

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

Tesi di Laurea

**POLISACCARIDI FOTOCROMICI CON GRUPPI
SPIROPIRANO: SINTESI E CARATTERIZZAZIONE
SPETTROSCOPICA**

CANDIDATO

Antonio Tarantino

RELATORI

Dott.ssa Monica Bertoldo

Prof. Valter Castelvetro

CONTRORELATORE

Dott. Giovanni Granucci

Anno Accademico 2014/2015

Riassunto

In questo lavoro di tesi sono stati preparati e caratterizzati derivati di polisaccaridi naturali, quali amido e amilopectina, scelti sia perché materie prime rinnovabili sia per la loro affinità con altri composti naturali simili a loro per struttura, quali carta e fibre tessili.

Questi due polimeri del glucosio sono stati inizialmente funzionalizzati regioselettivamente in posizione C6 dell'unità ripetente con gruppi azidici e successivamente modificati, con l'innesto di nuove funzionalità, sfruttando la reazione di cicloadizione [2+3] dipolare catalizzata da Cu(I), una della più note reazioni cosiddette di "click".

Come funzionalità attiva è stato scelto lo spiropirano, in quanto può fornire derivati in grado di dare risposte cromatiche a seguito di stimoli ambientali come l'esposizione a luce UV o visibile, variazione di polarità dell'ambiente, di pH e forza ionica. In particolare, per la modifica è stato utilizzato l'1',3'-diidro-3',3'-dimetil-1'-propargil-6-nitrospiro[2H-1-benzopiran-2,2'-(2H)-indolo] (SPCC), un derivato dello spiropirano recante una funzionalità alchonica capace di reagire con i gruppi azidici inseriti sui polisaccaridi.

Per ciascun tipo di polimero sono stati preparati due diversi derivati, caratterizzati da una diversa composizione dei gruppi funzionalizzanti. In particolare sono stati preparati polimeri funzionalizzati rispettivamente al 100% e al 40% con il derivato spiropiranico, le rimanenti unità glicosidiche essendo derivatizzate con alcol propargilico, per evitare reazioni indesiderate dei residui azidici non convertiti e ripristinare il gruppo idrossilico originariamente presente sul polisaccaride. Sono stati inoltre preparati anche derivati modificati completamente con propargil alcool, come riferimento.

La struttura dei composti preparati è stata confermata tramite analisi di spettroscopia infrarossa, NMR ed EPR, nonché analisi termogravimetrica al fine di verificare l'effettiva funzionalizzazione e l'assenza di modifiche strutturali indesiderate a carico della catena polisaccaridica.

Le analisi NMR sia in soluzione che allo stato solido hanno permesso di escludere la presenza di quantità significative di SPCC non legato, mentre lo studio EPR ha mostrato la presenza di tracce di rame(II) derivanti dal residuo di catalizzatore, nonostante le accurate procedure di purificazione dei prodotti di reazione. L'unica eccezione è stata quella del derivato dell'amilosio completamente funzionalizzato con propargil alcool (APA₁₀₀), il cui spettro EPR era privo di segnali attribuibili a ioni Cu(II).

Nella seconda parte del lavoro di tesi è stata studiata, attraverso spettroscopia UV/Vis, la risposta ottica dei derivati dell'amilosio con gruppi spiropirano, sciolti in DMSO, DMF, H₂O

e THF. Questo studio è stato condotto solo sui derivati dell'amilosio modificati rispettivamente col 100% (ASP_{100}) e 40% (ASP_{40}) di gruppi spiropirano, in quanto test preliminari hanno mostrato una minore solubilità dei derivati a base di amilopectina in tutti i solventi considerati.

L'analisi UV/Vis ha mostrato una diversa solubilità ed un distinto comportamento ottico di questi prodotti nei quattro solventi presi in esame. In particolare gli spettri UV/Vis nei quattro solventi di analisi si differenziano, sia prima che dopo irraggiamento con luce UV, per la posizione delle bande caratteristiche. Prima dell'esposizione alla radiazione ultravioletta la differenza più significativa è la presenza di una banda con massimo a circa 420-430 nm in DMF e in DMSO, che è stata attribuita all'assorbimento della merocianina (forma derivante dalla foto-isomerizzazione dello spiropirano) in forma protonata. Dopo irraggiamento in tutti i solventi compare una banda con massimo nella regione compresa tra 555 e 570 nm, caratteristica della merocianina prevalentemente in forma zwitterionica. La posizione esatta del massimo dipende in modo combinato dal solvente e dal grado di funzionalizzazione. Le differenze spettrali dovute al solvente sono state attribuite ad un diverso rapporto tra le due forme di risonanza di MC (zwitterionica e chinonica) al variare della polarità del mezzo. Le differenze spettrali tra ASP_{40} e ASP_{100} sono state, invece, attribuite alla formazione di due tipologie di associazione tra i gruppi merocianinici, detti aggregati di tipo H in DMSO e J in DMF.

I campioni sottoposti a cicli ripetuti di luce/buio hanno mostrato effetti di fatica, associati al processo di foto-isomerizzazione, in tutti i solventi investigati nel caso di ASP_{40} , mentre il campione funzionalizzato al 100% con spiropirano (ASP_{100}) è sembrato essere meno suscettibile a questi effetti, particolarmente in H_2O e in DMSO. In THF, invece, la banda della merocianina in ASP_{100} ha mostrato un decadimento anche più elevato di quello osservato per ASP_{40} .

Oltre alla diminuzione dell'intensità della banda della merocianina nei cicli successivi di irraggiamento, in tutti i campioni è stata osservata la comparsa o l'aumento di intensità della banda di assorbimento attribuita alla merocianina protonata (MCH^+), la quale non decade termicamente durante le fasi di buio. Per spiegare tale fenomeno è stato ipotizzato che l'isomerizzazione dei gruppi spiropiranicici sia accompagnata da una riorganizzazione conformazionale del polisaccaride funzionalizzato, in cui i gruppi cromofori in catena laterale vengono via via a trovarsi in intorni in cui la specie MCH^+ è stabilizzata dalla presenza del polisaccaride.

Indice

1	INTRODUZIONE	1
1.1	FOTOCROMISMO E MOLECOLE “PHOTOSWITCH”	1
1.1.1	Introduzione	1
1.1.2	Definizione di fotocromismo	2
1.1.3	Molecole fotoresponsive	2
1.2	SPIROBENZOPIRANI	4
1.3	SISTEMI FUNZIONALIZZATI COVALENTEMENTE CON SPIROBENZOPIRANI	9
1.3.1	Proprietà	9
1.3.2	Esempi applicativi	11
1.3.2.1	Riconoscimento della polarità di un solvente	11
1.3.2.2	Fotocontrollo della fluorescenza di nanoparticelle polimeriche	13
1.3.2.3	Fotocontrollo della complessazione di ioni metallici	14
1.3.2.4	Fotocontrollo della bagnabilità di una superficie	17
1.3.2.5	Fotocontrollo della variazione di volume di un idrogel polimerico	19
1.3.3	Biopolimeri funzionalizzati con spirobenzopirani	20
1.3.3.1	Fotocontrollo della conformazione di proteine	21
1.3.3.2	Fotoregolazione dell’attività enzimatica	22
1.3.3.3	Polisaccaridi fotoresponsive	24
1.4	POLISACCARIDI: UNA GRANDE VARIETA’ DI STRUTTURE E FUNZIONALITA’	26
1.5	L’AMIDO	30

1.6	LA REAZIONE DI “CLICK” PER LA MODIFICA DEI POLISACCARIDI.....	31
1.7	SCOPO DEL LAVORO DI TESI	35
2	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	37
2.1	CARATTERIZZAZIONE DELL’AMILOSIO E DELL’ AMILOPECTINA DI PARTENZA	37
2.1.1	Caratterizzazione ¹ H e ¹³ C NMR	37
2.1.2	Caratterizzazione ATR-IR	43
2.1.3	Caratterizzazione TGA	44
2.2	MODIFICA DELL’AMILOSIO E DELL’ AMILOPECTINA	45
2.2.1	Azidazione	45
2.2.2	Reazione di click.....	52
2.3	STUDIO DELLE PROPRIETA’ OTTICHE DEI PRODOTTI FOTOATTIVI IN SOLUZIONE.....	75
2.3.1	Prove di solubilità.....	75
2.3.2	Studio delle proprietà spettroscopiche e di solubilità dei composti quando esposti alla luce UV	80
2.3.3	Ottimizzazione dei tempi di irraggiamento UV delle soluzioni	88
2.3.4	Cinetica di retro-isomerizzazione	90
2.3.5	Cicli luce/buio.....	92
	2.3.5.1 DMSO.....	92
	2.3.5.2 DMF	96
	2.3.5.3 H ₂ O.....	99
	2.3.5.4 THF.....	103
2.4	DISCUSSIONE DEI RISULTATI UV	107

3	CONCLUSIONI	112
4	PARTE SPERIMENTALE	116
4.1	MATERIALI IMPIEGATI.....	116
4.1.1	Solventi.....	116
4.1.2	Reagenti	116
4.2	STRUMENTI E METODI DI ANALISI.....	117
4.2.1	Analisi termogravimetrica (TGA)	117
4.2.2	Spettroscopia FT-IR.....	118
4.2.3	Spettrometria ¹ H-NMR e ¹³ C-NMR	118
4.2.4	EPR (Risonanza Paramagnetica Elettronica).....	119
4.2.5	Spettrofotometria UV/Vis.....	120
4.2.6	Proprietà fotocromiche	121
4.2.6.1	Irraggiamento UV	121
4.2.6.2	Cinetiche di retro-isomerizzazione.....	122
4.2.6.3	Cicli luce/buio	122
4.2.7	Prove di solubilità.....	122
4.3	CARATTERIZZAZIONE DEI REAGENTI	123
4.3.1	Amilosio	123
4.3.2	Amilopectina.....	123
4.3.3	Propargil alcool.....	124
4.3.4	1',3'-diidro-3',3'-dimetil-1'-propargil-6-nitrospiro[2H-1-benzopiran-2,2'-(2H)- indolo] (SPCC)	124
4.4	AZIDAZIONE DELL'AMILOSIO.....	127

4.5	AZIDAZIONE DELL'AMILOPECTINA	128
4.6	MODIFICA DELL'AMILOSIO CON SPIROPIRANO E/O PROPARGIL	
	ALCOOL.....	129
4.6.1	100% SPCC (<i>ASP</i> ₁₀₀)	129
4.6.2	40% SPCC e 60% Propargil Alcool (<i>ASP</i> ₄₀).....	130
4.6.3	100% Propargil Alcool (<i>APA</i> ₁₀₀).....	131
4.7	MODIFICA DELL'AMILOPECTINA CON SPIROPIRANO E/O PROPARGIL	
	ALCOOL.....	132
4.7.1	100% SPCC (<i>APSP</i> ₁₀₀).....	132
4.7.2	40% SPCC e 60% Propargil Alcool (<i>APSP</i> ₄₀)	132
4.7.3	100% Propargil Alcool (<i>APPA</i> ₁₀₀)	133
5	BIBLIOGRAFIA.....	134

1 INTRODUZIONE

1.1 FOTOCROMISMO E MOLECOLE “PHOTOSWITCH”

1.1.1 Introduzione

Per secoli la natura ha impressionato gli scienziati con il suo ricco repertorio di materiali e sistemi che possono adattare reversibilmente la loro struttura e le loro proprietà in risposta a stimoli ambientali. Un'ampia gamma di esempi sono disponibili in natura, ed alcuni di essi includono la risposta agli shock termici nei batteri¹, il camuffamento nei cefalopodi e nei camaleonti² e il cambiamento di colore negli echinodermi in risposta alla luce³.

In netto contrasto, quasi tutti i tradizionali materiali creati dall'uomo sono statici sia nella forma che nella funzione, e solo piuttosto recentemente l'attenzione dei chimici dei materiali si sta gradualmente spostando verso i materiali cosiddetti dinamici^{4,5,6,7}. Questi hanno molteplici vantaggi rispetto alle loro controparti statiche: determinate proprietà di interesse possono essere “attivate” o “disattivate” a comando e questa abilità di riconfigurare tali materiali li rende interessanti per molti usi. Applicazioni emergenti includono rivestimenti fotocromatici o elettrocromatici per finestre “intelligenti”, installate in edifici energeticamente efficienti, carta auto-cancellante riutilizzabile, rivestimenti auto-riparanti e materiali a memoria di forma o attuatori piezoelettrici, per nominarne solo alcune.

Tra le differenti forme di segnali esterni che possono influenzare lo stato di un materiale, la luce ha numerosi vantaggi^{8,9,10,11}: può essere fornita con un'alta precisione spaziale e temporale, non viene introdotto alcun contaminante chimico nel sistema e, infine, può essere utilizzata una radiazione di una specifica lunghezza d'onda.

1.1.2 Definizione di fotocromismo

Il fotocromismo è una trasformazione reversibile di una specie chimica A in una specie B, avente spettro di assorbimento diverso da A, indotta dall'assorbimento di una radiazione elettromagnetica di una specifica lunghezza d'onda¹².

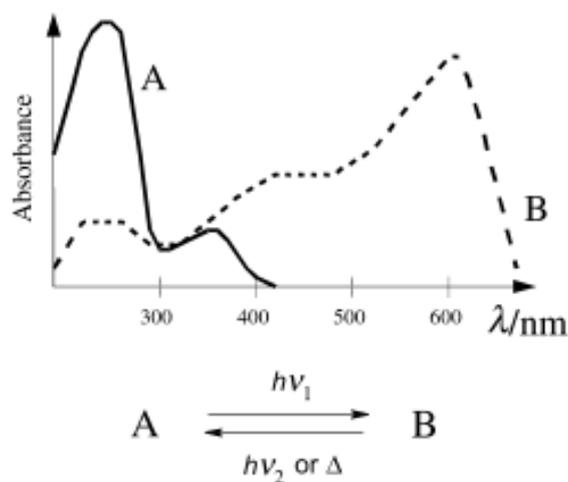


Figura 1.1 – Tipici spettri UV-Vis di una specie fotoresponsiva nei suoi due stati fondamentale (A) ed eccitato (B).

Il cambiamento spettrale prodotto è tipicamente, ma non necessariamente, nell'intervallo della luce visibile, ed è accompagnato dalla variazione di alcune proprietà fisiche e chimiche della molecola.

La forma A, termodinamicamente stabile, è trasformata tramite irraggiamento nella forma B. La reazione inversa può avvenire termicamente (fotocromismo di tipo T) o fotochimicamente (fotocromismo di tipo P)⁹.

1.1.3 Molecole fotoresponsive

Le molecole fotoresponsive sono composti aventi la capacità di utilizzare l'energia di eccitazione proveniente dalla luce per riorganizzare i propri legami chimici e rilassarsi in una forma più stabile, che può essere semplicemente un diverso conformero, o isomero configurazionale, oppure una specie molecolare avente un diverso arrangiamento strutturale.

Il fotocromismo osservato nelle molecole fotoattive è tipicamente associato a due diversi tipi di riorganizzazione: reazioni di apertura e chiusura di anello e l'isomerizzazione *cis-trans*. La

prima classe di molecole (figura 1.2) include fulgidi^{13,14}, diarileteni^{9,15}, naftopirani¹⁶ e spiropirani^{17,18,19,20}, mentre la seconda classe (figura 1.3) include azobenzeni^{21,22} e stilbeni^{23,24}.

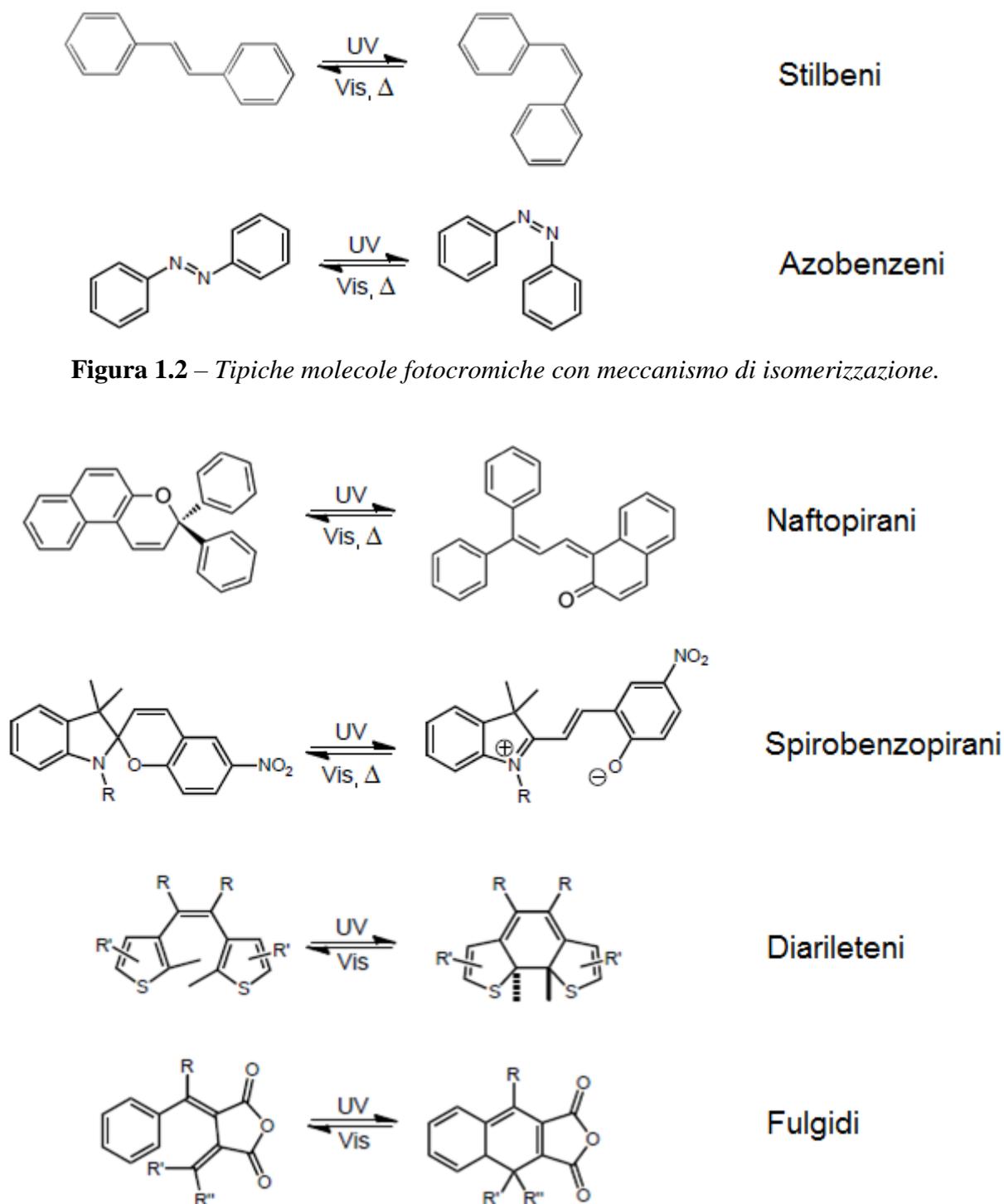


Figura 1.3 – *Tipiche molecole fotocromiche con meccanismo di apertura-chiusura di anello.*

Tutte queste molecole sono state ampiamente studiate e impiegate per la costruzione di sistemi e materiali fotoresponsivi. Ciascuna di esse ha i suoi vantaggi e svantaggi. Gli azobenzeni, ad esempio, sono strutturalmente semplici e facilmente sintetizzabili;

sfortunatamente l'efficienza della conversione *cis-trans* di solito è tutt'altro che quantitativa, inoltre molti composti appartenenti a questa classe sono molto tossici o cancerogeni. I diarileteni, d'altra parte, non sono ideali per la progettazione di architetture switchabili in quanto la modifica indotta, consistente in una interconversione di isomeri costituzionali, non modifica in maniera drastica le proprietà della molecola, ma questa classe di molecole ha mostrato un'ottima resistenza alla fotodegradazione^{9,25} – un inconveniente che è, invece, tradizionalmente associato agli spiropirani^{26,27}, i quali, per contro, subiscono una modifica significativa per effetto della fotoisomerizzazione.

Tra tutte le differenti famiglie di composti fotocromici, gli spirobenzopirani sono probabilmente i più studiati, grazie alla loro elevata fotosensibilità, ad un cambiamento di colore molto evidente, associato all'apertura dell'anello “spiro”, e alle rapide cinetiche di isomerizzazione tra i due isomeri.

1.2 SPIROBENZOPIRANI

Gli spirobenzopirani strutturalmente consistono di una struttura benzopiranica, generalmente un 2*H*-1-benzopirano (cromene), legata tramite una spiro-giunzione ad una struttura indolinica, il cui piano molecolare è orientato perpendicolarmente rispetto a quello del cromene. (figura 1.4; **1**).

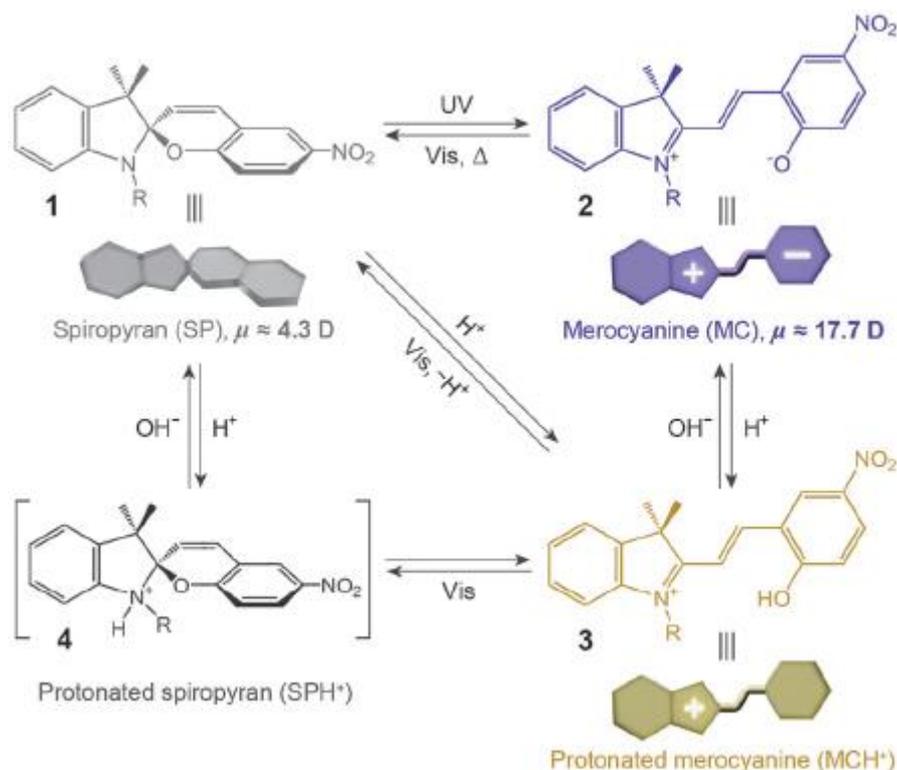


Figura 1.4 – Fotocromismo e pHcromismo dello spiropirano. Trasformazioni reversibili tra i quattro stati: spiropirano (SP) **1**, merocianina (MC) **2**, merocianina protonata (MCH⁺) **3**, e spiropirano protonato (SPH⁺) **4**.

