, J= 5 Hz, 4H) 3.57 (m, 4H); 1.45 (s, 18H)

* Per la caratterizzazione completa vedi pag. 43

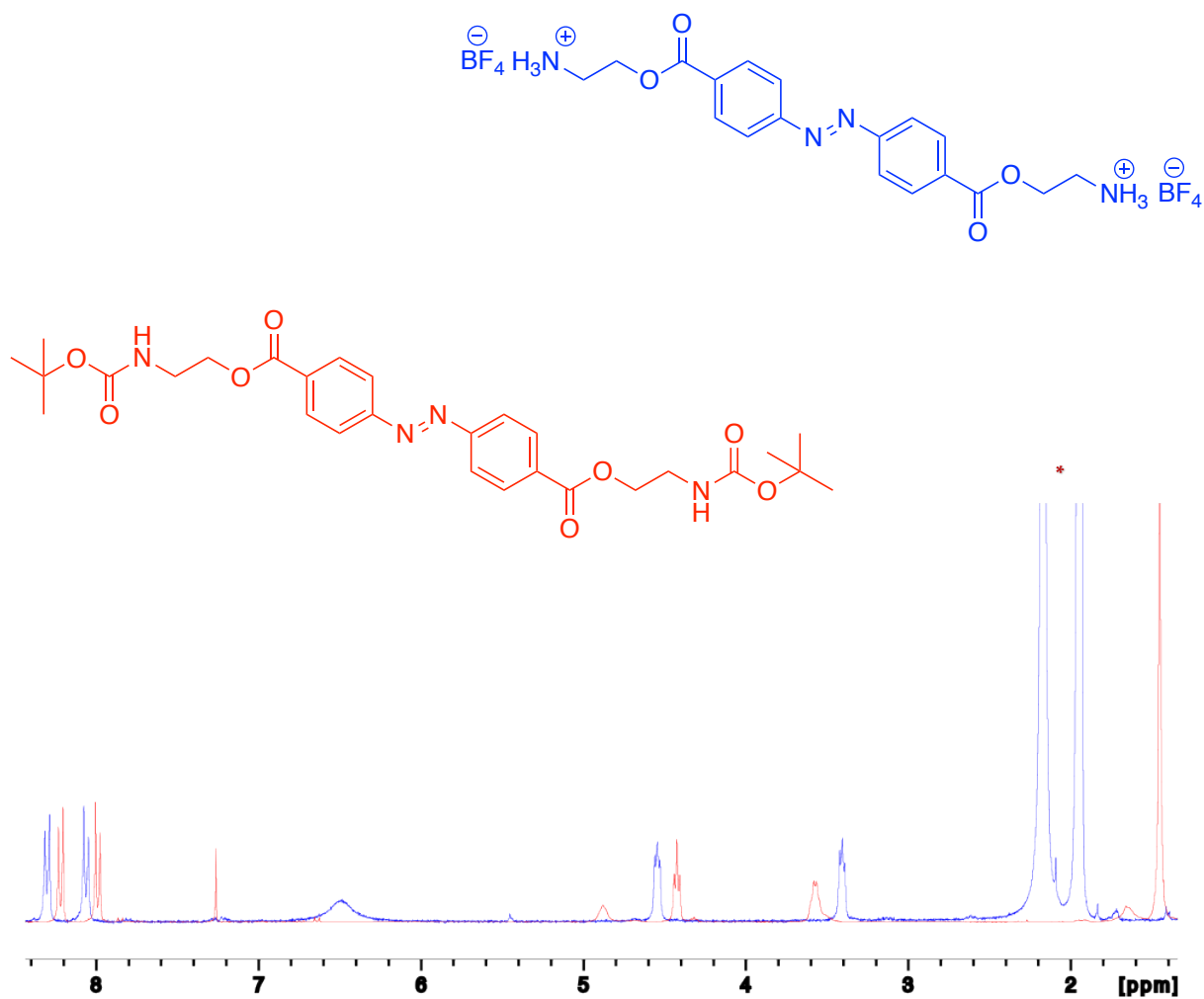
* Picchi residui di solvente, DMF (CDCl₃) δ: 8.02 (CH); 2.96 (CH₃); 2.88 (CH₃)

Sintesi del (*E*)-2,2'-((4,4'-(diazene-1,2-diyl)bis(benzoyl))bis(oxy))bis(ethan-1-aminium) tetrafluoroborate (8**)**



0.113 g (0.20 mmol) di **10** sono stati pesati in una vial che è stata in seguito sigillata e sottoposta a tre cicli consecutivi di vuoto e argon. Sono stati quindi introdotti in atmosfera protetta 1.2 mL (0.60 mmol) di una soluzione 0.5 M di HBF₄·Et₂O in DCM. La soluzione è stata mantenuta in un bagno a ghiaccio (T=0°C) sotto agitazione per 20 minuti al termine dei quali solvente ed acido residuo sono stati allontanati attraverso tre cicli successivi di vuoto e argon inframmezzati da aggiunte di etere etilico. Il prodotto grezzo ottenuto è stato sciolto nella minima quantità di acetonitrile e ricristallizzato per diffusione di etere etilico fornendo 0.064 g (1.20 mmol) di prodotto **8** (resa 59%).