L'irraggiamento con luce UV ($\lambda = 365$ nm) della forma SP, incolore, dà origine all'isomero ad anello aperto, chiamato merocianina (MC; **2** in figura 1.4). Indagini teoriche^{28,29} e studi spettroscopici³⁰ riguardanti il meccanismo con cui avviene la fotoisomerizzazione hanno dimostrato che il processo inizia con la scissione eterolitica del legame carbonio-ossigeno del gruppo spiro, con la formazione della *cis*-MC^{31,32,33} (**5** in figura 1.5), una specie attivata rilevabile mediante spettroscopia di assorbimento UV transiente della molecola irraggiata. La rotazione attorno ai legami centrali C-C produce, in definitiva, la forma *trans* dell'isomero MC^{22,23}, la quale è un ibrido tra due forme di risonanza, una zwitterionica (**7**) e una chinoide (**8**) (figura 1.5). L'isomerizzazione inversa MC→SP generalmente avviene spontaneamente e può essere accelerata dalla luce visibile.

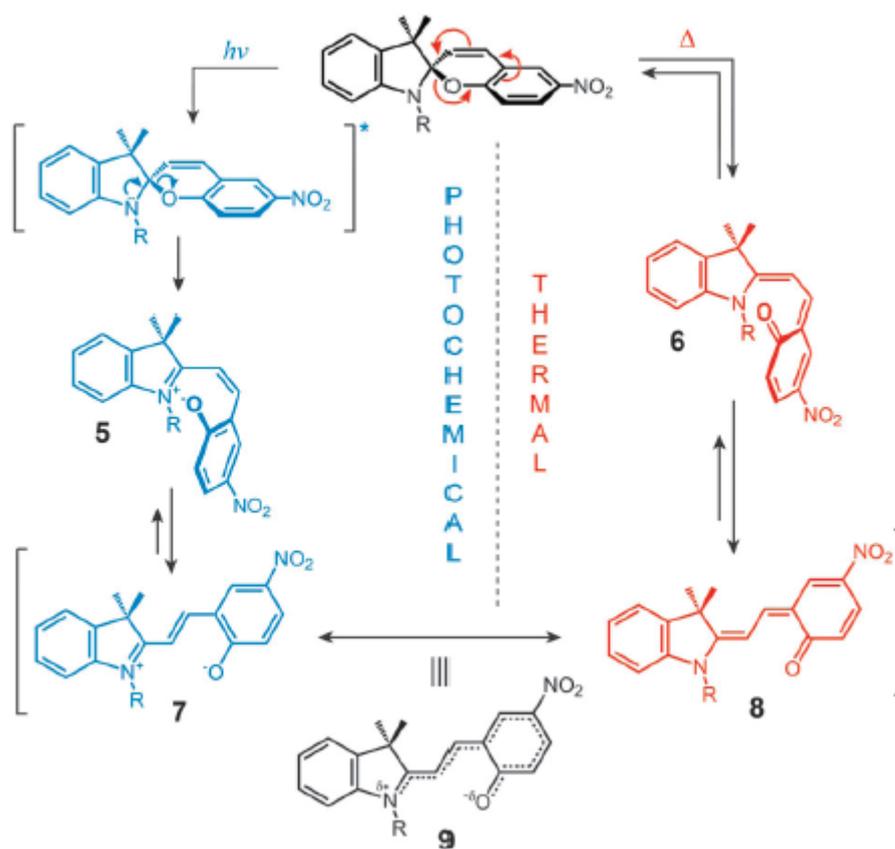


Figura 1.5 – Meccanismo dell'isomerizzazione fotochimica e termica dello spiropirano.

A causa della sua struttura caratterizzata da un'estesa coniugazione- π tra le frazioni indolinica e cromenica, la merocianina mostra una singola transizione localizzata nella regione del visibile, con $\lambda_{\text{max}} = 550\text{-}600$ nm nella maggior parte dei solventi non polari (figura 1.6). La posizione esatta di questa banda è dettata dai relativi contributi delle due forme di risonanza. I mezzi non polari, i quali stabilizzano preferenzialmente la forma chinoide^{20,34}, diminuiscono la differenza di energia tra gli stati fondamentale ed eccitato della merocianina, e come risultato si osserva uno spostamento batocromico della banda di assorbimento^{33,35,36}. Questa forte dipendenza dall'ambiente dell'assorbimento di MC è stata sfruttata per la costruzione di sistemi microcapillari capaci di rilevare specifici solventi^{37,38}.

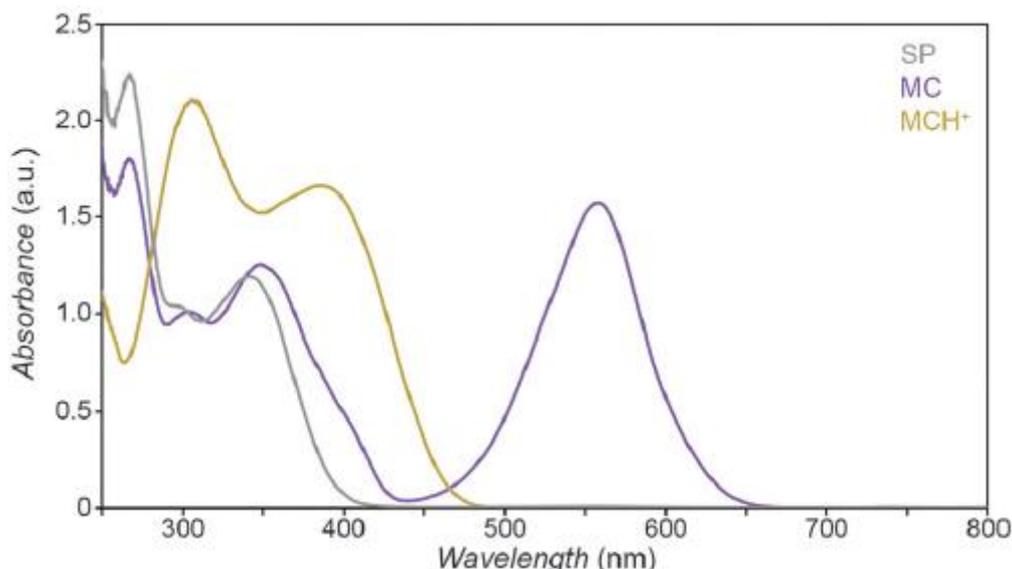


Figura 1.6 – Spettri UV dello spiropirano (*1',3',3'*-trimetil-6-nitrospiro[cromene-2,2'-indolina]) prima (grigio) e dopo (viola) irraggiamento con luce UV (5 min.; $I = 0.7 \text{ mWcm}^{-2}$), e dopo l'aggiunta di 20 eq. di HCl (giallo). Gli spettri sono stati registrati per una soluzione di acetonitrile a concentrazione 0.231 mM; lunghezza del cammino ottico = 10 mm.

L'ampia gamma di possibili campi di utilizzo dello spiropirano risiede nel fatto che gli isomeri SP e MC hanno proprietà chimico-fisiche notevolmente differenti. Innanzitutto, la separazione di carica in MC dà origine ad un elevato momento di dipolo elettrico, rispetto all'isomero SP. Calcoli DFT (Density Functional Theory³⁹), così come misure di interferometria elettrica⁴⁰ e di assorbimento elettro-ottico⁴¹ hanno mostrato che, il momento di dipolo dell'isomero SP, che è di circa 4-6 D, aumenta drasticamente fino a circa 14-18 D nella forma MC (figura 1.4). In secondo luogo, i due isomeri mostrano delle differenze strutturali significative, per cui SP occupa meno volume di MC. Terzo, l'isomero SP è otticamente trasparente nella regione del visibile, mentre MC assorbe fortemente a $\lambda_{\text{max}} = 550\text{-}600 \text{ nm}$ e appare blu scuro (figura 1.6). Quarto, SP e MC differiscono marcatamente nel loro comportamento fotofisico: mentre l'isomero SP ha emissione trascurabile, l'apertura dell'anello produce la comparsa di un'intensa banda di fluorescenza⁴² centrata a $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$ (figura 1.7). L'emissione rossa risultante è “spenta” appena si riforma l'anello piranico, a causa della rottura dell'estesa coniugazione- π .

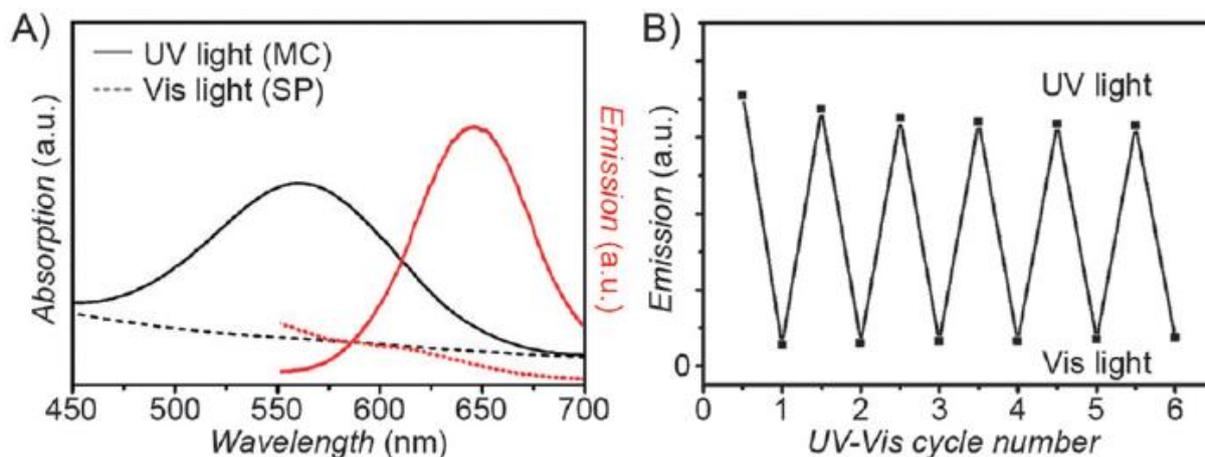


Figura 1.7 – Proprietà di fluorescenza del sistema SP-MC. (A) Tipici profili di assorbimento (in nero) ed emissione (in rosso) di SP (linee tratteggiate) e di MC (linee continue). (B) Spettri di emissione ($\lambda_{em} = 645 \text{ nm}$) in un polimero funzionalizzato con molecole di spiropirano sottoposto a cicli di fatica mediante esposizione a radiazione UV e visibile.

Infine, la forma MC ha più alta affinità per differenti specie chimiche, quali specie zwitterioniche e ioni metallici, rispetto a SP.

Le sopra citate differenze tra i due isomeri sono intimamente collegate ad un'altra caratteristica unica dello spiropirano: la sua responsività a diversi stimoli. In aggiunta ad essere fotocromica, la sua isomerizzazione reversibile può essere indotta da svariati stimoli indipendenti, quali: la temperatura¹⁷ (termocromismo), il pH⁴³ (pHcromismo), la polarità del solvente⁴⁴ (solvatocromismo), il potenziale redox⁴⁵ (elettrocromismo), la presenza di ioni metallici⁴⁶ (ionocromismo) e persino la forza meccanica⁴⁷ (meccanocromismo).

Un'altra importante caratteristica della struttura molecolare dell'isomero MC è la sua tendenza ad auto-aggregarsi: guidata prevalentemente da interazioni dipolo-dipolo, l'aggregazione avviene facilmente nei solventi idrofobici⁴⁸. Le unità MC possono impilarsi in due modi diversi: l'arrangiamento "testa-coda" dei dipoli dà origine ai cosiddetti aggregati J, mentre quello "testa-testa" porta agli aggregati H (figura 1.8).

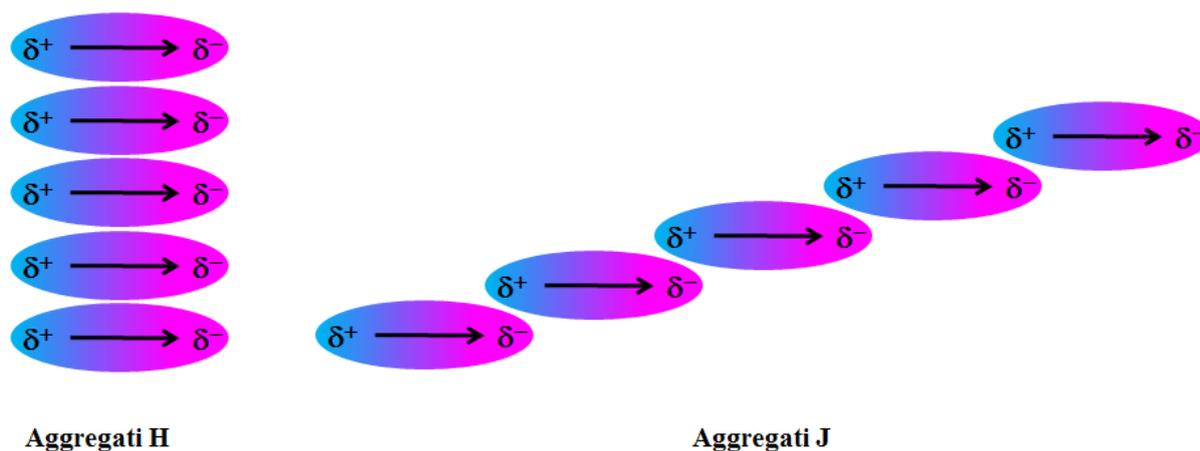


Figura 1.8 – Rappresentazione schematica degli aggregati di tipo H e J, in cui sono evidenziati i momenti di dipolo delle molecole.

Questi due tipi di aggregati possono essere facilmente identificati nello spettro di assorbimento poiché l'impilamento di tipo J sposta la banda di assorbimento dell'isomero MC a lunghezze d'onda più alte (spostamento batocromico, o verso il rosso), mentre quello di tipo H si manifesta con lo spostamento ipsocromico (verso il blu), a lunghezze d'onda più basse.

Entrambi gli aggregati J e H sono ben conosciuti^{49,50,51,52} e possono anche coesistere^{52,53}.

L'aggregazione della forma MC stabilizza l'isomero ad anello aperto e, quindi, ritarda fortemente^{52,54} o addirittura blocca completamente⁵⁵ la reazione di chiusura dell'anello.

L'aggregazione è perciò controproducente per lo sviluppo di sistemi di switching efficienti. Tuttavia, essa può essere limitata o evitata immobilizzando le unità cromofore, che così non hanno modo di aggregarsi.

1.3 SISTEMI FUNZIONALIZZATI COVALENTEMENTE CON SPIROBENZOPIRANI

1.3.1 Proprietà

L'immobilizzazione attraverso legame covalente dello spiropirano su un supporto presenta numerosi vantaggi rispetto alla molecola non legata o legata non covalentemente:

1) La molecola rimane permanentemente attaccata al supporto, risolvendo il problema del leaching caratteristico dei sistemi legati in maniera non covalente, il quale è dovuto a caratteri nettamente diversi degli isomeri ad anello chiuso ed aperto⁵⁶;

- 2) Migliora la lavorabilità: l'immobilizzazione dello spiropirano ad un substrato inorganico o polimerico permette di sfruttare a proprio vantaggio le proprietà meccaniche, la capacità di formazione di film, ecc., impartite dal substrato stesso;
- 3) Permette la biocompatibilità: il legame dello spiropirano con polimeri biocompatibili ha mostrato dare materiali anch'essi biocompatibili^{57,58}, aprendo la strada a possibili applicazioni in campo biomedicale;
- 4) Previene l'aggregazione dell'isomero merocianina: l'immobilizzazione sopprime le interazioni intermolecolari e quindi la possibilità di formazione di aggregati. Tenere isolate le molecole di MC le une dalle altre è importante quando sia richiesta una reversibilità di isomerizzazione veloce ed efficiente in entrambe le direzioni, anche in solventi apolari⁵⁹;
- 5) Riduce la fotodegradazione. Uno dei benefici più importanti che deriva dalla immobilizzazione dello spiropirano è l'incremento della resistenza alla "fatica", cioè alla graduale degradazione con l'aumentare del numero di cicli di switching (isomerizzazione retro-isomerizzazione). Sebbene la fotoisomerizzazione dello spiropirano sia, in teoria, un processo non distruttivo, reazioni secondarie possono portare a sottoprodotti che abbassano le proprietà di fotorisposta⁶⁰;
- 6) Aumenta la fluorescenza dell'isomero MC⁶¹: l'immobilizzazione riduce la diffusività e la mobilità conformazionale del fluoroforo, proteggendolo dallo spegnimento attraverso processi non radiativi (ad esempio via collisione con altre molecole in soluzione). Come conseguenza, la resa in emissione è più elevata.

L'immobilizzazione della molecola fotoresponsiva su una catena polimerica influenza anche la compatibilità con i solventi; in genere, lo scheletro polimerico contribuisce in maniera molto maggiore rispetto ai gruppi laterali alla solubilità totale del sistema. Ad esempio, il polimero idrofilico poli-(N-isopropilacrilammide) (PNIPAM) mostra una buona solubilità in acqua anche quando funzionalizzato con gruppi spiropirano (i quali sono idrofobi) fino ad un certo grado di sostituzione, dopodiché si osserva un andamento opposto e la solubilità è determinata dai gruppi laterali.

La catena polimerica influenza anche le proprietà ottiche del cromoforo su essa immobilizzato spostando i massimi di assorbimento a lunghezze d'onda diverse⁶².

Inoltre incide sulla cinetica di isomerizzazione; in pratica agisce da "tampone" stabilizzando la molecola contro le variazioni di ambiente in cui si trova^{63,64}.

Le proprietà della molecola fotoattiva possono anche essere modulate dalla lunghezza dello spaziatore utilizzato per il legame con il polimero. In linea di principio, spaziatori più lunghi

permettono una maggiore flessibilità conformazionale e favoriscono la solvatazione da parte delle molecole di solvente, accelerando la cinetica di isomerizzazione⁶⁵.

Infine, in alcuni casi, l'effetto del supporto può essere tale da indurre una transizione tra fotocromismo positivo e negativo⁶⁶. Ad esempio, lo spiropirano legato a catene di PNIPAM ha mostrato fotocromismo positivo nonostante il polimero fosse circondato da una matrice di gel di silice fortemente idrofilica⁶⁷.

1.3.2 Esempi applicativi

Come accennato nel paragrafo precedente, ciò che fa degli spiropirani una classe di composti organici molto studiati per la loro potenziale applicabilità in svariati campi, sono le marcate differenze tra le proprietà fisiche e chimiche dei due isomeri SP e MC.

Proprio grazie a queste interessanti proprietà, gli spirobenzopirani si stanno dimostrando adatti per una vasta gamma di applicazioni, quando incorporati in differenti substrati, per la creazione di nuove piattaforme le cui funzioni e proprietà possono essere modificate radicalmente e controllate usando stimoli esterni. Tra gli svariati campi di possibile utilizzo troviamo, tra gli altri, quello della sensoristica, della biomedicina, delle memorie ottiche, della microfluidica e dei sistemi optoelettronici.

1.3.2.1 Riconoscimento della polarità di un solvente

La più semplice e immediata differenza tra la forma chiusa e quella aperta dello spiropirano è il colore.

E' ormai ben saputo che lo spiropirano in forma aperta presenta proprietà solvatocromiche, il che significa che la sua banda di assorbimento subisce uno spostamento a lunghezze d'onda più alte o più basse a seconda della polarità del solvente in cui si trova.

Questa proprietà è stata sfruttata da Florea e coll.^{68,69} per la costruzione di una piattaforma analitica miniaturizzata in cui la polarità di un determinato solvente è foto-rilevabile in maniera del tutto non invasiva, sfruttando la sola radiazione ultravioletta e la dipendenza della colorazione della merocianina dalla polarità del solvente, dimostrando che questa piattaforma può essere utilizzata per lo sviluppo di sensori ottici capillari integrati.

Le pareti interne di microcapillari di silice fusa sono state modificate polimerizzando direttamente al loro interno un monomero norbornene contenente lo spiroirano. Il polimero è stato ottenuto per polimerizzazione ad apertura di anello, usando la superficie stessa come iniziatore, previa attivazione della silice con ottenil triclorosilano (figura 1.9).

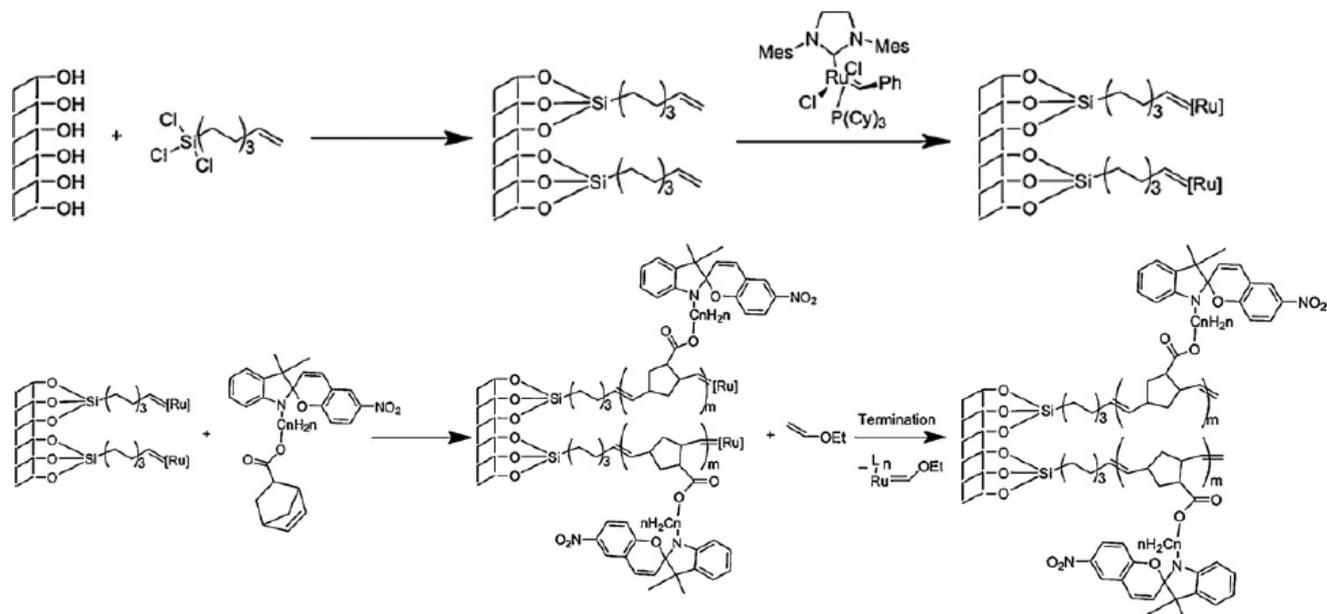


Fig. 1.9 – Schema della funzionalizzazione di microcapillari in silice fusa tramite polimerizzazione ad apertura di anello di un monomero derivatizzato con uno spiroirano.