(E)-2,2'-((4,4'-(diazene-1,2-diyl)bis(benzoyl))bis(oxy))bis(ethan-1-aminium) tetrafluoroborate (8)

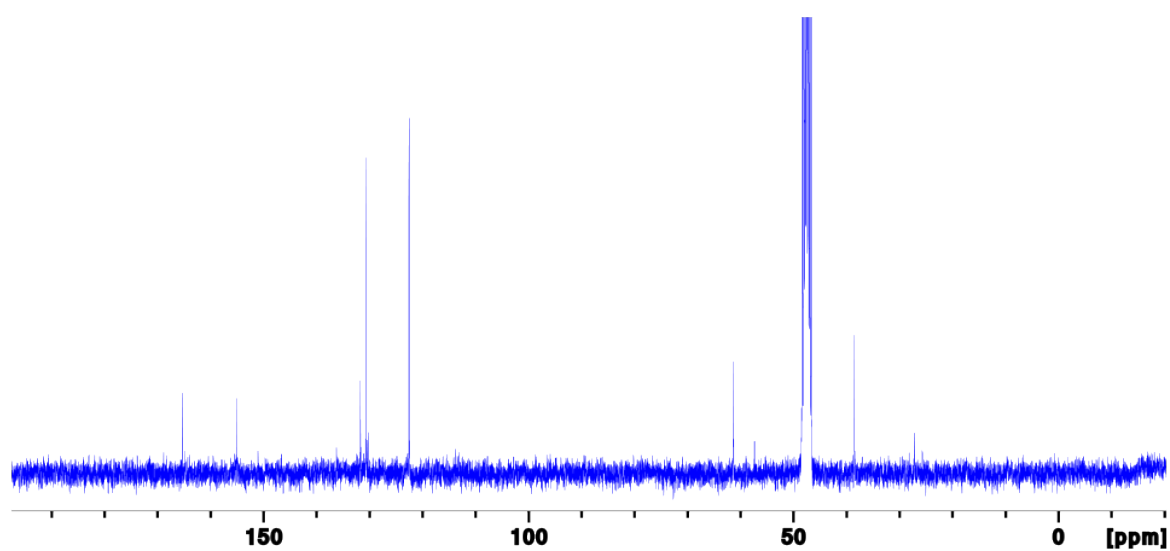
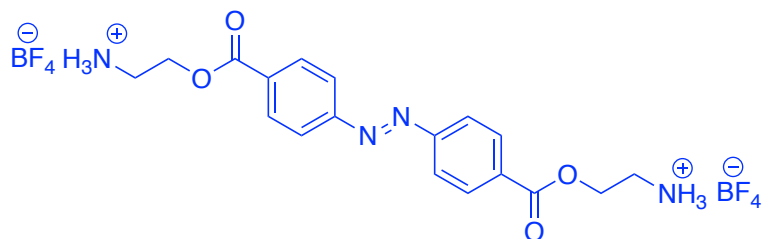


¹H NMR (300 MHz, CD₃CN)

δ : 8.30 (d, J = 8 Hz, 4H); 8.06 (d, J = 8 Hz, 4H); 6.48 (s, 6H); 4.54 (t, J = 5 Hz, 4H) 3.40 (t, J = 5 Hz, 4H)

* Picchi residui di solvente, D₂O (CD₃CN) δ : 2.13; CH₃CN (CD₃CN) δ : 1.96

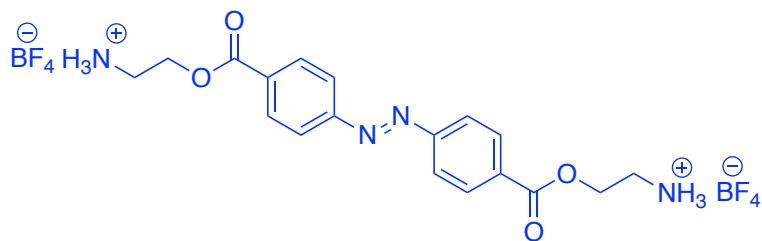
(E)-2,2'-((4,4'-(diazene-1,2-diyl)bis(benzoyl))bis(oxy))bis(ethan-1-aminium) tetrafluoroborate (8)



^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD)

δ : 165.3; 155.1; 131.7; 130.6; 122.5; 61.3; 38.5

(E)-2,2'-((4,4'-(diazene-1,2-diyl)bis(benzoyl))bis(oxy))bis(ethan-1-aminium) tetrafluoroborate (8)



M.p.: >260 °C

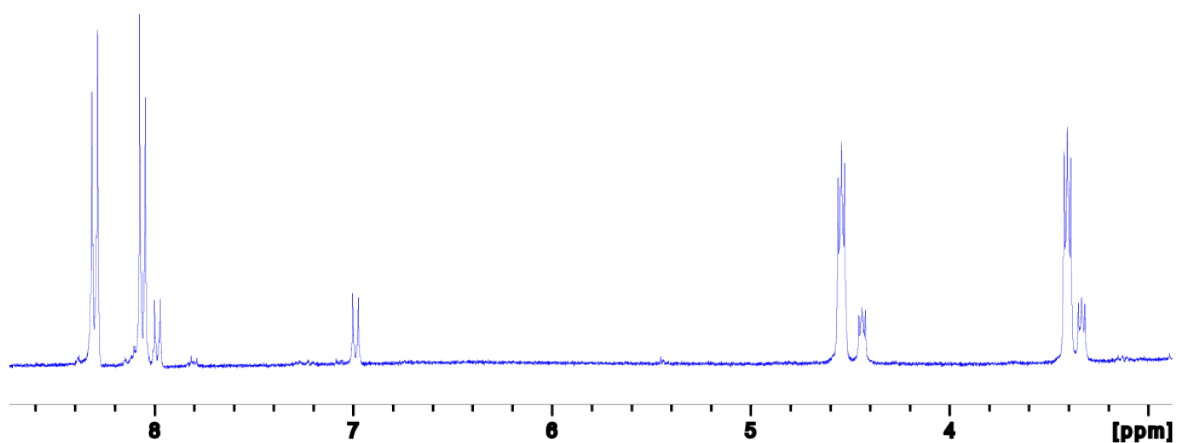
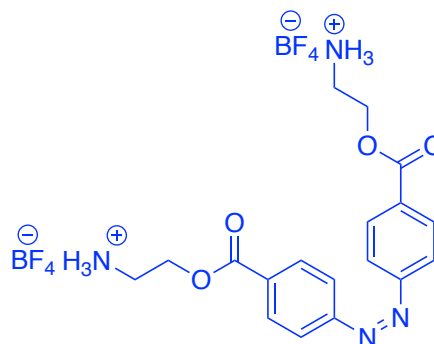
UV-VIS (CH₃CN):

$\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 327 \text{ nm } (2.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$

$\lambda(\epsilon) = 457 \text{ nm } (5.4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$

HRMS-ESI TOF (m/z): [M + H⁺] calcolata per C₁₈H₂₁N₄O₄, 357.1563; trovata 357.1570

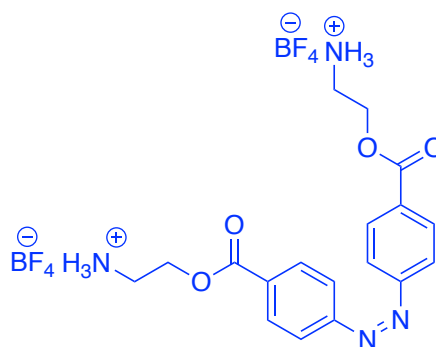
(Z)-2,2'-((4,4'-(diazene-1,2-diyl)bis(benzoyl))bis(oxy))bis(ethan-1-aminium) tetrafluoroborate (8)



¹H NMR (300 MHz, CD₃CN)

δ : 7.98 (d, J = 9 Hz, 4H); 6.99 (d, J = 9 Hz, 4H); 4.44 (t, J = 5 Hz, 4H) 3.33 (t, J = 5 Hz, 4H)

(E)-2,2'-((4,4'-(diazene-1,2-diyl)bis(benzoyl))bis(oxy))bis(ethan-1-aminium) tetrafluoroborate (8)



UV-VIS (CH₃CN):