I capillari sono stati usati con successo per identificare solventi di differenti polarità, fatti passare attraverso i capillari con un flusso continuo. Sei differenti solventi (toluene, THF, acetone, acetonitrile, etanolo e metanolo) sono stati facilmente riconosciuti semplicemente irraggiando con luce UV ad opportuna lunghezza d'onda (365nm) i capillari (figura 1.10).

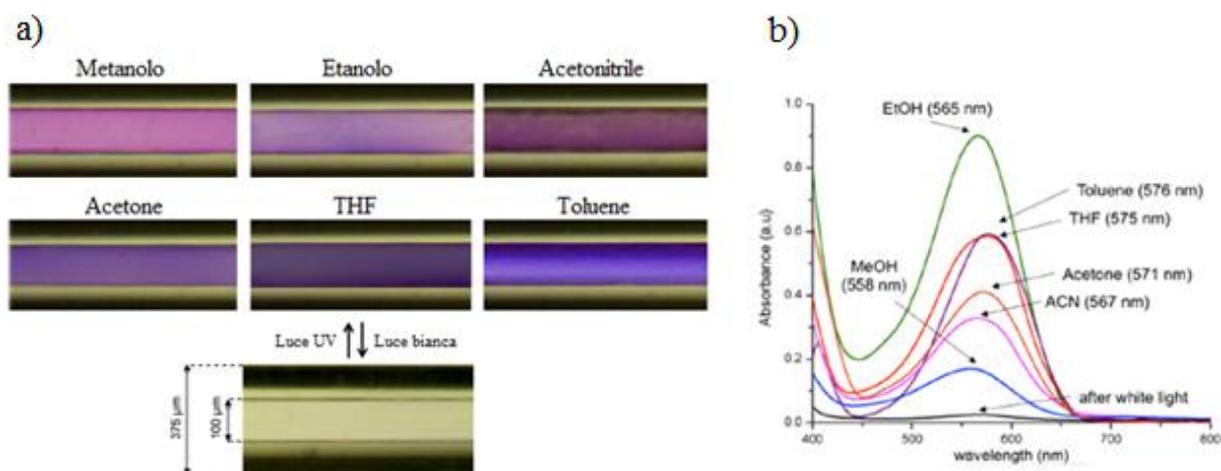


Fig. 1.10 – (a) Immagini di microcapillari in silice modificata irraggiati per 20 secondi con luce UV mentre vengono fatti attraversare da 6 diversi solventi con un flusso continuo ($0,5 \mu\text{l min}^{-1}$), e dopo irraggiamento con luce bianca per altri 20 secondi; (b) Relativi spettri di assorbimento.

1.3.2.2 Fotocontrollo della fluorescenza di nanoparticelle polimeriche

Nel corso degli anni, le proprietà di fluorescenza dei polimeri modificati con spirobenzopirani sono state ampiamente studiate soprattutto per la loro potenziale applicabilità nella microscopia a fluorescenza ad altissima risoluzione^{70,71,72,73}, tecnica adatta specialmente per i sistemi biologici per le quali le convenzionali tecniche di microscopia ad alta risoluzione (TEM, SEM, AFM) non sono praticabili per via della loro elevata invasività. Ideali per queste applicazioni sono polimeri fotoresponsivi in forma di nanoparticelle sferiche⁷¹. Nel caso più semplice, la fluorescenza di queste nanoparticelle (NPs) è attivata o disattivata, rispettivamente, mediante esposizione alla luce UV e visibile. Tali NPs, indicate col nome di nanoparticelle di “prima generazione” (figura 1.11) furono originariamente sintetizzate da Li e i suoi colleghi tramite polimerizzazione in emulsione di una miscela contenente N-isopropilacrilammide (NIPAM), stirene, divinilbenzene e un monomero metacrilato-spiropirano⁷⁴.

Più recentemente sono stati sviluppati sistemi di seconda e terza generazione, contenenti più di un fluoroforo e capaci di emettere luce, rispettivamente, a due e a tre lunghezze d’onda differenti a seconda della forma in cui si trova lo spiropirano e in dipendenza dello stimolo a cui il sistema è esposto, come temperatura⁷⁵ o pH^{76,77} (figura 1.11).

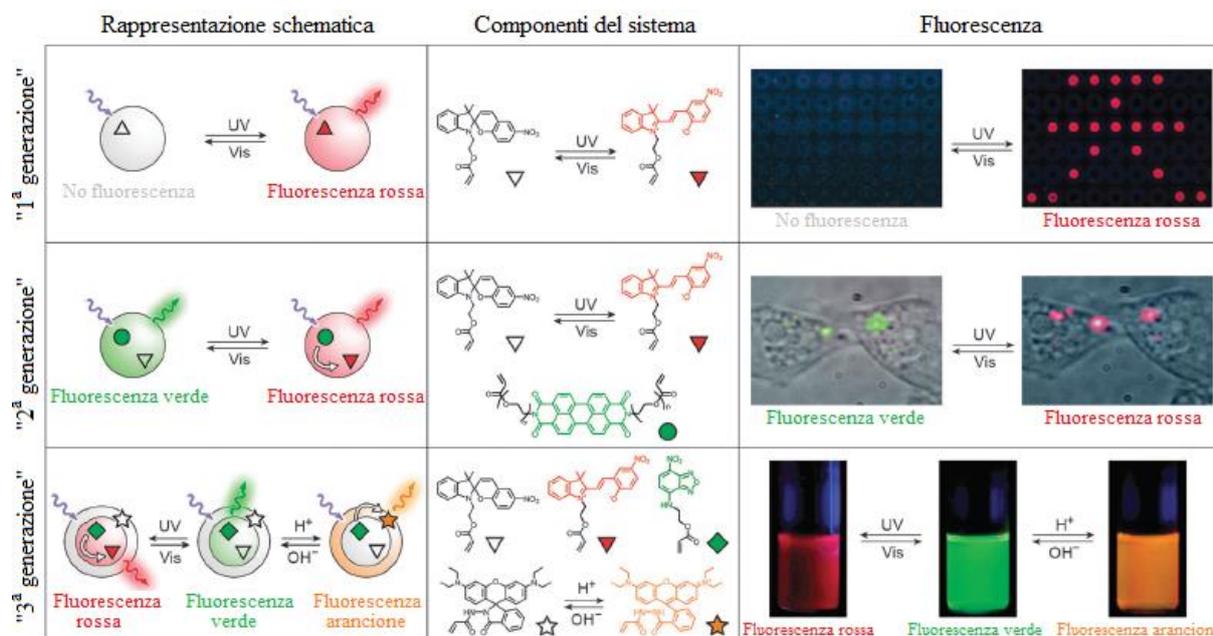


Figura 1.11 – Nanoparticelle polimeriche esibenti fluorescenza. In alto: nelle NPs di 1^a generazione la fluorescenza può essere attivata o disattivata in maniera reversibile. Al centro: NPs di 2^a generazione, nelle quali la forma MC emette a spese dell'emissione proveniente da un fluoroforo vicino^{78,79}. In basso: NPs di 3^a generazione, capaci di emettere luce a tre lunghezze d'onda diverse in risposta a diversi stimoli ambientali.

1.3.2.3 Fotocontrollo della complessazione di ioni metallici

Al contrario dell'isomero SP, quello MC ha la tendenza a legare diversi ioni metallici attraverso interazione con l'ossigeno del gruppo fenolato della forma zwitterionica della merocianina. Sebbene la forza di legame della singole molecole MC per i cationi metallici sia piuttosto debole, la stabilità del complesso può essere aumentata attraverso l'immobilizzazione delle unità di spiropirano ad un supporto, ad esempio, polimerico (figura 1.12).

Studi sulla chelazione fotoreversibile di cationi metallici bivalenti sono stati riportati per vari derivati dello spiropirano immobilizzati su diverse matrici, come superfici di elettrodi d'oro⁸⁰, copolimeri sintetici a base di N-isopropilacrilammide^{81,82} e di metacrilati^{83,84,85,86}.

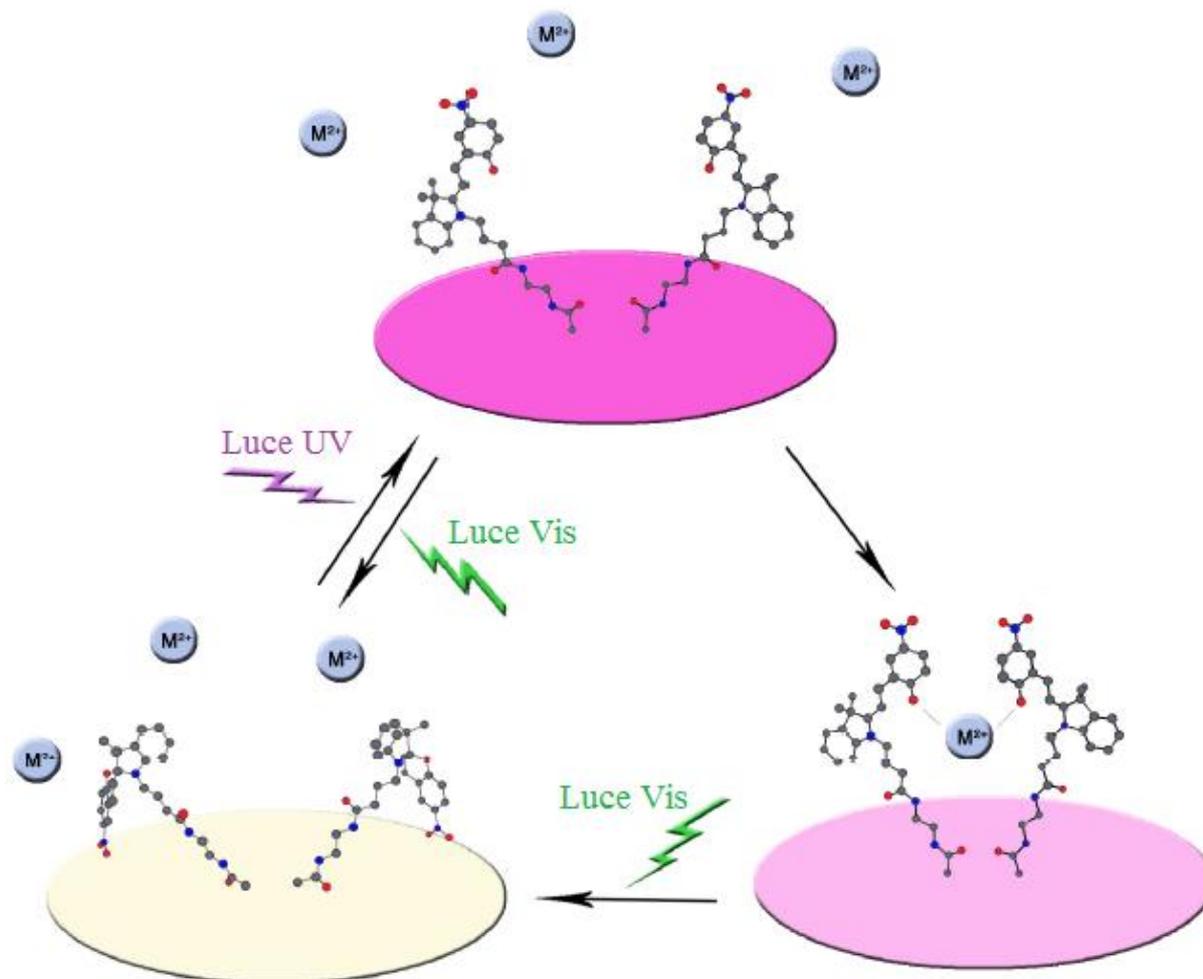


Figura 1.12 – Rappresentazione della complessazione foto-controllata e reversibile di cationi metallici a spirobenzopirani immobilizzati su una superficie otticamente trasparente. Gli ioni sono legati all'isomero MC e possono essere rilasciati dopo irraggiamento con radiazione visibile, con il ritorno dello spiropirano nella forma SP, inattiva.

L'immobilizzazione dello spiropirano su di un substrato è molto importante per ottenere sistemi con elevata selettività nei confronti di ioni diversi, in cui le peculiari proprietà ottiche dei complessi risultanti, sono di cruciale importanza per lo sviluppo di sensori ottici per la chimica analitica.

Infatti, la formazione del complesso spiropirano-ione metallico è accompagnata da un drastico cambiamento nel comportamento di assorbimento della forma merocianinica, risultando in uno spostamento ipsocromico o batocromico dei massimi delle bande di assorbimento. Un esempio di questo effetto è quello dello spiropirano legato al PMMA, che ha mostrato spettri di assorbimento UV-Vis differenti quando un film del polimero pre-irraggiato con luce UV veniva immerso in soluzioni di differenti ioni metallici^{87,88}, tra cui Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} (figura 1.13a). La selettività ionica può essere facilmente discriminata ad occhio nudo per

la maggior parte degli ioni metallici, come mostrato per supporti di vetro rivestiti con il polimero modificato (figura 1.13c).

Questa varietà di risposte ottiche può essere contrapposta al comportamento della corrispondente molecola MC non legata, la quale manca di tale selettività; per esempio, gli spettri UV-Vis dei complessi MC-Zn²⁺, MC-Co²⁺ e MC-Ni²⁺ sono risultati tutti indistinguibili tra loro (figura 1.13b).

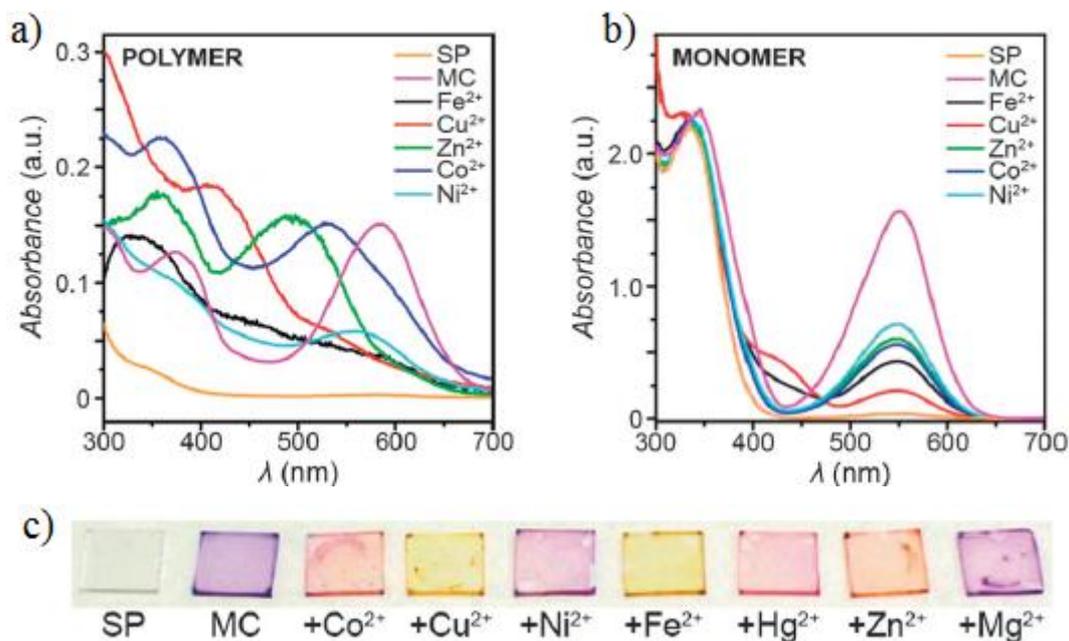


Figura 1.13 – Spettri UV-Vis di (a) film di poli(MMA₉₀-co-SPMA₁₀) e (b) del monomero SPMA in presenza di differenti ioni metallici bivalenti; (c) Vetrini rivestiti di polimero fotosensitivo prima (SP) e dopo (MC) irraggiamento con luce UV, e dopo esposizione di quest'ultimo ad una serie di ioni metallici in soluzione.

E' importante sottolineare che la merocianina deve legare gli ioni metallici in modo blando, affinché il processo sia reversibile. Tuttavia, se l'energia di interazione è troppo debole, nessuno dei due isomeri riuscirebbe a legare i cationi; al contrario un'interazione troppo forte renderebbe il legame irreversibile⁸⁹.

In aggiunta alle capacità di rilevamento, il legame dei cationi metallici con lo spiropirano ha altre interessanti implicazioni. Per esempio, la complessazione foto-controllata degli ioni Zn²⁺ ha determinato una modulazione reversibile della conducibilità ionica quando delle unità tioliche funzionalizzate con lo spiropirano sono state immobilizzate sulla superficie di elettrodi d'oro⁸⁰ (figura 1.14). La variazione del potenziale dell'elettrodo è il risultato della trasformazione della forma SP in quella MC a seguito dell'irraggiamento con luce UV.

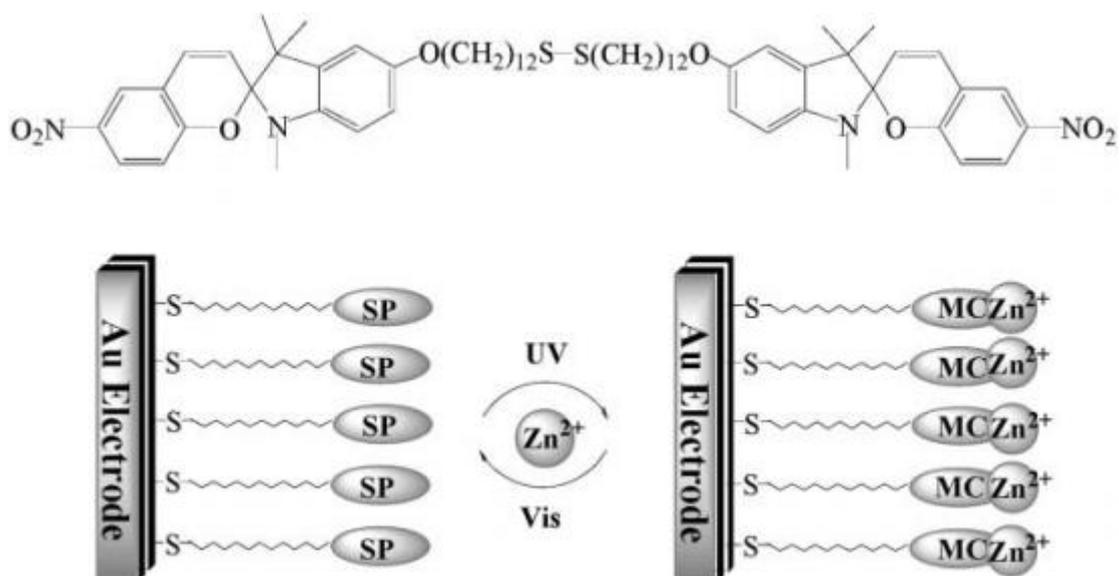


Figura 1.14 – (a) Struttura dell'unità tiolica derivatizzata con uno spirobenzopirano; (b) Illustrazione del processo reversibile di trasformazione dell'isomero SP in quello MC a seguito dell'esposizione alla radiazione UV e coordinazione degli ioni Zn^{2+} , sulla superficie di un elettrodo d'oro.

1.3.2.4 Fotocontrollo della bagnabilità di una superficie

Il passaggio da una struttura non carica ad una zwitterionica determina anche un'altra serie di proprietà non cromatiche, che derivano dal fatto che le due forme hanno diverse caratteristiche chimico-fisiche, come diversa carica, polarità e conformazione molecolare.

La più ovvia manifestazione della variazione di polarità di una superficie è il cambiamento delle sue proprietà di bagnabilità.

La ricerca nel campo delle superfici con proprietà modulabili è motivata in parte dalla ricerca di nuovi ed efficaci modi per dirigere il movimento di liquidi nei sottili canali dei dispositivi microfluidici.

E' stato dimostrato che rivestendo una superficie di vetro con un coating polimerico funzionalizzato con lo spiropirano si ottiene una superficie fotoresponsiva le cui proprietà di bagnabilità possono essere modulate esternamente usando la radiazione luminosa^{90,91,92}.

Quando la superficie del vetro su cui è poggiata una goccia d'acqua (solvente polare) viene irraggiata con luce UV, si ha una riduzione dell'angolo di contatto di circa 14° , che indica un aumento della bagnabilità dovuta al passaggio dalla forma SP, apolare, e quella MC, polare^{90,91} (figura 1.15).

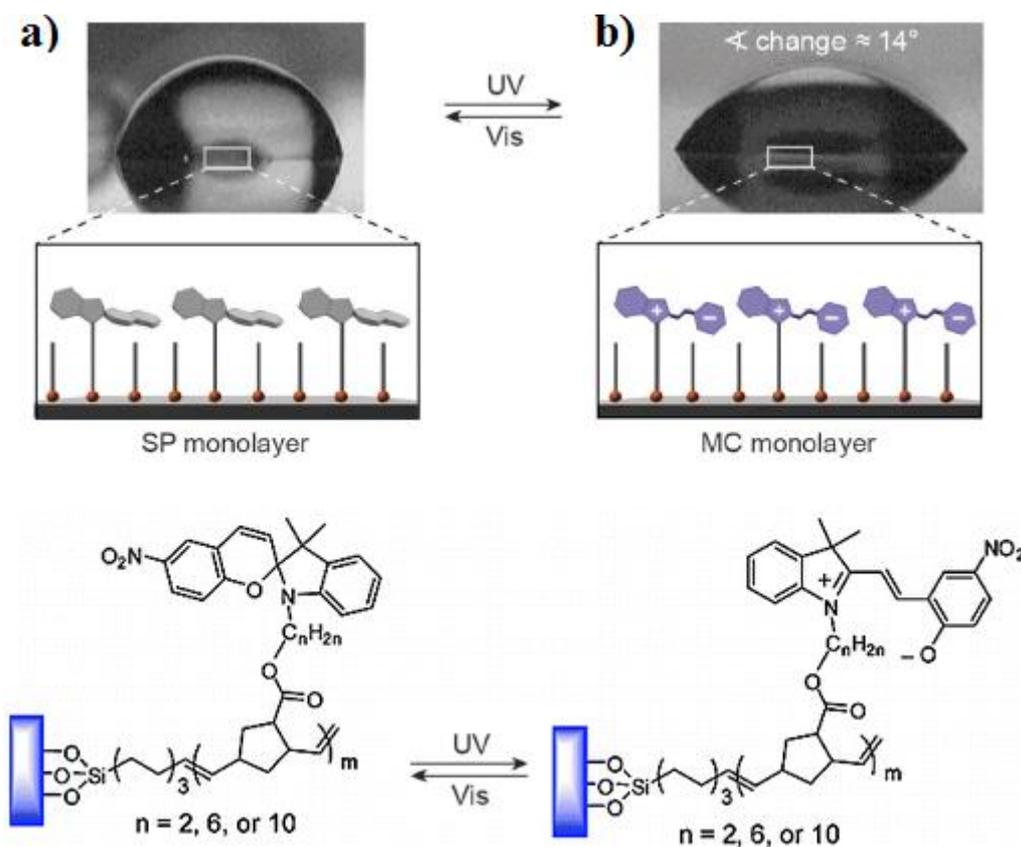


Fig. 1.15 – Goccia d’acqua su una superficie fotoresponsiva (a) prima e (b) dopo irraggiamento con luce UV.

Applicando una chimica analoga a quella dell’esempio precedente, sono stati ottenuti dei capillari di vetro funzionalizzati con lo spiropirano attraverso i quali il livello verticale dell’acqua in essi contenuta veniva modificato, irraggiando i tubini con luce UV⁹⁰ (figura 1.16). Per capillari di 500 μm di diametro è stata osservata una risalita del livello dell’acqua di 2,8 mm a seguito dell’irraggiamento.

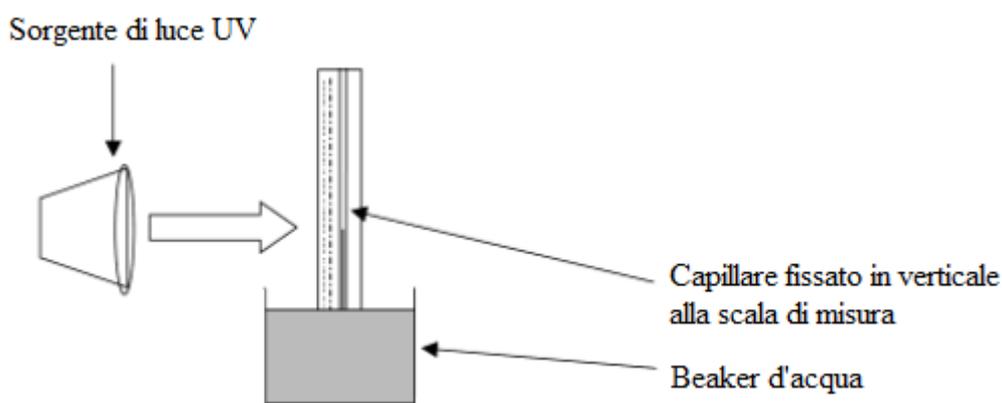


Fig. 1.16 – Setup sperimentale per la misura della risalita d’acqua all’interno di un capillare modificato con lo spiropirano.

1.3.2.5 Fotocontrollo della variazione di volume di un idrogel polimerico

La microfluidica è una tecnologia chiave per lo sviluppo di sistemi analitici integrati su microchip. Uno dei componenti principali per la realizzazione di questi dispositivi sono le microvalvole.

Una microvalvola controllata mediante l'utilizzo di una radiazione luminosa rappresenta una delle più interessanti componenti per la manipolazione di fluidi, in quanto la luce consente di operare senza alcun contatto e, inoltre, l'irraggiamento localizzato permette la manipolazione di più fluidi in maniera indipendente.

Sumaru e i suoi collaboratori hanno aperto la strada all'utilizzo di idrogel di Poli(N-isopropilacrilammide) modificati con molecole di spirobenzopirano come componenti principali di microvalvole azionate dalla luce^{93,94,95}.

Questi gel contengono spiropirano nella sua forma protonata (MCH^+) e possono essere deidratati per esposizione alla luce blu (visibile), innescando la chiusura dell'anello e il collasso della struttura del polimero, provocandone la contrazione. Un esempio di questo processo è mostrato in figura 1.17a, dove l'area superficiale di un pezzo di gel di forma circolare, irraggiato con luce visibile, si riduce di circa la metà. Il polimero fotoresponsivo può essere depositato in una regione di interesse, come quella degli stretti canali dei dispositivi microfluidici basati su polidimetilsilossano, attraverso una polimerizzazione radicalica in situ, indotta dalla radiazione UV, di una miscela contenente NIPAM, un monomero contenente lo spiropirano, un agente reticolante ed un iniziatore⁹³. La figura 1.17b mostra come tre valvole, separate da meno di 2 mm l'una dall'altra, possono essere aperte indipendentemente irraggiandole localmente con una luce visibile blu di bassa intensità ($20 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) per meno di 30 secondi. Sebbene queste valvole possano essere aperte tramite un leggero riscaldamento, solo l'uso della luce permette ad ogni valvola di essere attivata individualmente.

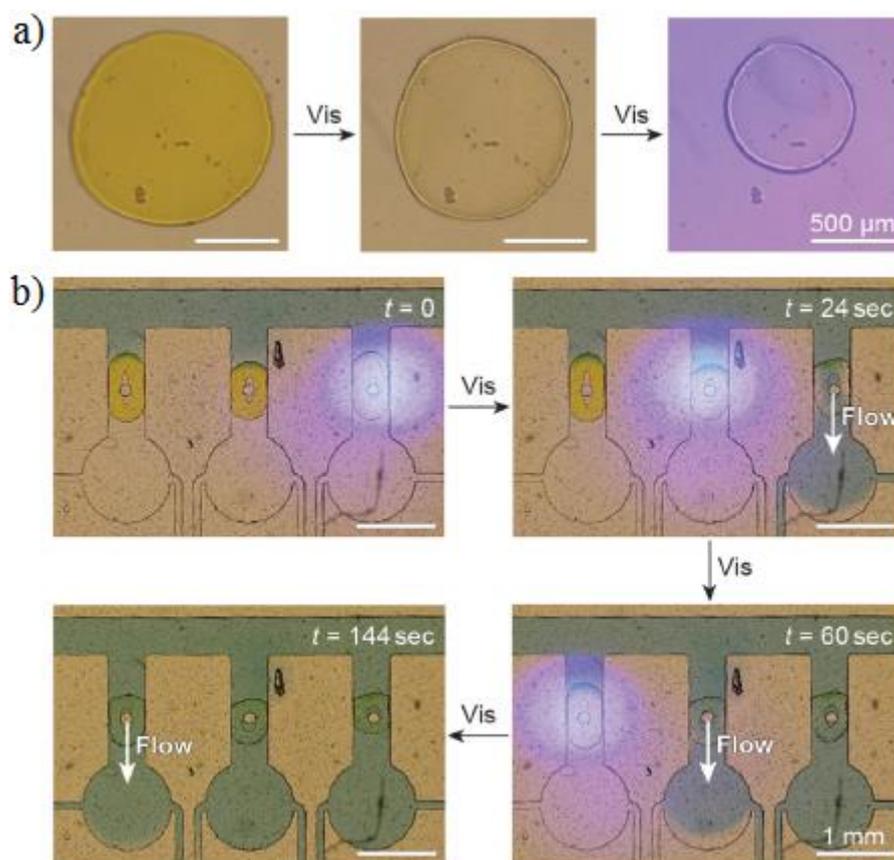


Fig. 1.17 – (a) Contrazione di un gel di poli(NIPAM–SP) indotta dalla luce visibile; (b) Controllo remoto del flusso di liquido all’interno di microcanali in polidimetilsilossano, tramite apertura di microvalvole in poli(NIPAM–SP) a seguito di irraggiamento con luce visibile.

1.3.3 Biopolimeri funzionalizzati con spirobenzopirani

La funzionalizzazione di biomacromolecole prodotte in natura con molecole fotoresponsive artificiali apre la strada all’interessante possibilità di influenzare vari processi biologici usando la luce. Nell’ambiente altamente polare come quello dei sistemi biologici, lo spiropirano esiste nella forma MC e l’isomerizzazione verso la forma SP può essere realizzata mediante la luce visibile, mentre la retro-isomerizzazione avviene spontaneamente. Il fotocromismo negativo rappresenta un grande vantaggio, consentendo di realizzare il processo di isomerizzazione reversibile senza l’uso della radiazione UV, uno stimolo potenzialmente dannoso per quanto riguarda i sistemi biologici, e che induce fatica in misura molto maggiore della radiazione visibile.

1.3.3.1 Fotocontrollo della conformazione di proteine

L'incorporazione di molecole fotoresponsive all'interno di proteine può, in teoria, permettere il controllo reversibile della loro struttura e funzione, attraverso l'utilizzo di stimoli esterni.

Polipeptidi fotoresponsivi contenenti spirobenzopirani sono stati preparati per la prima volta da Ciardelli e i suoi collaboratori legando covalentemente le unità fotocromiche di spiropirano all'acido poli-L-glutammico^{96,97}. In esafluoro-2-propanolo il polipeptide funzionalizzato adotta una conformazione cosiddetta *random coil* colorandosi di rosso, segno che lo spiropirano in tale solvente si trova nella sua forma aperta, polare. Lo studio in soluzione di tale sistema ha portato a concludere che l'isomerizzazione dalla forma aperta a quella chiusa dello spiropirano, innescata dalla radiazione visibile, induce una transizione della struttura del polipeptide dalla conformazione *random coil* ad una α -elica (figura 1.18). Il colore e la conformazione iniziale erano ripristinati spegnendo la luce e il processo poteva essere ripetuto per molti cicli.

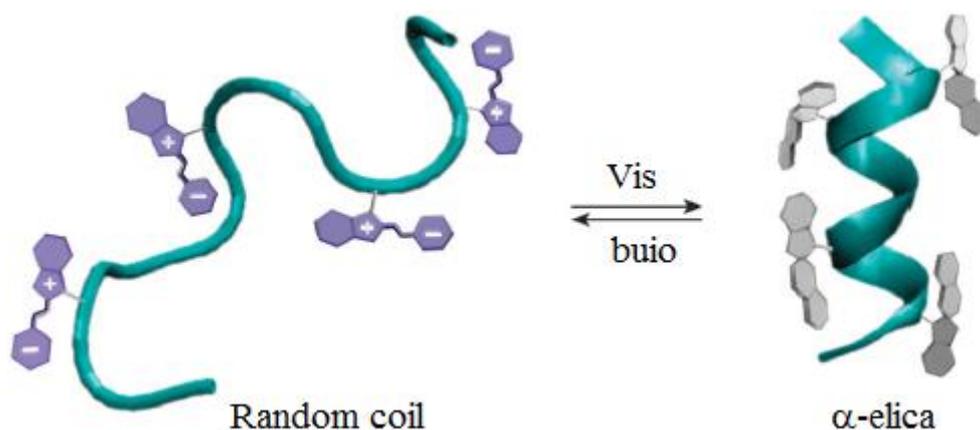


Figura 1.18 – Rappresentazione schematica del cambiamento conformazionale di un polipeptide indotto dalla luce.

E' importante sottolineare che l'isomero SP non stabilizza la conformazione ad elica – infatti l'acido poli-L-glutammico nativo assume una struttura ad α -elica in condizioni analoghe – piuttosto, essa è perturbata dall'isomero MC. Il meccanismo secondo il quale l'isomero merocianina destabilizza l' α -elica è stato oggetto di dibattito; tuttavia sembrano giocare un ruolo fondamentale le interazioni tra le molecole MC. Queste interazioni possono essere sia attrattive che repulsive a seconda che la merocianina sia, rispettivamente, nella sua forma zwitterionica o protonata.

Le variazioni conformazionali fotoindotte non sono limitate solo all'acido poli-L-glutammico; per esempio la poli-L-lisina, un altro polipeptide con la tendenza ad assumere conformazione ad elica, ha mostrato un analogo comportamento^{98,99}.

In generale, per questi sistemi, uno stimolo esterno come la luce di una lunghezza d'onda selezionata, attiva il comportamento responsivo del cromoforo, risultando in un complesso cambiamento strutturale che coinvolge non solo il cromoforo stesso, ma che si propaga all'intera catena proteica. Come conseguenza, le proprietà della proteina (in termini di proprietà di trasporto, adesione cellulare e reattività) possono essere modulate o regolate tra uno stato attivo e uno inattivo.

1.3.3.2 Fotoregolazione dell'attività enzimatica

L'incorporazione di unità fotoresponsive su determinate proteine o enzimi può indurre una foto-stimolazione della loro attività biocatalitica.

Biocatalizzatori con proprietà fotoregolabili hanno molte potenziali applicazioni, che derivano principalmente dalla possibilità di controllare l'attività enzimatica con alta precisione spaziale e temporale. Queste applicazioni includono: diagnostica, biosensoristica, opto-bioelettronica, separazione per affinità e terapia fotodinamica contro il cancro.

La ricerca in questo settore ha avuto come pionieri Suzuki e i suoi collaboratori, i quali hanno dimostrato due diverse modalità di fotoregolazione dell'attività enzimatica, basate entrambe su spirobenzopirani immobilizzati. Gli studi iniziali basati su questo approccio risalgono già al 1975 e riguardano l'enzima α -amilasi^{100,101}. L' α -amilasi, l'enzima che catalizza l'idrolisi dei legami 1,4- α -glucosidici in oligosaccaridi e polisaccaridi, è stato funzionalizzato con un derivato dello spiropirano, e la soluzione della risultante proteina aveva un colore rosso, stando ad indicare che lo spiropirano era nella forma MC. Come ci si poteva aspettare, la modificazione fece diminuire significativamente (del 64%) l'attività enzimatica rispetto all'enzima nativo; tuttavia molto importante fu il fatto che esponendo la soluzione alla luce visibile l'attività enzimatica si riduceva di un altro 18-36%. Quando veniva lasciata al buio, la proteina riguadagnava la sua attività iniziale (figura 1.19a).

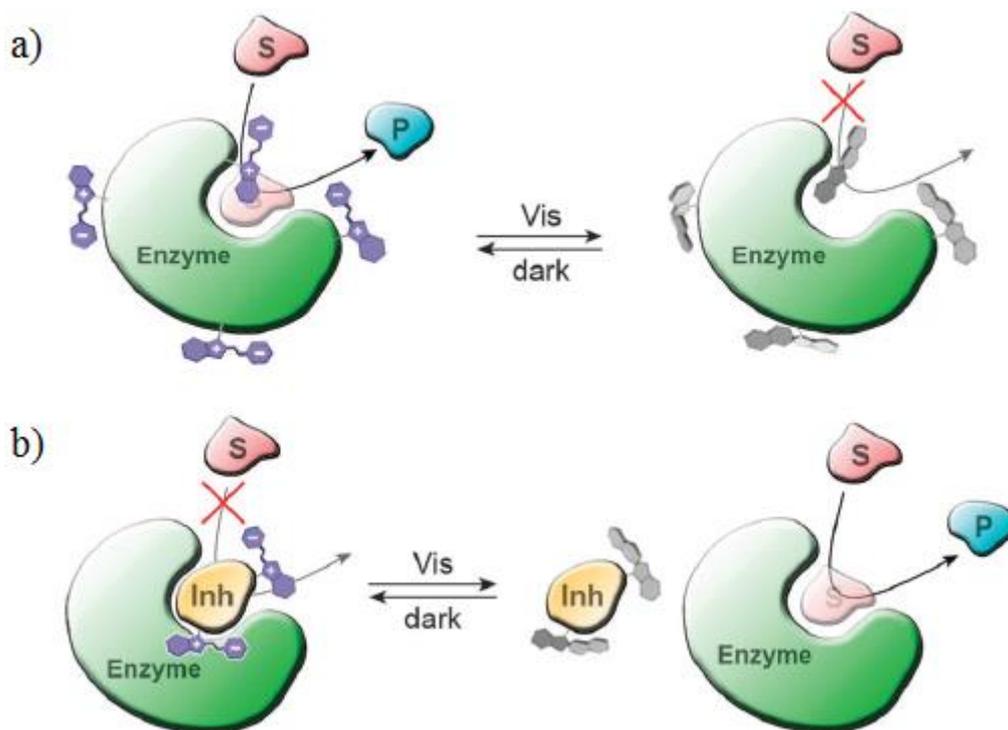


Fig. 1.19 – Catalisi fotocontrollata usando biopolimeri funzionalizzati con spirobenzopirani. (a) Rappresentazione schematica di catalisi fotocontrollata di enzimi modificati; (b) Un altro approccio di biocatalisi fotoregolata basata su inibitori macromolecolari modificati.

L'effetto dell'isomerizzazione sull'attività enzimatica è difficile da predire a priori; ad esempio la β -glucosidasi (un altro enzima addetto all'idrolisi di polisaccaridi) modificata risulta più attiva quando i residui di spiropirano sono nella forma chiusa¹⁰².

Un meccanismo secondo il quale i gruppi MC disattivano gli enzimi a cui sono legati potrebbe essere basato sulla perturbazione della conformazione attiva della proteina a causa di interazioni intramolecolari attrattive MC–MC (o repulsive $MCH^+–MCH^+$).

La seconda strategia di manipolazione dell'attività enzimatica tramite la luce è basata su inibitori fotosensibili, la cui affinità agli enzimi nativi dipende dalla radiazione elettromagnetica alla quale vengono esposti¹⁰³. Per esempio l'ovomucoide, una proteina anche conosciuta come inibitore tripsina, se funzionalizzata con lo spiropirano ha mostrato un effetto di inibizione più marcato rispetto a quello ottenuto quando veniva irraggiata con luce visibile¹⁰⁴; ciò indica che quando lo spiropirano è nella forma aperta, l'inibitore interagisce in maniera maggiore di quanto non succeda quando invece è in forma chiusa (figura 1.19b). Questa differenza è stata attribuita alla stabilizzazione elettrostatica del complesso enzima–inibitore·MC.

1.3.3.3 Polisaccaridi fotoresponsivi

I polisaccaridi sono biopolimeri che comprendono una ampia gamma di varietà strutturali e presentano notevoli caratteristiche di versatilità pratica. Grandi quantità di polisaccaridi sono biosintetizzate da diversi organismi. Questi biopolimeri possono essere usati per sviluppare materiali avanzati, grazie alla loro straordinaria capacità di riorganizzazione strutturale mediante interazioni supramolecolari di vario tipo e la possibilità di migliorarne determinate caratteristiche tramite modifica chimica.

Vari cromofori sono stati legati covalentemente a diversi polisaccaridi per una serie di obiettivi, in particolare per lo sviluppo di sonde, sensori e fotosensibilizzatori, ossia molecole che assorbono energia da una radiazione elettromagnetica (tipicamente UV o visibile) e la trasferiscono ad un'altra molecola vicina provocandone un cambiamento chimico o l'eccitazione elettronica. Le strategie di sintesi comunemente usate sono basate principalmente su esterificazione, eterificazione, ossidazione e, più recentemente, su reazioni di “click”¹⁰⁵. Qui l'attenzione è rivolta a materiali in cui il comportamento del cromoforo è influenzato dalla struttura del polisaccaride e, viceversa, la fotorisposta del cromoforo influenza l'organizzazione del polisaccaride. Un esempio in tal senso è fornito dal destrano modificato con spiropirano, che dà separazione di fase fotoindotta in acqua, a causa della forte variazione di polarità del cromoforo quando irraggiato con luce UV¹⁰⁶. Fotocromismo inverso è stato osservato in acqua acida, dovuto alla stabilizzazione della merocianina per protonazione (figura 1.20). Quest'ultima tornava indietro alla forma chiusa dello spiropirano se esposta a luce visibile. A pH neutro, non si verifica alcuna stabilizzazione e, di conseguenza, il polisaccaride coagula, come risultato dell'idrofobicità delle molecole di spiropirano in forma chiusa.

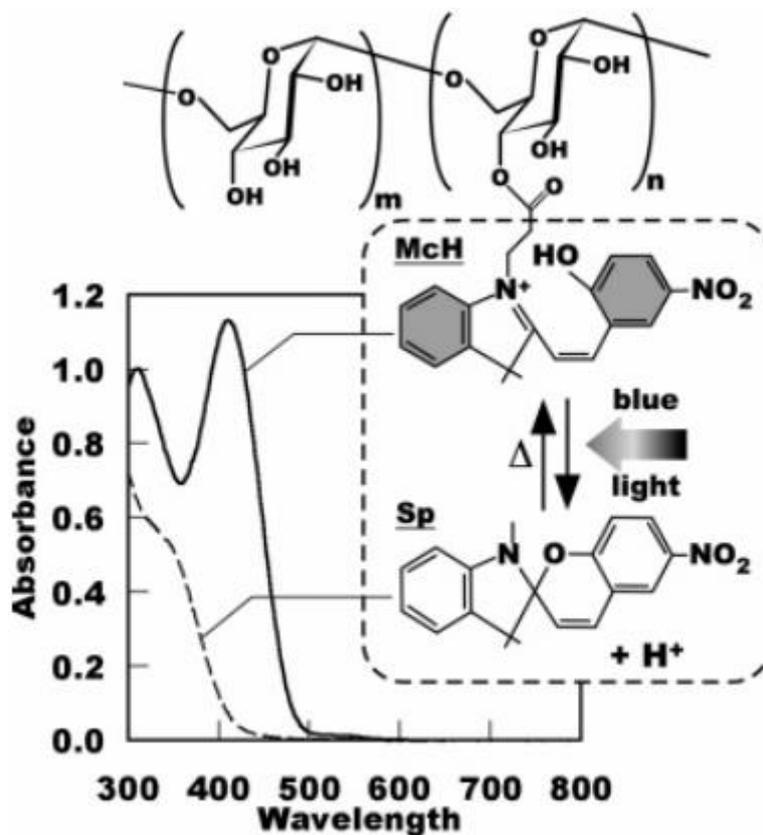


Figura 1.20 – *Struttura chimica del destrano modificato al 30% in peso con molecole di spiropirano e schema della fotoisomerizzazione, con relativi spettri di assorbimento UV-Vis in una soluzione acquosa 3 mM di HCl.*

La struttura dei polisaccaridi è caratterizzata da uno scheletro rigido e, nei casi più comuni, di unità piranosiche concatenate 1→4, e da tre siti adatti per la funzionalizzazione, ognuno con diversa mobilità conformazionale: la posizione 6 con più alta mobilità, e le posizioni 2 e 3 con mobilità più bassa. Questa peculiarità sembra efficace nello stabilizzare la forma meno stabile della specie cromofora senza impedirne l'isomerizzazione. Così, molecole di spiropirano covalentemente legate ad un qualsiasi gruppo idrossilico della metilcellulosa o dell'acetato di cellulosa subiscono isomerizzazione reversibile quando irraggiate con luce UV e successivamente con luce visibile. Tuttavia, a differenza di quanto succede in soluzione, dove la forma MC ha un tempo di vita di pochi secondi o minuti, essa all'interno di film solidi di cellulosa^{107,108} è stabilizzata e dura 1 o 2 ore. Inoltre, nei film, la presenza della specie zwitterionica dà luogo ad un incremento della loro bagnabilità, rilevabile da misure di angolo di contatto.

Allo stesso modo, la possibilità di adattare meglio la merocianina in una geometria spaziale stabile, grazie alla mobilità della posizione C6, ha determinato una elevata stabilizzazione

della forma colorata (più di due mesi a temperatura ambiente) in film solidi di chitosano funzionalizzato regioselettivamente con molecole di spiropirano nella posizione 6⁶⁴.