$\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$

$\lambda = 434 \text{ nm}$

Bibliografia

-
- ¹ Qian, J.; An, Q.; Fortunelli, A.; Nielsen, R.; Goddard, W. Reaction Mechanism And Kinetics For Ammonia Synthesis On The Fe(111) Surface. *Journal of the American Chemical Society* 2018, 140 (20), 6288-6297.
- ² Copeland, R. *Enzymes*; Wiley - VCH (Wiley - India): New Delhi, India, 2008.
- ³ Bank, R. RCSB PDB: Homepage. <https://www.rcsb.org/> (accessed Nov 10, 2019).
- ⁴ Taylor, P.; Camp, S.; Radić, Z. Acetylcholinesterase. *Encyclopedia of Neuroscience* 2009, 5-7.
- ⁵ Pauling, L. Molecular Architecture And Biological Reactions. *Chemical & Engineering News* 1946, 24 (10), 1375-1377.
- ⁶ Matile, S.; Vargas Jentsch, A.; Montenegro, J.; Fin, A. Recent Synthetic Transport Systems. *Chemical Society Reviews* 2011, 40 (5), 2453.
- ⁷ Kirby, A. Enzyme Mechanisms, Models, And Mimics. *Angewandte Chemie International Edition in English* 1996, 35 (7), 706-724.
- ⁸ Chao, Y.; Cram, D. Catalysis And Chiral Recognition Through Designed Complexation Of Transition States In Transacylations Of Amino Ester Salts. *Journal of the American Chemical Society* 1976, 98 (4), 1015-1017.
- ⁹ Zhang, B.; Breslow, R. Ester Hydrolysis By A Catalytic Cyclodextrin Dimer Enzyme Mimic With A Metallobipyridyl Linking Group. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119 (7), 1676-1681.
- ¹⁰ Olivo, G.; Farinelli, G.; Barbieri, A.; Lanzalunga, O.; Di Stefano, S.; Costas, M. Supramolecular Recognition Allows Remote, Site-Selective C–H Oxidation Of Methylenic Sites In Linear Amines. *Angewandte Chemie International Edition* 2017, 56 (51), 16347-16351.
- ¹¹ Ottenbacher, R.; Talsi, E.; Bryliakov, K. Mechanism Of Selective C–H Hydroxylation Mediated By Manganese Aminopyridine Enzyme Models. *ACS Catalysis* 2014, 5 (1), 39-44.
- ¹² Olivo, G.; Capocasa, G.; Lanzalunga, O.; Di Stefano, S.; Costas, M. Enzyme-Like Substrate-Selectivity In C–H Oxidation Enabled By Recognition. *Chemical Communications* 2019, 55 (7), 917-920.

¹³ Glycogen Phosphorylase - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/glycogen-phosphorylase> (accessed Nov 9, 2019).

¹⁴ Schierling, B.; Noel, A.; Wende, W.; Hien, L.; Volkov, E.; Kubareva, E.; Oretskaya, T.; Kokkinidis, M.; Rompp, A.; Spengler, B.; Pingoud, A. Controlling The Enzymatic Activity Of A Restriction Enzyme By Light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, *107* (4), 1361-1366.

¹⁵ Salom, D.; Lodowski, D.; Stenkamp, R.; Trong, I.; Golczak, M.; Jastrzebska, B.; Harris, T.; Ballesteros, J.; Palczewski, K. Crystal Structure Of A Photoactivated Deprotonated Intermediate Of Rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, *103* (44), 16123-16128.

¹⁶ Kwangmettam, S.; Kudernac, T. Light-Fuelled Reversible Expansion Of Spiropyran-Based Vesicles In Water. *Chemical Communications* 2018, *54* (42), 5311-5314.

¹⁷ Crespi, S.; Simeth, N.; König, B. Heteroaryl Azo Dyes As Molecular Photoswitches. *Nature Reviews Chemistry* 2019, *3* (3), 133-146.

¹⁸ Cacciapaglia, R.; Di Stefano, S.; Mandolini, L. The Bis-Barium Complex Of A Butterfly Crown Ether As A Phototunable Supramolecular Catalyst. *Journal of the American Chemical Society* 2003, *125* (8), 2224-2227.

¹⁹ Makhlynets, O.; Rybak-Akimova, E. Aromatic Hydroxylation At A Non-Heme Iron Center: Observed Intermediates And Insights Into The Nature Of The Active Species. *Chemistry - A European Journal* 2010, *16* (47), 13995-14006.

²⁰ Capocasa, G.; Olivo, G.; Barbieri, A.; Lanzalunga, O.; Di Stefano, S. Direct Hydroxylation Of Benzene And Aromatics With H₂O₂ Catalyzed By A Self-Assembled Iron Complex: Evidence For A Metal-Based Mechanism. *Catalysis Science & Technology* 2017, *7* (23), 5677-5686.

²¹ Watts, R.; Sarasa, J.; Loge, F.; Teel, A. Oxidative And Reductive Pathways In Manganese-Catalyzed Fenton'S Reactions. *Journal of Environmental Engineering* 2005, *131* (1), 158-164.

²² Clarke, H. The Action Of Hypochlorite On Sulfanilate. *The Journal of Organic Chemistry* 1971, *36* (24), 3816-3819.

²³ Ashworth, I.; Cox, B.; Meyrick, B. Kinetics And Mechanism Ofn-Boc Cleavage: Evidence Of A Second-Order Dependence Upon Acid Concentration. *The Journal of Organic Chemistry* 2010, *75* (23), 8117-8125.

²⁴ Stranius, K.; Börjesson, K. Determining The Photoisomerization Quantum Yield Of Photoswitchable Molecules In Solution And In The Solid State. *Scientific Reports* 2017, 7 (1).