Uno studio ancora più recente ha mostrato come l'incorporazione covalente di molecole di spiropirano all'interno di un pulp di cellulosa¹⁰⁹ aumenti la fluorescenza del fluoroforo di un ordine di grandezza rispetto alla molecola non legata, stabilizzandone addirittura l'emissione, la cui intensità non diminuisce nel tempo (come succede generalmente per i materiali fluorescenti organici) ma, al contrario, aumenta leggermente con il prolungarsi del tempo di conservazione del campione al buio. Tale insolito lieve incremento può essere assegnato all'elevata polarità dell'ambiente costituito dalla matrice di cellulosa, in cui la forma MC è più stabile. Con il passare del tempo di stoccaggio al buio, la forma SP isomerizza gradualmente in quella MC, determinando in questo modo un aumento di intensità di fluorescenza, dovuta alla merocianina.

1.4 POLISACCARIDI: UNA GRANDE VARIETA' DI STRUTTURE E FUNZIONALITA'

I polisaccaridi, o glicani, sono carboidrati polimerici composti da unità glicosidiche. La maggior parte di loro si trova in natura, ed è degno di nota che i carboidrati rappresentino il 75% della produzione mondiale annua di biomassa (intorno a 170 miliardi di tonnellate)¹¹⁰. Tra di essi, la cellulosa, la chitina e l'amido sono i più abbondanti nella biosfera¹¹¹. I polisaccaridi giocano ruoli importanti in natura, come la funzione strutturale in piante (cellulosa, pectina) ed animali (chitina) e la funzione di riserva energetica (amido e glicogeno). Inoltre, nei tessuti connettivi degli animali, i glicosaminoglicani (polisaccaridi anionici) hanno le funzioni di regolazione dell'elasticità e della migrazione di acqua e cationi da e all'interno delle cellule.

Altri polisaccaridi anionici (alginati, carragenani e pectine) agiscono come matrici extracellulari nelle piante.

Inoltre, oligo- e poli- saccaridi sono spesso associati in strutture ibride con proteine (glicoproteine, proteoglicani), peptidi (peptidoglicani) e lipidi (glicolipidi) in modo da modulare il bilancio idrofilico/idrofobico di queste macromolecole e le loro funzioni biochimiche.

In aggiunta, alle catene dei polisaccaridi sono attribuiti ruoli specifici nell'adesione e nel riconoscimento cellulare¹¹².

Le unità ripetitive dei polisaccaridi hanno una grande varietà in termini di *gruppi funzionali* (figura 1.21), in quanto possono avere o solo funzionalità idrossiliche (es. glucosio, mannosio e galattosio) oppure possono essere resi acidi mediante la presenza di gruppi carbossilici (es. acido glucuronico, mannuronico e galatturonico) o gruppi solfati (es. condroitin-4-solfato, condroitin-6-solfato e dermatan solfato), o basici come la glucosamina e la galattosamina, dove i gruppi –OH in posizione C2 sono sostituiti da un'ammina, generalmente acetilata o solfonata.

Inoltre, i polisaccaridi possono essere composti da un singolo tipo di unità glicosidica (*omoglicani*), come nel caso dei glucani, i polimeri del D-glucosio (es. cellulosa, amido, glicogeno, destrano,...) o da due a sei differenti tipi di unità glicosidiche (*eteroglicani*) nella forma di copolimeri alternati (carragenani, glicosaminoglicani) o copolimeri a blocchi (alginati).

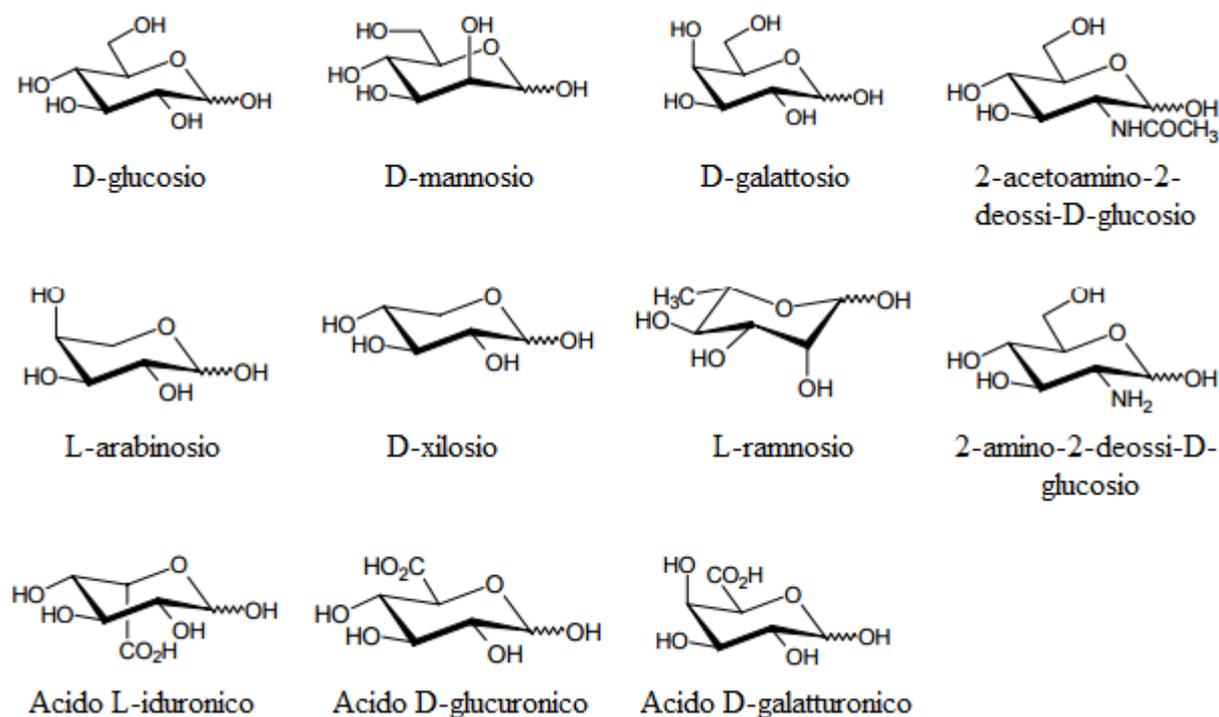


Figura 1.21 – Principali unità ripetenti dei polisaccaridi.

I monomeri ciclici alifatici nei polisaccaridi sono legati attraverso legami acetalici, detti glicosidici; le catene risultanti sono caratterizzate da *terminazioni riducenti e non riducenti* (figura 1.22).

L'unità terminale riducente contiene un gruppo aldeidico in forma libera o in forma emiacetalica, le quali in soluzione acquosa sono sempre in equilibrio. In tutte le altre terminazioni l'atomo di carbonio in posizione 1 (carbonio anomero) è coinvolto nel legame glicosidico e, quindi, queste sono terminazioni non riducenti.

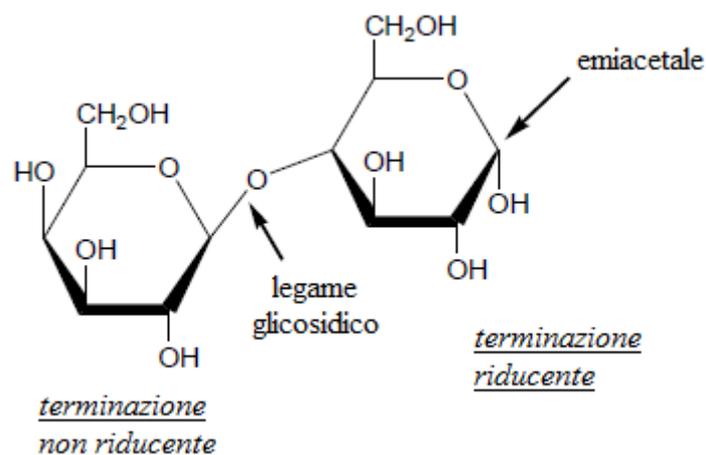


Figura 1.22 – *Terminazione riducente e non riducente nel disaccaride β -D-galattopiranosil- α -D-glucopiranosio.*

La posizione e il numero dei legami glicosidici formati da ogni unità ripetente monosaccaridica ovviamente influenza la struttura del polisaccaride, in quanto può portare a catene lineari o ramificate. Le ramificazioni possono essere formate da singole unità monomeriche, come per gli scleroglucani e alcuni galattomannani, o possono essere estese, come per l'amilopectina ed il glicogeno. Strutture intermedie, dove ramificazioni oligomeriche sono connesse alla catena principale, sono frequenti in alcuni polisaccaridi batterici¹¹³. La posizione dei legami glicosidici influenza la struttura polisaccaridica anche in termini delle possibili conformazioni di catena. Infatti, essendo le unità cicliche (piranosiche o furanosiche) relativamente rigide, la flessibilità del polimero è essenzialmente dovuta alla possibile rotazione dei monomeri attorno ai legami glicosidici. Così, per esempio, nel caso del legame 1→6 glicosidico, tipico dei siti di ramificazione, c'è un maggior grado di libertà in confronto al più comune legame 1→4, dovuta alla possibile rotazione intorno tre legami invece di due (Figura 1.23). Questo risulta in un alto numero di possibili conformazioni per i polisaccaridi che hanno entrambi i legami 1→4 e 1→6.

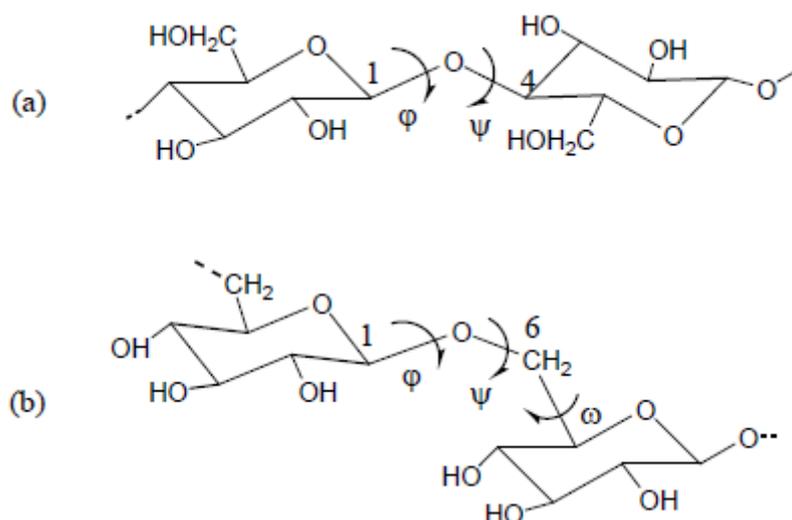


Figura 1.23 – Gradi di libertà per le unità legate da (a) legame 1→4 e (b) 1→6.

La conformazione delle catene dei polisaccaridi sono influenzate anche dalla configurazione degli atomi di carbonio, particolarmente quello in posizione 1 (α o β). Per esempio, le catene glucaniche “generate” dai calcoli di energia conformazionale¹¹⁴ corrispondono a strutture elicoidali strette per le catene connesse tramite legame β 1→4, mentre una struttura elicoidale più larga è originata da catene connesse tramite legame α 1→4. Le conformazioni calcolate sono ragionevolmente coerenti con le conformazioni reali dei polisaccaridi e suggeriscono anche le loro funzioni biochimiche, in quanto i polisaccaridi β 1→4 hanno funzioni protettiva e strutturale (es. cellulosa), mentre i polisaccaridi con funzione di immagazzinamento (es. amido) hanno struttura elicoidale larga, la quale facilita l’accessibilità degli enzimi. Specifiche conformazioni di catena sono determinate non solo da interazioni di Van der Waals tra atomi e gruppi funzionali di unità adiacenti. Infatti, i legami a idrogeno svolgono un ruolo fondamentale nella stabilizzazione delle conformazioni di catena e delle strutture sopramolecolari dei polisaccaridi, creando stabili interazioni intra- e inter- molecolari.

Le caratteristiche che sono state menzionate finora rappresentano solo un breve elenco di caratteristiche importanti, volte a sottolineare le notevoli differenze tra polisaccaridi in termini di strutture e funzioni, in quanto una descrizione più dettagliata va oltre lo scopo di questa introduzione.

Considerando questa diversità strutturale e versatilità funzionale dei polisaccaridi unita alla loro abbondanza, non è sorprendente che essi siano stati sfruttati per innumerevoli applicazioni industriali. Polisaccaridi non modificati sono usati principalmente nel settore tessile, della carta e nell’industria alimentare^{115,116}. La variazione delle proprietà chimico-fisiche e reologiche indotte dalle modificazioni chimiche espande enormemente i loro campi

di applicazione ai rivestimenti, ai detergenti, ai cosmetici, al trattamento delle acque reflue e alla perforazione petrolifera^{115,117,118}.

Di grande importanza sono anche le applicazioni in campo biomedico e farmaceutico¹¹⁹ soprattutto per la loro idoneità nel rilascio controllato di farmaci e nell'ingegneria tissutale, ma anche per l'attività biologica di alcune di queste biomacromolecole¹²⁰.

1.5 L'AMIDO

L'amido è un polisaccaride molto importante dal punto di vista biologico poiché costituisce il materiale di riserva dei vegetali e di nutrimento di molti animali.

È un polimero del glucosio sintetizzato dalle piante verdi, largamente distribuito in diverse parti della pianta, ma concentrato soprattutto nei semi, nei frutti e nei tuberi.

L'amido è formato per il 20-30% da amilosio e per il 70-80% da amilopectina. L'amilosio è un polimero lineare costituito da unità ripetenti di α -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosio. Le catene di amilosio si dispongono ad α -elica sinistrorsa (figura 1.24) grazie ai legami ad idrogeno intramolecolari fra gruppi idrossilici di anelli piranosici spazialmente vicini¹²¹. L'amilopectina differisce dall'amilosio perché possiede delle ramificazioni α -(1 \rightarrow 6) ogni circa 20 residui glucopiranosidici le quali sono orientate radialmente. Ne risulta che il suo raggio cresce all'aumentare del numero di ramificazioni. L'amilopectina non possiede conformazioni preferenziali fisse. Le ramificazioni impediscono la formazione di una struttura elicoidale mentre permettono la creazione di strutture reticolari spugnose (figura 1.25).

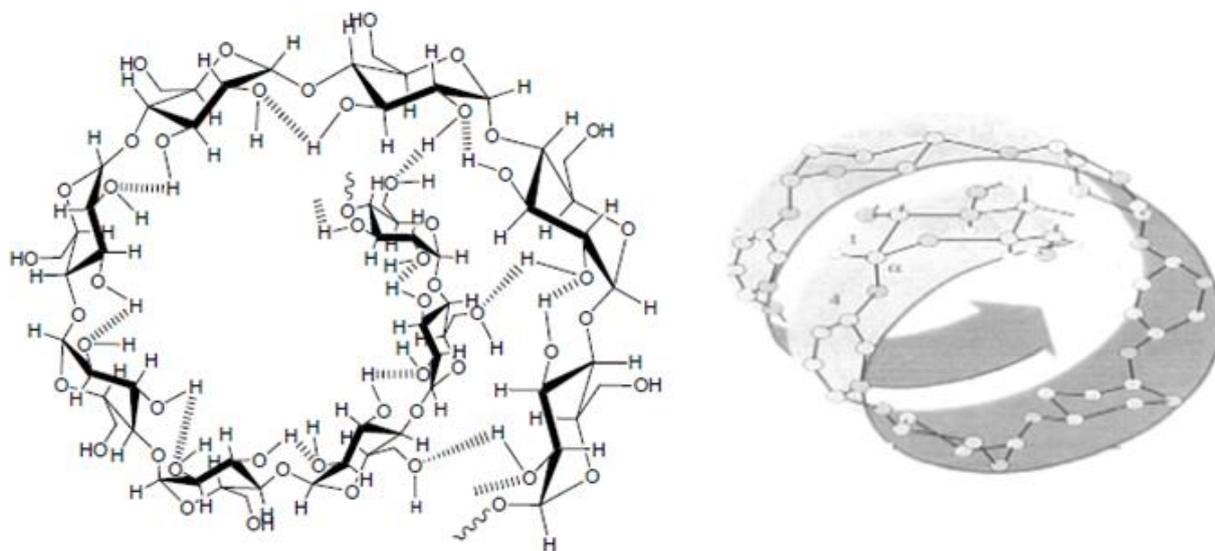


Figura 1.24 – Amilosio in conformazione ad α -elica.

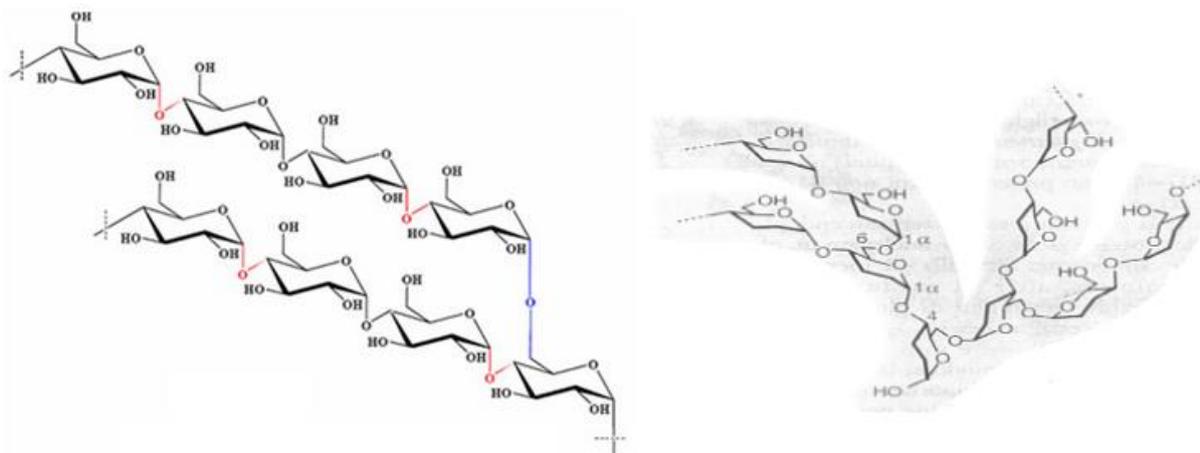


Figura 1.25 – *Struttura dell'amilopectina.*

Nonostante l'elevato numero di gruppi ossidrilici idrofili, l'amilosio non è solubile in acqua; l'ordine strutturale, dovuto ai legami ad idrogeno intra- e inter- molecolari, non permette alle molecole d'acqua di disciogliere questo polisaccaride nonostante esso possa comunque rigonfiarsi.

L'amilopectina è, invece, solubile in acqua¹²², infatti le ramificazioni comportano un alternarsi di zone cristalline ed amorfe, e questo maggior disordine strutturale permette all'amilopectina di solubilizzarsi. La diversa solubilità dell'amilosio e dell'amilopectina è facilmente spiegabile in termini termodinamici. La formazione di una soluzione comporta un aumento di disordine ed il termine entropico $T\Delta S^M$ è quindi sempre favorevole a tale formazione. Al contrario, il ΔH^M può essere negativo, nullo o positivo, come nel caso in cui si debba rompere un reticolo cristallino. In quest'ultimo caso la solubilizzazione è possibile solo se l'aumento entalpico viene superato in valore assoluto dal contributo entropico.

Tenendo conto di ciò, è evidente che la struttura altamente ordinata dell'amilosio porterebbe ad una variazione svantaggiosa di entalpia rispetto al guadagno entropico in soluzione, mentre il grado di amorfismo presente nell'amilopectina è sufficiente affinché la somma algebrica dei contributi entalpico ed entropico risulti in una variazione negativa dell'energia libera.

1.6 LA REAZIONE DI “CLICK” PER LA MODIFICA DEI POLISACCARIDI

Il termine “click chemistry” fu originariamente coniato in senso generico per indicare reazioni facili da condurre, aventi resa elevata e tolleranti all'ossigeno e all'acqua.

Inoltre, per far parte della “click chemistry”, come definito da Sharpless e dai suoi collaboratori nel 2001¹²³, una reazione deve (o dovrebbe, idealmente): essere modulabile e versatile; essere stereospecifica; non dare alcun sottoprodotto o, al più, prodotti secondari inoffensivi; avere una “driving force” termodinamica elevata ($-\Delta G_{\text{reaz.}} > 80 \text{ kJ/mol}$) per favorire una reazione rapida e completa; essere efficiente dal punto di vista dell'economia atomica. Infine, la reazione deve avvenire in condizioni blande, utilizzare materiali di partenza e reagenti facilmente reperibili, non richiedere l'uso di solventi o quanto meno richiedere solventi non dannosi e facilmente rimovibili (preferibilmente acqua), portare a prodotti finali facilmente isolabili con tecniche di purificazione semplici.

Sebbene soddisfare tutti questi requisiti sia molto difficile, numerosi processi tra cui alcune reazioni nucleofile di apertura di anello, di addizione ai legami multipli carbonio-carbonio e di cicloaddizione sono state individuate come possibili esempi che soddisfano i requisiti indicati.

Tra queste, una reazione in particolare è stata usata così frequentemente da essere spesso definita semplicemente “click reaction”. Si tratta della variante catalizzata dal rame(I) della cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen (figura 1.26) tra un'azide e un alchino terminale (CuAAC) a dare un 1,2,3-triazolo. Di fatto, fu il lavoro quasi simultaneo di due gruppi di ricerca^{124,125} che riportarono l'uso del rame(I) per rendere la reazione più veloce e regioselettiva che ha fatto sì che la cicloaddizione diventasse così popolare.

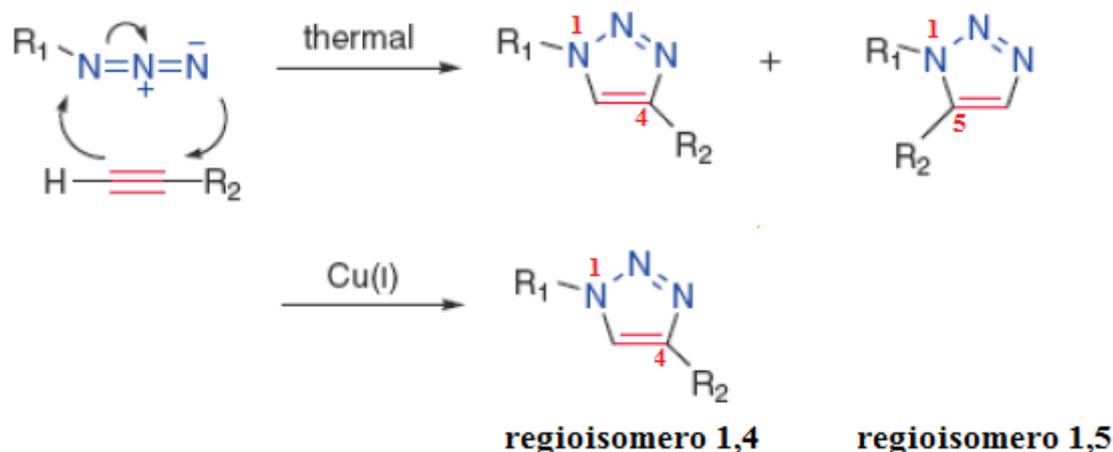


Figura 1.26 – Schema della cicloaddizione-1,3 di un'azide con un alchino terminale a dare un 1,2,3-triazolo. I movimenti delle coppie di elettroni sono stati aggiunti solo per chiarezza e non implicano il meccanismo concertato o non concertato della reazione.

Le condizioni per la cicloaddizione azide-alchino sono estremamente semplici ed il mezzo di reazione più usato è l'acqua. Di solito l'azide e l'alchino vengono combinati in una miscela di

acqua e t-butanolo (1:1 o 1:2), aggiungendo ascorbato di sodio per generare il Cu(I) in situ da Cu(II).

Sebbene l'acqua sia preferibile e di fatto utilizzabile per molte applicazioni, la reazione è compatibile con un gran numero di solventi organici e tali procedure sono vantaggiose qualora sorgano problemi di solubilità in acqua o di incompatibilità con essa da parte dei reagenti o dei prodotti.

In genere, in questi casi, il rame(I) viene aggiunto direttamente alla reazione in varie forme come alogenuro e complesso con basi di Lewis, principalmente azotate¹²⁶. L'aggiunta di leganti permette di solubilizzare il rame(I) in solventi organici e accelera la reazione, nonostante questa abbia luogo anche senza di essi. Quelli maggiormente utilizzati sono la trietilammina (TEA), la 2,6-lutidina-N-etil-diisopropilammina (DIPEA), la N,N,N',N'',N'''-pentametildietilentriammina (PMDETA), la N,N,N',N'',N''',N''''-esametiltriilentetrammina (HMTETA), la tris[(2-piridil)metil]ammina (TPMA), la tris[(2-dimetilammino)etil]ammina (Me₆TREN), la 2,2'-bipiridina (bpy), la 2,2':2',6''-terpiridina (tpy), sali di ammonio, triazoli, ma anche fosfine.

L'effetto cinetico dei leganti amminici aumenta nel seguente ordine¹²⁷:

PMDETA > HMTETA > Me₆TREN > tpy > TPMA > nessun legante > bpy (figura 1.27).

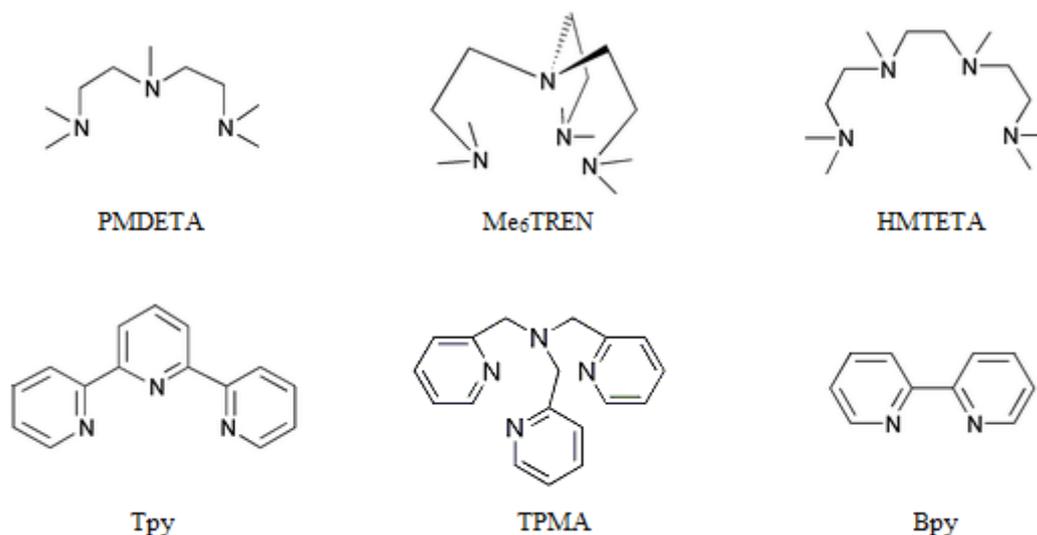


Figura 1.27 – Alcuni leganti usati nella reazione di click.

L'incremento della velocità di reazione è spiegato prevalentemente dal fatto che i leganti promuovono lo scambio idrogeno/rame formando un complesso Cu-acetilene, limitano l'ossidazione del Cu(I), prevengono reazioni secondarie quali ad esempio quelle che coinvolgono acetileni o la dimerizzazione dei triazoli^{128,129,130,131}.

Per quanto riguarda il meccanismo di reazione della CuAAC, sembra essere relativamente complesso e non ancora pienamente compreso, almeno in termini dell'esatta natura delle specie contenenti rame coinvolte nel ciclo catalitico. Alcuni studi hanno mostrato che in alcuni casi più di una specie cataliticamente attiva contribuisce alla formazione dei prodotti triazolici¹²⁹. In aggiunta, la capacità del rame(I) di coordinare un'ampia gamma di specie in soluzione, inclusi leganti, solventi, tamponi organici, reagenti e prodotti, in un equilibrio molto dinamico e di disproporzionare a Cu(0) e Cu(II) in ambienti polari, complica ulteriormente la comprensione del processo catalitico¹³². In ogni caso è generalmente accettato che il primo step nella catalisi della reazione coinvolga la formazione di un acetiluro di Cu(I) (figura 1.28).

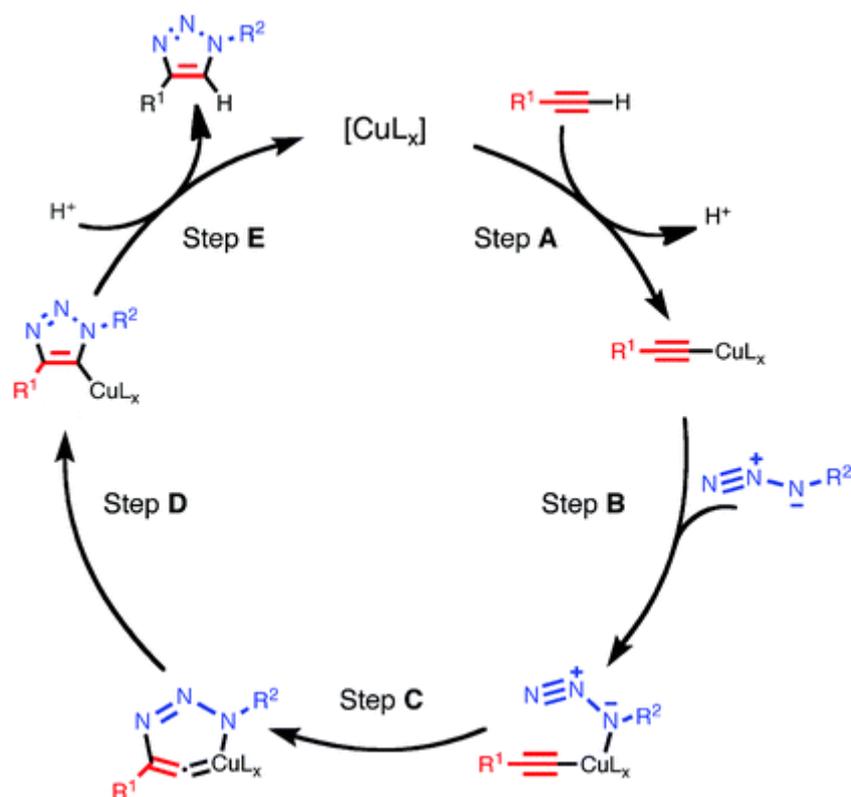


Figura 1.28 – Ciclo catalitico semplificato proposto per la reazione CuAAC¹³³.

Nel secondo step l'acetiluro di Cu(I) reagisce con l'azide a dare il triazolo di Cu(I), mentre l'ultimo step prevede la protolisi di tale composto a dare l'1,2,3-triazolo 1,4-sostituito, con la rigenerazione del catalizzatore.

Per quanto riguarda la chimica dei carboidrati, la recente letteratura testimonia l'interesse per questa cicloadizione per la modifica dei polisaccaridi. Questo approccio è stato sperimentato per la funzionalizzazione del curdlan^{134,135}, della cellulosa^{136,137,138}, della gomma di guar¹³⁹,

dell'acido ialuronico^{140,141}, del chitosano^{64,142,143,144,145}, del destrano^{146,147}, dell'amido^{148,149,150}, dell'amilosio^{151,152,153} e del pullulano¹⁵⁴.

1.7 SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di una linea di ricerca attiva presso l'Istituto per i Processi Chimico Fisici del CNR di Pisa, volta allo sviluppo di materiali funzionali partendo da polimeri di origine naturale. In particolare in questo lavoro si utilizzeranno i due componenti lineare e ramificato dell'amido, l'amilosio e l'amilopectina. Essi sono stati scelti per la loro ampia abbondanza naturale e per la loro struttura semplice ed ordinata, già descritta in precedenza (paragrafo 1.5).

I polimeri naturali sono studiati sia come materiali di partenza per ottenere derivati capaci di sostituire prodotti tradizionalmente derivati dal petrolio, sia per le loro peculiarità strutturali, quali per esempio la stereo-regolarità o la capacità di formare strutture elicoidali di dimensione definite dalla sequenza monomerica, oltre che per la loro affinità con altri composti naturali simili a loro per struttura.

In questo lavoro i due componenti dell'amido sono stati scelti quali substrati per ottenere derivati che siano potenzialmente utilizzabili in rivestimenti per substrati naturali, in particolare per la carta. L'amido è infatti da tempo ampiamente usato nell'industria cartaria poiché grazie all'analogia compositiva con la cellulosa è naturalmente capace di adsorbirsi sulle fibre di cellulosa, di cui è composta la carta. Inoltre la sua struttura rigida e regolare appare interessante per fungere da supporto e "*templante*" per molecole funzionali le quali grazie al vincolo su tale polimero possono assumere distribuzioni spaziali predefinite e, quindi, anche specifiche capacità di risposta a sollecitazioni esterne di tipo chimico e/o fisico. Materiali di questo tipo potrebbero trovare applicazione in formulazioni per inchiostri, smalti o tinture intelligenti, in sistemi anticontraffazione, nella microfluidica e nella sensoristica.

I due polimeri del glucosio sopradetti saranno funzionalizzati con gruppi spiropirano, una molecola responsiva, ampiamente studiata perché capace di cambiare la sua struttura, la sua polarità ed il suo spettro di assorbimento UV/Vis in risposta a stimoli luminosi, meccanici e chimici, quali per esempio il pH o la polarità dell'ambiente circostante (vedi paragrafi 1.2 e 1.3). La funzionalizzazione dei due polisaccaridi sarà condotta secondo una serie di reazioni già parzialmente messe a punto nei laboratori IPCF e basate sulla cicloadizione [2+3] dipolare catalizzata da Cu(I), meglio nota come reazione di "click". Tale reazione ha il

vantaggio di essere selettiva e quantitativa, permettendo quindi di funzionalizzare i substrati scelti con quantità volute di molecole attive semplicemente dosando il loro quantitativo nella miscela di reazione. La procedura completa di funzionalizzazione dei polisaccaridi prevede l'inserzione di gruppi azide sui polisaccaridi per sostituzione degli idrossili in posizione 6 degli anelli delle unità glucopiranosiche. Le funzionalità azidiche così inserite saranno poi sfruttate nelle reazioni di "click" con derivati alchinnici. In particolare si faranno reagire i polisaccaridi con uno spiropirano dotato di una funzionalità alchinnica (SPCC, mostrato in figura 2.16). Tale molecola è stata sintetizzata in precedenza nei laboratori IPCF e sarà fatta reagire con i derivati azidati dell'amido in rapporto 40/100 e 100/100, rispetto alle unità ripetenti del polisaccaride. Il confronto tra i due diversi gradi di funzionalizzazione permetterà di studiare la correlazione tra densità di funzionalizzazione e risposta ottica. Tuttavia, poiché i gruppi azidici sono specie reattive, e nel caso del polimero funzionalizzato in rapporto 40/100 rimarrebbero molte funzionalità azidiche non reagite, per evitare reazioni indesiderate esse saranno convertite utilizzando propargil alcool, per ripristinare il gruppo idrossilico originariamente presente sul polisaccaride e rendere inerte la funzionalità azidica. Per finire verranno preparati anche derivati modificati completamente con propargil alcool, come riferimento.

Tutti i composti che saranno preparati saranno caratterizzati attraverso spettroscopia infrarossa, NMR ed EPR, nonché analisi termogravimetrica al fine di verificare l'effettiva funzionalizzazione ed il mantenimento della struttura della catena polisaccaridica.

Infine sarà condotto uno studio attraverso spettroscopia UV/Vis in diversi solventi: acqua, DMSO, DMF e THF. Essi sono stati selezionati sulla base di risultati preliminari relativi alla funzionalizzazione di amilosio solo con spiropirano in rapporto 40/100 rispetto alle unità ripetenti. In questo studio si era visto che tale derivato è solubile in DMSO e DMF, insolubile in acqua, mentre la sua solubilità in THF diminuisce in seguito all'irraggiamento con luce UV. Inoltre le caratteristiche spettroscopiche (spettri UV/Vis) e le proprietà di fotorisposta nei tre diversi solventi apparivano alquanto differenziate.

Sulla base di tali dati preliminari è apparso interessante condurre uno studio più approfondito sulle caratteristiche di risposta ottica dei polisaccaridi in funzione del tipo di solvente e del grado di funzionalizzazione con spiropirano (40% e 100%) al fine di investigare l'effetto dell'intorno chimico, fornito sia dal polisaccaride che dal solvente, sulle proprietà di risposta ottica su eventuali effetti di fatica in cicli ripetuti di luce UV/buio.

2 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1 CARATTERIZZAZIONE DELL'AMILOSIO E DELL'AMILOPECTINA DI PARTENZA

L'amilosio e l'amilopectina utilizzati in questo lavoro di tesi sono due prodotti commerciali, ottenuti il primo per estrazione dalle patate, mentre il secondo dal mais.

Essi sono stati preventivamente caratterizzati attraverso spettroscopia NMR, IR e termogravimetria.

2.1.1 Caratterizzazione ^1H e ^{13}C NMR

La struttura lineare dell'amilosio è costituita da un'estesa serie di unità di α -glucopiranosio legate tramite legame 1 \rightarrow 4 (*a* in figura 2.1). Sebbene, in teoria, queste unità non siano esattamente equivalenti l'una all'altra, differendo nella posizione all'interno della catena, i chemical shift dei loro atomi di carbonio e idrogeno sono generalmente indistinguibili. La catena termina ad un'estremità con un residuo avente il gruppo idrossilico libero in posizione C4 (*4e* in figura 2.1), mentre dall'altra con un'unità glicosidica avente la posizione anomeric libera (estremità riducente, *1e* in figura 2.1).

Le unità di ramificazione dell'amilopectina, le quali sono caratterizzate da un legame 1 \rightarrow 6 (*b* e *c* in figura 2.1), sono circondate essenzialmente dalle stesse unità presenti nell'amilosio. Di nuovo, tutte queste unità, le quali non sono perfettamente equivalenti tra loro, in realtà, sono difficilmente distinguibili per quello che riguarda i loro chemical shift. Tuttavia, le piccole differenze strutturali danno generalmente luogo ad una distribuzione di chemical shift che si riflette principalmente nella forma dei vari segnali.

E' da notare che, rispetto alle masse molecolari piuttosto alte dei due biopolimeri, l'ammontare dei frammenti *1e* e *4e* nell'amilosio è trascurabile (costituendo meno dello 0,1% di tutte le unità glicosidiche), per cui i segnali da loro generati nello spettro NMR sono molto poco intensi, se non al di sotto del limite di rivelabilità; nell'amilopectina, invece, la presenza di un cospicuo numero di ramificazioni genera altrettante unità di terminazione *4e*, quindi i

segnali protonici e dei carboni di questa e delle unità di ramificazione sono più intensi e dovrebbero essere visibili nello spettro NMR.

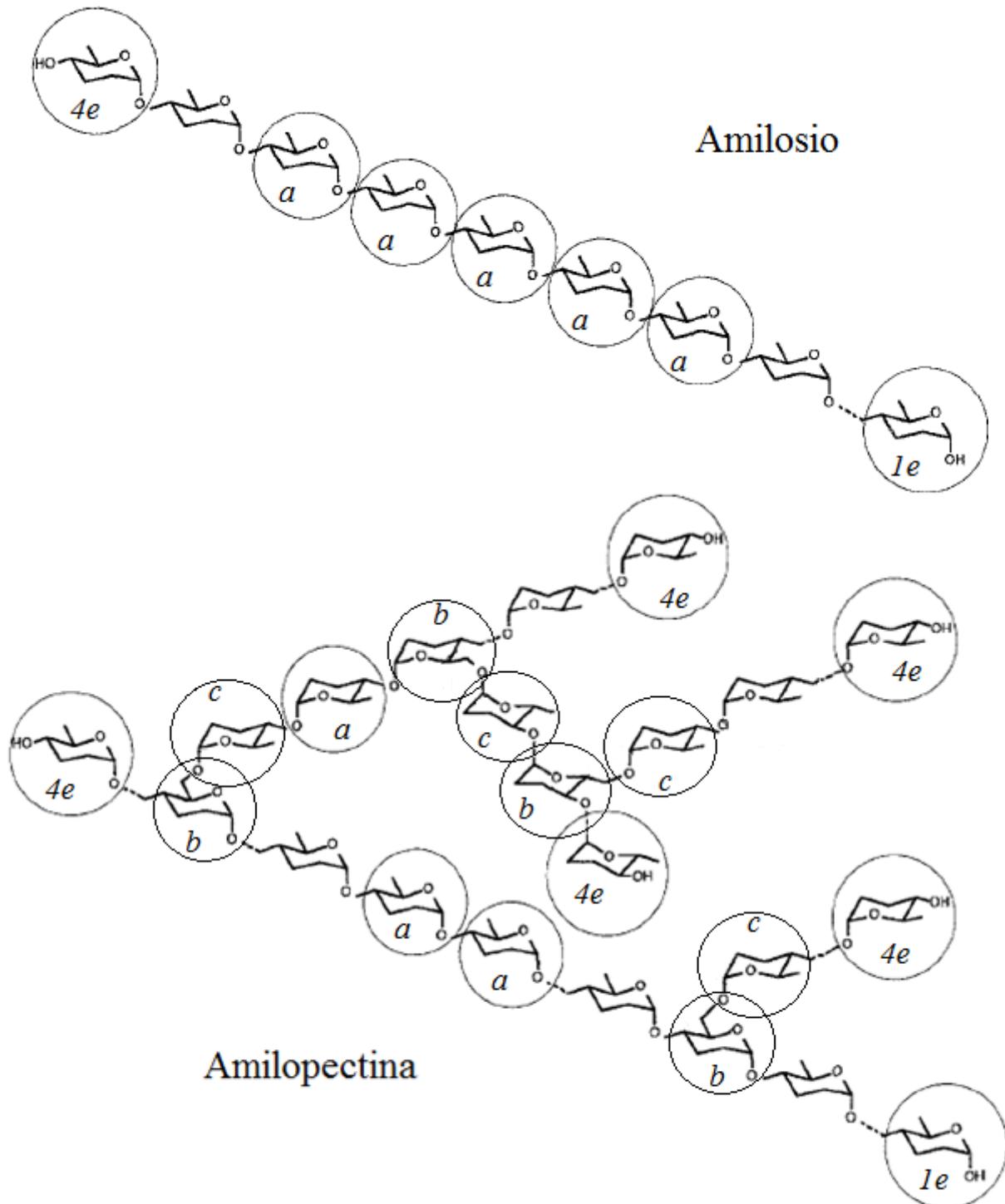


Figura 2.1 – *Struttura schematica dell'amilosio e dell'amilopectina. Le unità glicosidiche della catena lineare principale sono indicate con la lettera "a", le unità di ramificazione con "b" e "c", le unità terminali aventi in posizione 4 un gruppo idrossilico libero con "4e", quelle aventi l'idrossile in posizione anomeroica libera con "1e".*

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'amilosio (figura 2.2) mostra segnali nel range di chemical shift tra 3,2 ppm e 5,7 ppm. L'assegnazione dei picchi è stata fatta facendo riferimento al lavoro di H. Falk e M. Stanek: “*Two-Dimensional ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy and the Structural Aspects of Amylose and Amylopectin*”¹⁵⁵. In particolare, il segnale a chemical shift più basso, a 3,31 ppm, è stato attribuito al protone legato al carbonio in posizione 2 dell'anello glucopiranosidico dell'unità *a* (2 in figura 2.2). I segnali a 3,54 e a 3,59 ppm sono attribuibili agli idrogeni in posizione 3 e 5 e il segnale con massimo a 3,66 ppm è attribuibile ai protoni del gruppo metilenico in posizione 6 (idrogeni 6 e 7). I singoletti a 4,64, 5,44 e 5,53 ppm sono dovuti alla risonanza dei protoni alcolici (rispettivamente 8, 9 e 10 in figura 2.2), mentre il singoletto a 5,12 ppm è relativo all'idrogeno anomero (1). Attribuendo il valore di un protone all'integrale di quest'ultimo segnale, si ottiene una buona corrispondenza per i protoni degli ossidrili in C2, C3 e C5. Dal computo dei protoni, fatto sulla base delle aree degli integrali, manca un idrogeno. Il protone in posizione C4 (4 in figura 2.2) dovrebbe cadere a circa 3,36 ppm¹⁵⁵, ma nello spettro tale regione è coperta dal segnale intenso dell'acqua, per cui si può assumere che il segnale mancante cada sotto quello dell'acqua.

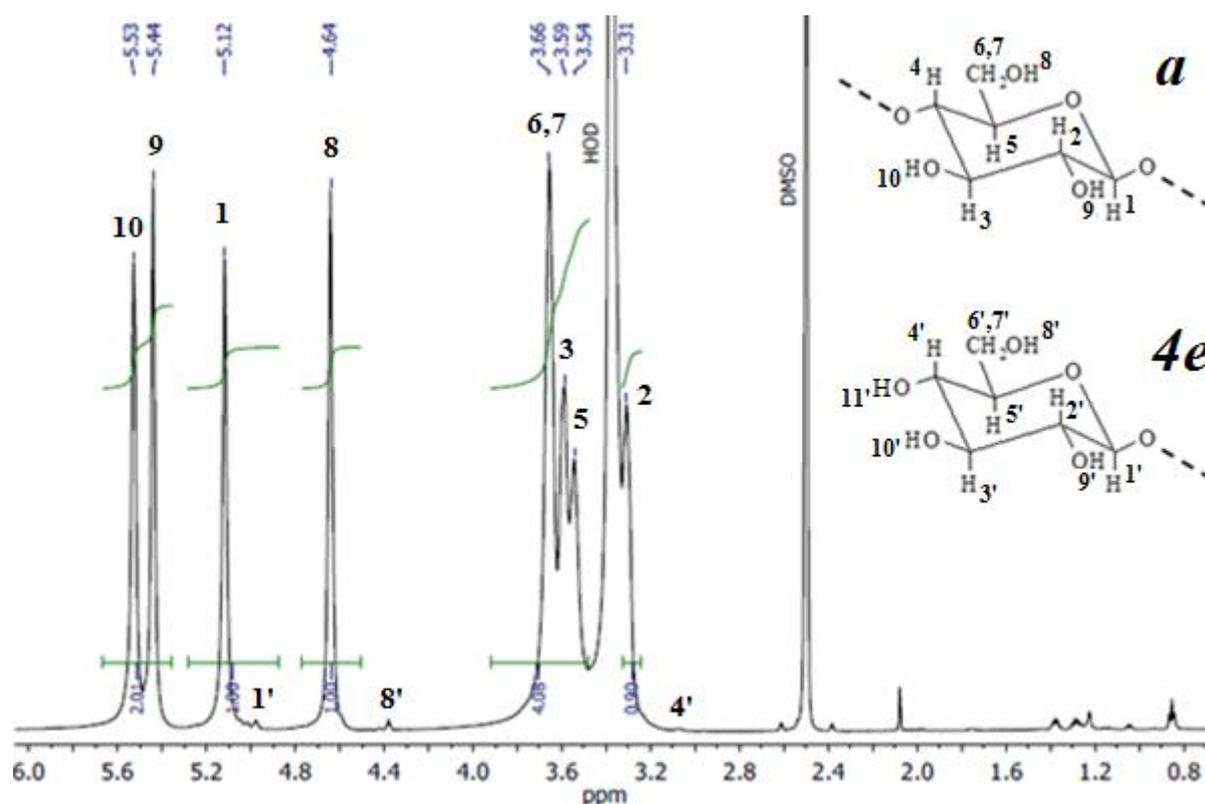


Figura 2.2 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) dell'amilosio in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1 a temperatura ambiente.

Oltre ai segnali sopra menzionati, nello spettro si possono osservare una serie di picchi meno intensi, i quali sono stati assegnati alle unità terminali. In particolare, il segnale a circa 4,9

ppm è attribuibile al protone anomero dell'unità terminale *4e* (1' in figura 2.2); il segnale a circa 4,38 ppm è dovuto alla risonanza del protone idrossilico in C6 dell'unità *4e* (8'); infine quello a 3,08 ppm corrisponde al protone in C4, anch'esso dell'unità *4e* (4'). Gli altri protoni dell'unità terminale probabilmente non sono visibili perché risuonano in regioni dello spettro coperte dai segnali, molto più intensi, dell'unità glicosidica principale *a*.

Il tripletto a 0,81 ppm e i multipletti nella regione spettrale tra 1,2 e 1,40 sono attribuibili rispettivamente alla risonanza del gruppo metile terminale e dei 2 gruppi metilenici dell'1-butanolo presente nell'amilosio come additivo (etichetta Sigma-Aldrich: < 5% in peso) per facilitarne la solubilizzazione.

Lo spettro ¹H-NMR dell'amilopectina (figura 2.3) risulta più complesso di quello dell'amilosio a causa dei segnali aggiuntivi dovuti alle unità di ramificazione *b* e *c* ed al maggior quantitativo di unità terminali *4e*. Tuttavia è possibile individuare e assegnare i picchi dovuti alle unità della catena principale (chiamate *a* in figura 2.1): a 3,31 ppm troviamo il picco relativo al protone legato al carbonio in posizione 2 dell'anello glucopiranosidico; a 3,34 ppm il segnale del protone in C4; il picco a 3,64 ppm è attribuibile ai protoni del gruppo metilenico in posizione C6; il segnale a 4,64 ppm è attribuibile al protone ossidrilico del carbonio in posizione 6 e quello a 5,09 ppm corrisponde al protone in C1. Vicino a quest'ultimo, sono presenti una serie di picchi meno intensi, relativi ai protoni dei carboni anomeriche delle diverse unità glicosidiche presenti nell'amilopectina: a 5,05 ppm troviamo il protone relativo all'unità *c*, a 4,94 ppm quello dell'unità *b*, e quelli a 5,02 e 5,00 non sono altro che un unico doppietto attribuibile al protone in C1 dell'unità terminale *4e*, il quale accoppia con l'idrogeno vicinale in C2. I protoni legati ai carboni in posizione 3 e 5 non sono visibili perché risuonano nella zona dello spettro coperta dal segnale dell'acqua.

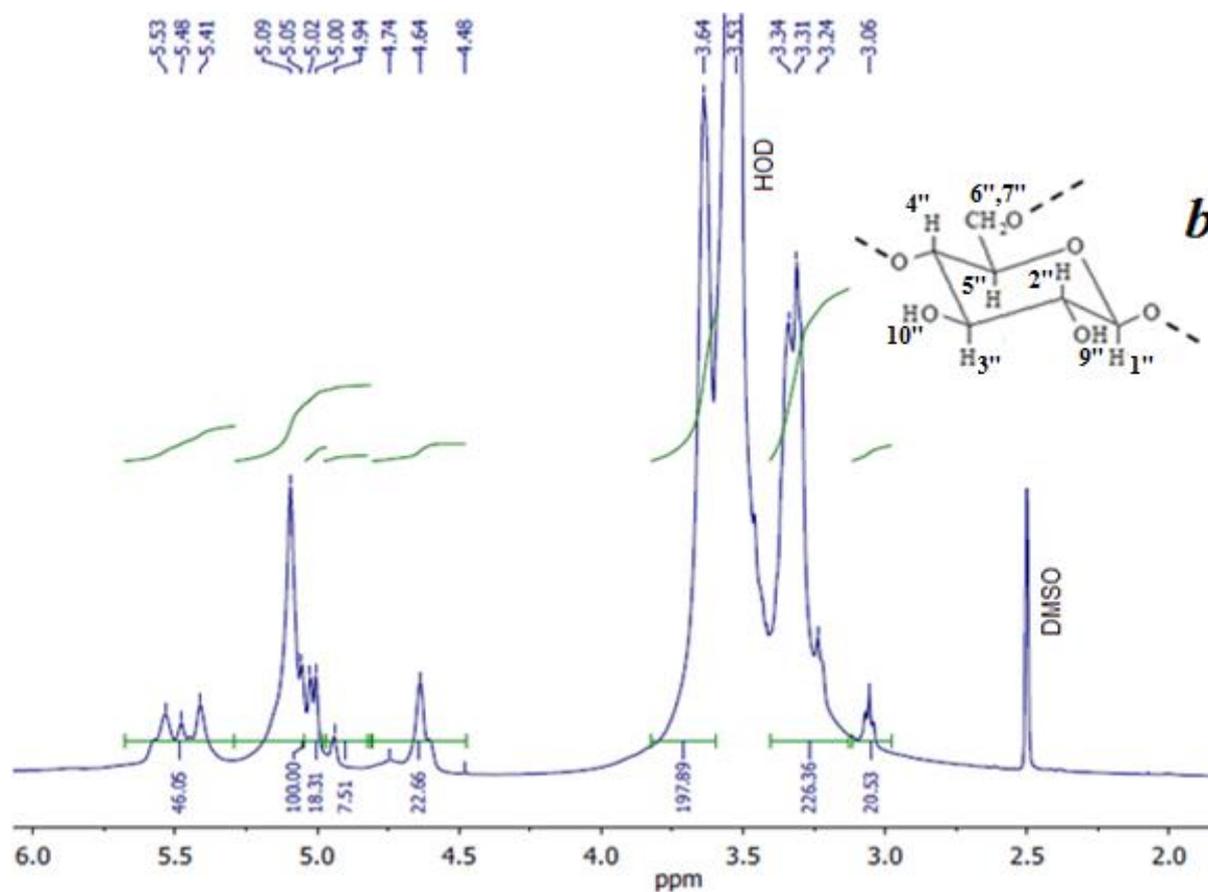


Figura 2.3 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) dell'amilopectina in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1 a temperatura ambiente.

Nello spettro sono riconoscibili anche altri segnali dati dai vari tipi di unità costituenti l'amilopectina: i segnali a 3,06 e 3,24 ppm sono dovuti, rispettivamente, ai protoni in C4 e in C2 dell'unità terminale *4e*; a 4,48, 4,60 e 4,74 ppm troviamo i segnali dei protoni idrossilici delle posizioni 3, 4 e 6 sempre dell'unità terminale. Infine la serie di picchi nella regione che va da 5,41 a 5,55 ppm sono attribuibili agli idrogeni degli OH in C2 e C3 delle unità *a*, *b*, *c*. E' importante sottolineare che una valutazione quantitativa della percentuale di ramificazione attraverso l'uso delle aree dei picchi non è possibile in quanto andrebbe confrontato il picco a 3,06 ppm relativo all'H in C4 dell'unità *4e* con quello a 5,09 ppm corrispondente all'anomerico dell'unità principale (*a*). Dal confronto tra questi due valori, risulterebbe una percentuale di ramificazione di circa il 20%, o, in altre parole, una ramificazione ogni 5 unità di glucosio, alquanto elevata per questo polisaccaride. In letteratura si riportano infatti percentuali di ramificazione del 3,3-5%¹⁵⁶, ovvero una ramificazione ogni 20-30 unità glicosidiche. Il dato ottenuto dalle integrazioni dei segnali protonici in effetti non è affidabile in quanto il picco a 3,06 ppm potrebbe essere risultato sovrastimato sia dall'approssimazione dovuta alla qualità della linea di base, sia dal fatto che trattandosi di un protone dell'unità

terminale, questa possiede una maggiore mobilità rispetto a quelle della catena principale, per cui si rilassa più velocemente, fornendo un'informazione inesatta. Un dato certamente più accurato è ottenibile dal segnale a 4,94 ppm relativo al protone del carbonio anomero dell'unità di ramificazione *b*, la cui integrazione indicherebbe una percentuale di ramificazione di circa il 7,5%, ovvero una ramificazione ogni 13 residui di glucosio, valore più vicino a quelli riportati in letteratura¹⁵⁶.

Per quanto riguarda gli spettri ^{13}C -NMR, questi risultano di più semplice interpretazione, grazie alla presenza di un minor numero di segnali rispetto agli spettri protonici. In figura 2.4 è riportato lo spettro dell'amilosio con le relative attribuzioni (150 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O 75:1) δ ppm: 60,41 (C6); 71,51 (C5); 71,90 (C2); 73,21 (C3); 78,61 (C4); 99,93 (C1).

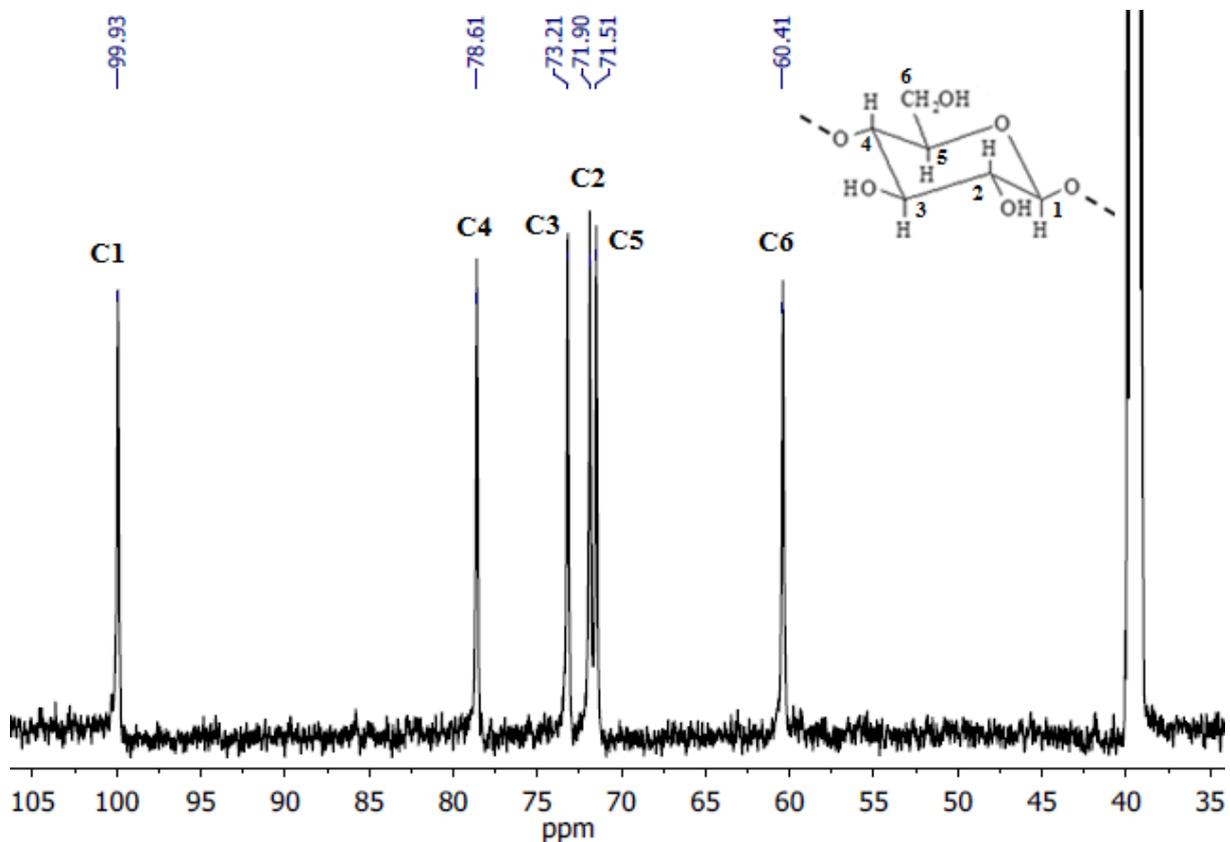


Figura 2.4 – Spettro ^{13}C -NMR (150 MHz) dell'amilosio in DMSO- d_6 /D $_2$ O 75:1 a temperatura ambiente.

In figura 2.5 è riportato lo spettro dell'amilopectina, il quale non si differenzia molto da quello dell'amilosio per quanto riguarda la posizione dei picchi degli atomi di carbonio appartenenti all'unità principale *a*. Tuttavia, oltre a questi, sono visibili anche i segnali derivanti dai carboni delle altre unità glicosidiche *b*, *c* e *4e* (vedi figura 2.1). Tuttavia, è difficile stabilire con precisione quale picco appartenga al carbonio di una o l'altra tipologia

di unità; inoltre, a causa del rumore di fondo elevato, alcuni segnali risultano non ben distinguibili.

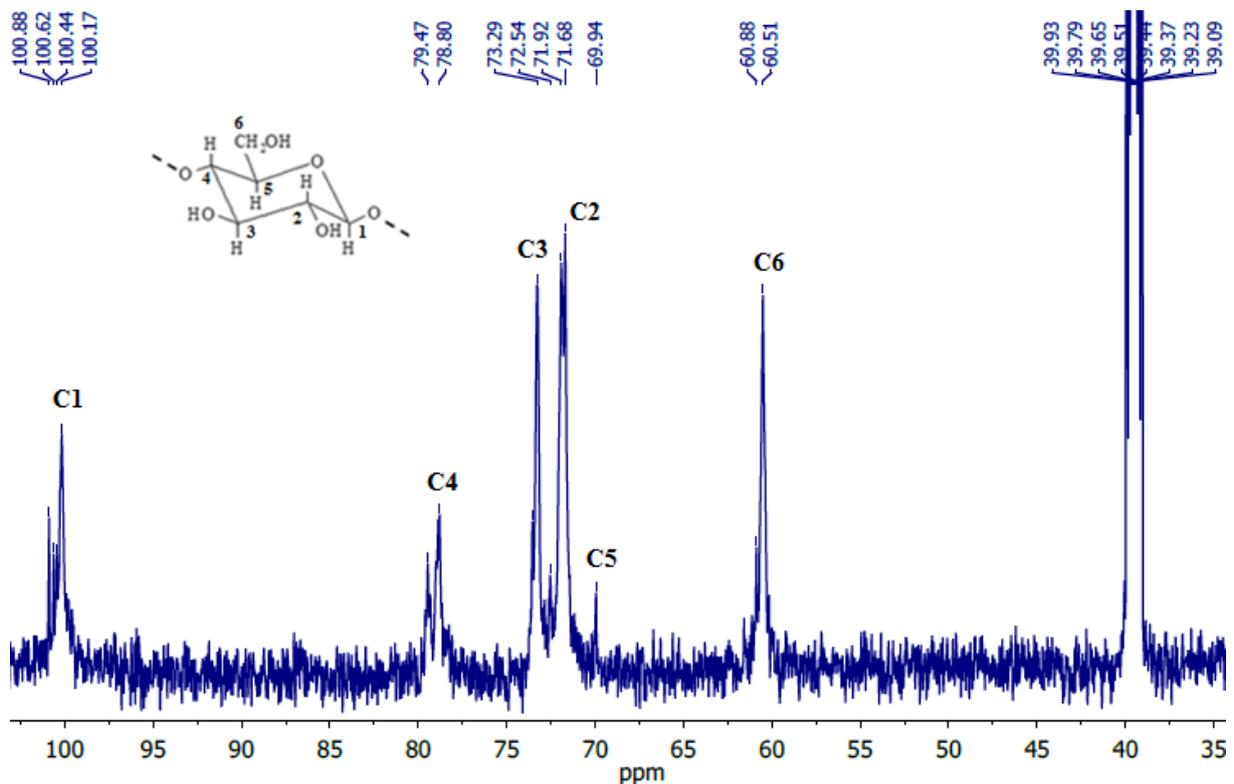


Figura 2.5 – Spettro ^{13}C -NMR (150 MHz) dell'amilopectina in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1 a temperatura ambiente.

2.1.2 Caratterizzazione ATR-IR

Gli spettri ATR-IR (figura 2.6) dell'amilosio e dell'amilopectina appaiono indistinguibili: entrambi mostrano una banda a 3296 cm^{-1} caratteristica dello stretching dei gruppi alcolici, sovrapposta all'analoga dell'acqua, e la banda caratteristica degli stretching d'anello con massimo a 998 cm^{-1} . Si osserva inoltre una banda a 1637 cm^{-1} attribuibile al bending dell'acqua.

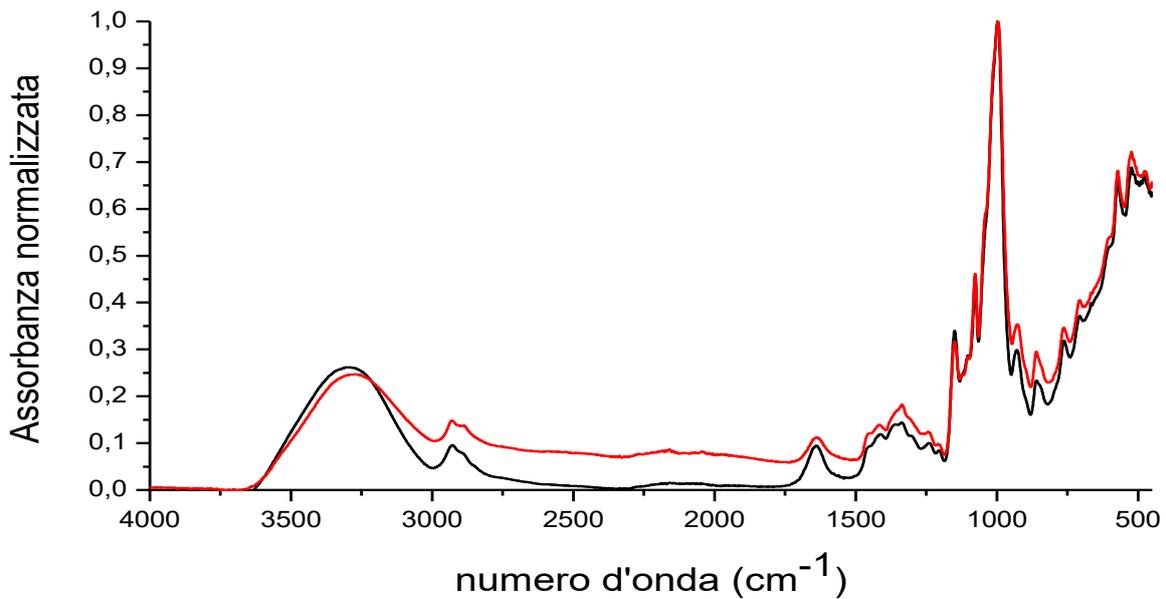


Figura 2.6 – Sovrapposizione degli spettri ATR-IR dell'amilosio (nero) e dell'amilopectina (rosso) normalizzati rispetto alla banda a 998 cm^{-1} .

2.1.3 Caratterizzazione TGA

I due polisaccaridi sono stati caratterizzati attraverso analisi termogravimetrica (TGA) al fine di valutare il loro contenuto di umidità e il loro profilo degradativo. Le misure sono state eseguite in atmosfera di azoto con un incremento di temperatura di 10 °C/min fino a 800 °C . I termogrammi di entrambi i polimeri sono caratterizzati da un profilo simile (figura 2.7). Si può osservare che entrambe le curve hanno 4 regioni distinte: la prima, fino a 100 °C ; la seconda da 100 fino a 200 °C per l'amilosio e fino a 260 °C per l'amilopectina; la terza regione fino a 325 °C ; e la quarta da 325 fino a 800 °C . La perdita di peso iniziale mostrata dai due polisaccaridi, rispettivamente di $8,2\%$ e $10,5\%$ per amilosio e amilopectina, è dovuta all'acqua presente nei campioni sotto forma di umidità. Nella seconda regione non c'è apprezzabile perdita di peso, mentre a partire dalla terza regione inizia il vero e proprio step degradativo, il quale inizia a temperature più basse nell'amilosio. Questa perdita di peso potrebbe essere attribuibile alla perdita dei gruppi idrossilici presenti nei polisaccaridi, sotto forma di acqua¹⁵⁷. La percentuale di residuo a fine analisi, risulta maggiore nell'amilosio, aggirandosi intorno al 22% , mentre nell'amilopectina è inferiore al 10% .

Si può notare, tuttavia, che l'amilopectina ha una maggior stabilità termica rispetto all'amilosio, osservabile dal fatto che essa inizia a degradarsi a temperature più elevate, ma

una volta iniziata la decomposizione, questa è più rapida per l'amilopectina, come mostrato dalla ripidità del gradino in corrispondenza della principale perdita di peso.

Il diverso comportamento termico tra amilosio e amilopectina è ampiamente riportato in letteratura^{157,158,159}, anche se non ne è stata fornita una chiara interpretazione.

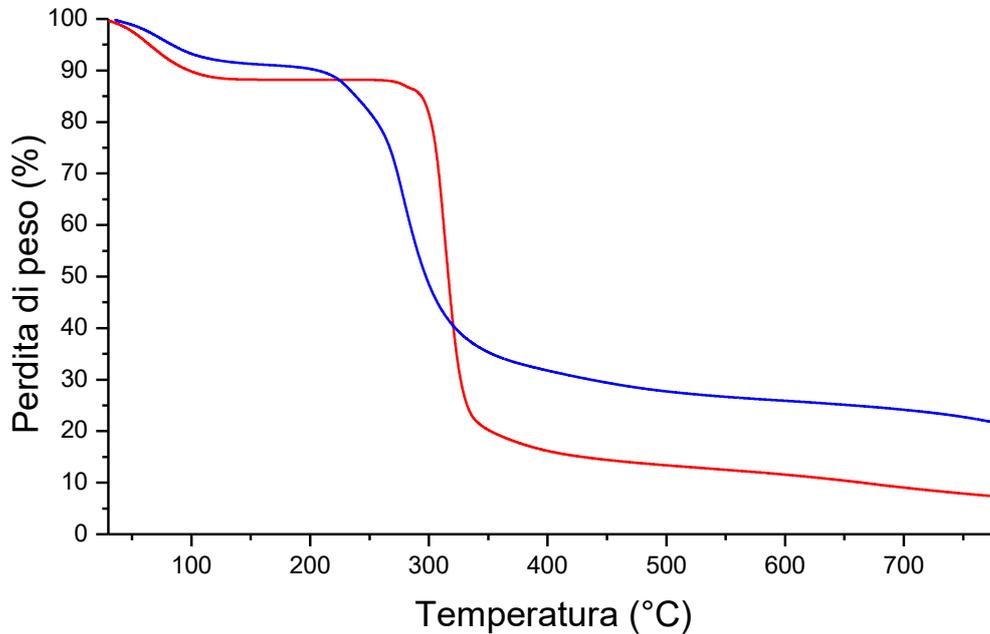


Figura 2.7 – Sovrapposizione dei termogrammi TGA dell'amilosio (in blu) e dell'amilopectina (in rosso).

2.2 MODIFICA DELL'AMILOSIO E DELL'AMILOPECTINA

2.2.1 Azidazione

Allo scopo di introdurre funzionalità azidiche sui polisaccaridi, è stata condotta una reazione seguendo la procedura riportata in letteratura da J. Shey¹⁶⁰ e collaboratori (figura 2.8). La suddetta reazione dovrebbe fornire prodotti modificati in maniera regioselectiva nella posizione C6 del glucosio e in modo quantitativo, se condotta in eccesso di azide ed in condizioni anidre.

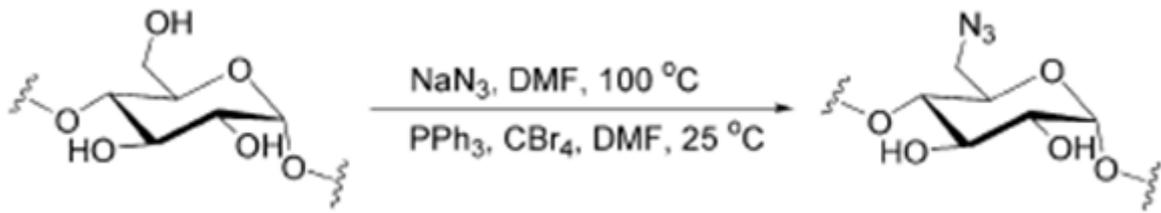


Figura 2.8 – Schema della reazione usata per azidare amilosio e amilopectina in posizione 6 dell'anello glucosidico.

L'amilosio e l'amilopectina sono stati azidati utilizzando una quantità di sodio azide di 10 volte superiore, in moli, rispetto alle unità ripetenti dei polisaccaridi di partenza, anidrificando il solvente di reazione e i polisaccaridi. Questi ultimi sono stati tenuti a 70 °C per una notte. Non sono state utilizzate condizioni più severe per evitare l'insorgere di processi degradativi. I due prodotti di reazione caratterizzati attraverso spettroscopia FT-IR sono apparsi analoghi tra loro (figura 2.9), ed il confronto con gli spettri dei polisaccaridi tal quali, mostra per entrambi la comparsa di un picco stretto e intenso a 2100 cm^{-1} , caratteristico dello stretching del gruppo azidico (figura 2.10).

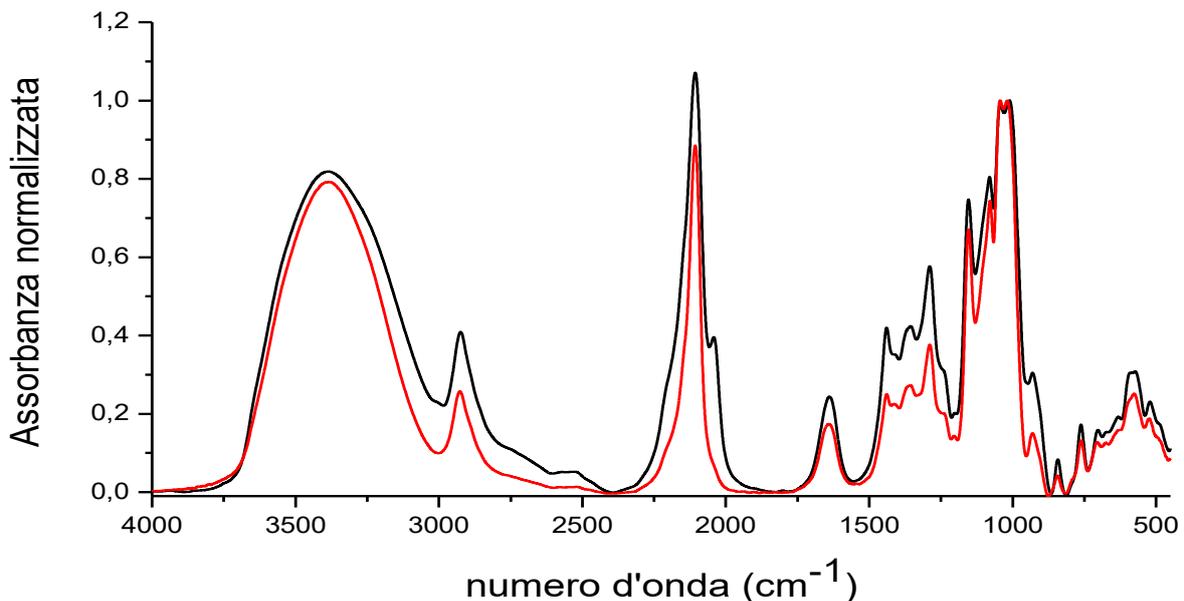


Figura 2.9 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR dell'amilosio (nero) e dell'amilopectina (rosso) azidati, normalizzati rispetto alla banda a 1020 cm^{-1} .

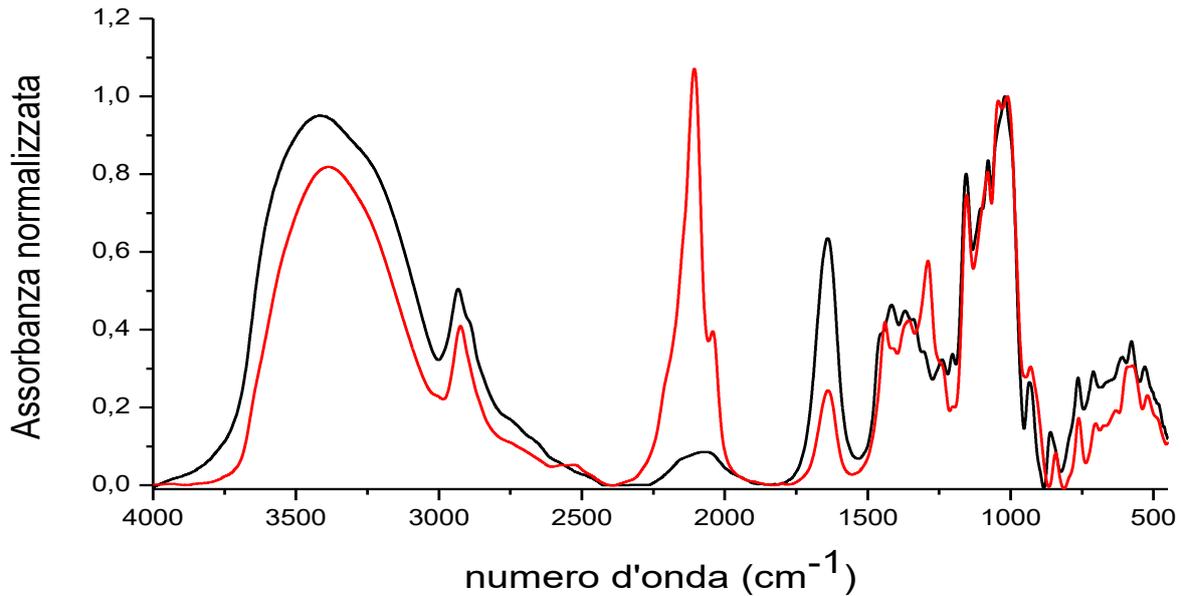


Figura 2.10 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR dell'amilosio (nero) e dell'amilosio azidato (rosso), normalizzati rispetto alla banda a 1020 cm^{-1} . I polisaccaridi sono stati miscelati con KBr e le pasticche ottenute sono state analizzate in trasmissione.

L'unica sostanziale differenza tra gli spettri dell'amilosio e dell'amilopectina azidati, normalizzati rispetto alla banda a 1020 cm^{-1} (figura 2.9) sta nell'intensità relativa della banda azidica, che è risultata più bassa nell'amilopectina. Tale risultato è consistente con la diversa struttura dei due polisaccaridi, in quanto la presenza di ramificazioni α -(1 \rightarrow 6) ogni circa 13 residui glucopiranosidici nell'amilopectina, rende disponibili una quantità minore di siti per l'attacco dell'azide.

Il confronto tra gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei polisaccaridi azidati e dei polimeri tal quali, sia per l'amilosio (figura 2.11) che per l'amilopectina (figura 2.12), evidenzia la scomparsa del picco relativo al protone idrossilico in posizione C6, risonante per entrambi a 4,64 ppm. Tale risultato è consistente con l'azidazione quantitativa in quella posizione. Il picco di debole intensità a circa 4,6 ppm è presente anche negli spettri dei polisaccaridi tal quali, come spalla al segnale del protone in C6, ed è dovuto ad uno dei protoni idrossilici delle unità terminali polisaccaridiche. Si può escludere, quindi, la presenza di quantità significative di unità glucosidiche non azidate.

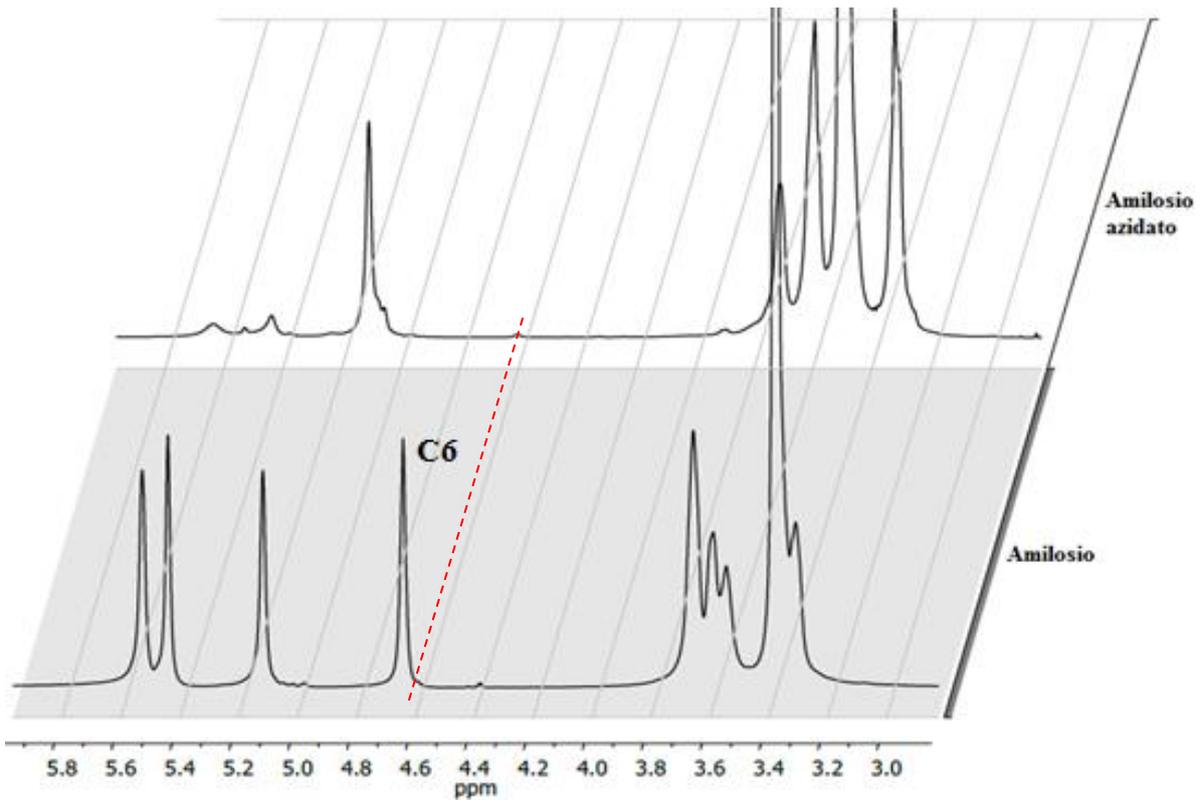


Figura 2.11 – Confronto tra gli spettri ¹H-NMR dell'amilosio (in DMSO-d₆) e dell'amilosio azidato (in DMSO-d₆/D₂O 75:1).

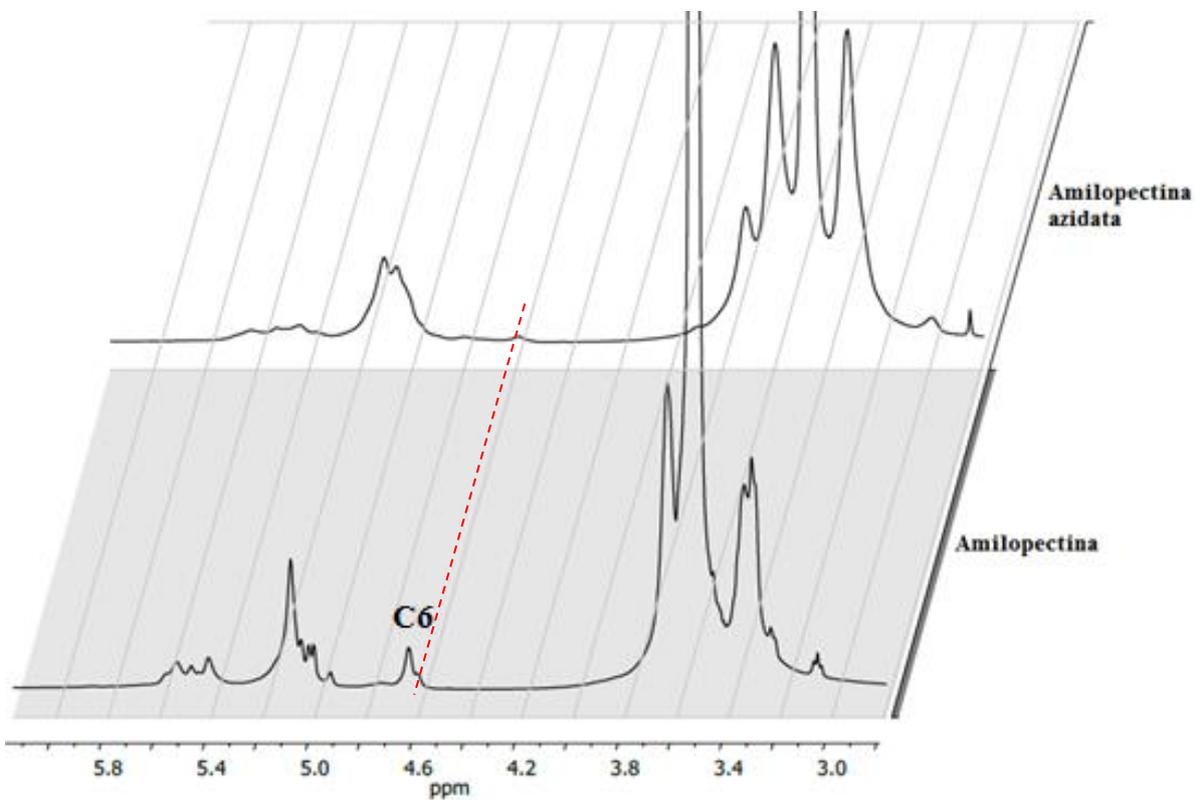


Figura 2.12 – Confronto tra gli spettri ¹H-NMR dell'amilopectina e dell'amilopectina azidata (in DMSO-d₆/D₂O 75:1).

La differenza nell'intensità dei segnali dei protoni idrossilici tra lo spettro dell'amilosio e dell'amilosio azidato è dovuta alla presenza di acqua deuterata in quest'ultimo. Essendo mobili, gli idrogeni idrossilici possono scambiare con il deuterio dell'acqua presente, riducendo in modo significativo la relativa intensità nello spettro protonico. Tuttavia, quando presenti, essi rimangono rilevabili (vedi segnali degli OH in C2 e C3 tra 5,4 e 5,7 ppm).

Lo spettro ^{13}C -NMR dell'amilosio azidato (figura 2.13) è analogo a quello del polisaccaride di partenza ad eccezione della posizione del picco relativo al carbonio C6, il quale passa da 60,4 ppm nell'amilosio tal quale a 51,4 ppm in quello azidato. Tale spostamento è consistente con il fatto che tale carbonio prima era legato ad un idrossile, mentre dopo azidazione è legato ad un gruppo N_3 . Inoltre, la scomparsa totale del segnale nella zona a 60 ppm indica che la reazione è avvenuta in modo quantitativo, come indicato anche dall'analisi degli spettri protonici¹⁶⁰.

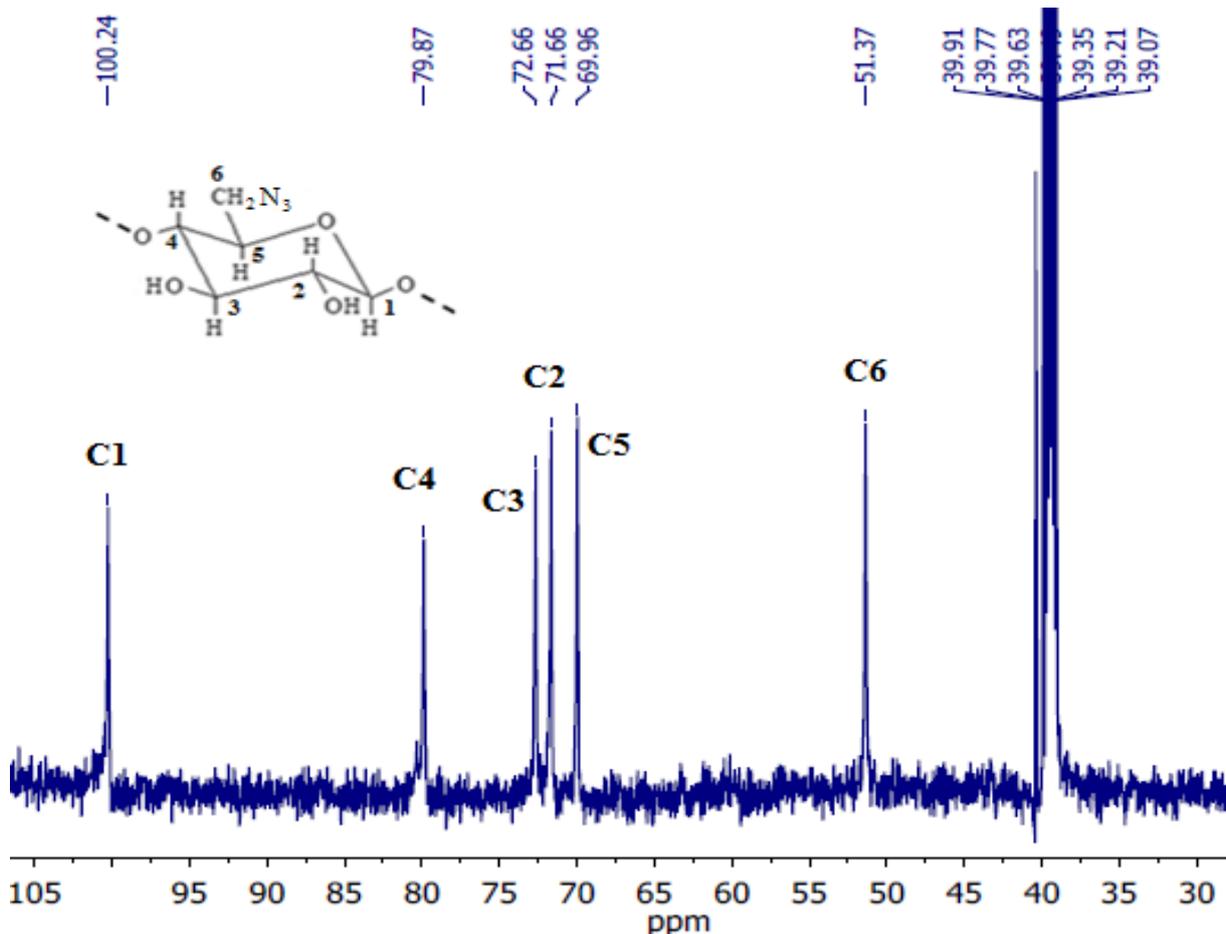


Figura 2.13 – Spettro ^{13}C -NMR dell'amilosio azidato in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1.

Infine, la conservazione di tutti gli altri segnali inalterati indica chiaramente che la reazione non ha intaccato la struttura macromolecolare dei polisaccaridi, né sono state interessate nella modifica altre posizioni sull'anello glicosidico.

Anche per l'amilopectina azidata lo spettro ^{13}C -NMR (figura 2.14) è analogo a quello del polisaccaride non azidato, con piccole differenze di chemical shift non apprezzabili. Anche per questo polimero, come già detto per l'amilosio, l'unica differenza significativa è lo spostamento del segnale dovuto al carbonio in posizione 6, che passa da circa 60 ppm quando è legato ad un gruppo idrossilico, a 51,4 ppm quando legato ad un gruppo azidico. Anche qui sono visibili alcuni dei segnali relativi ai carboni delle diverse unità costituenti l'amilopectina: a 60,5 ppm troviamo il picco dei C6 delle unità di ramificazione (*b* di figura 2.1), i quali non posseggono il gruppo azidico perché impegnati nel legame glicosidico α -(1 \rightarrow 6) della ramificazione e quindi rimangono invariati dopo reazione.

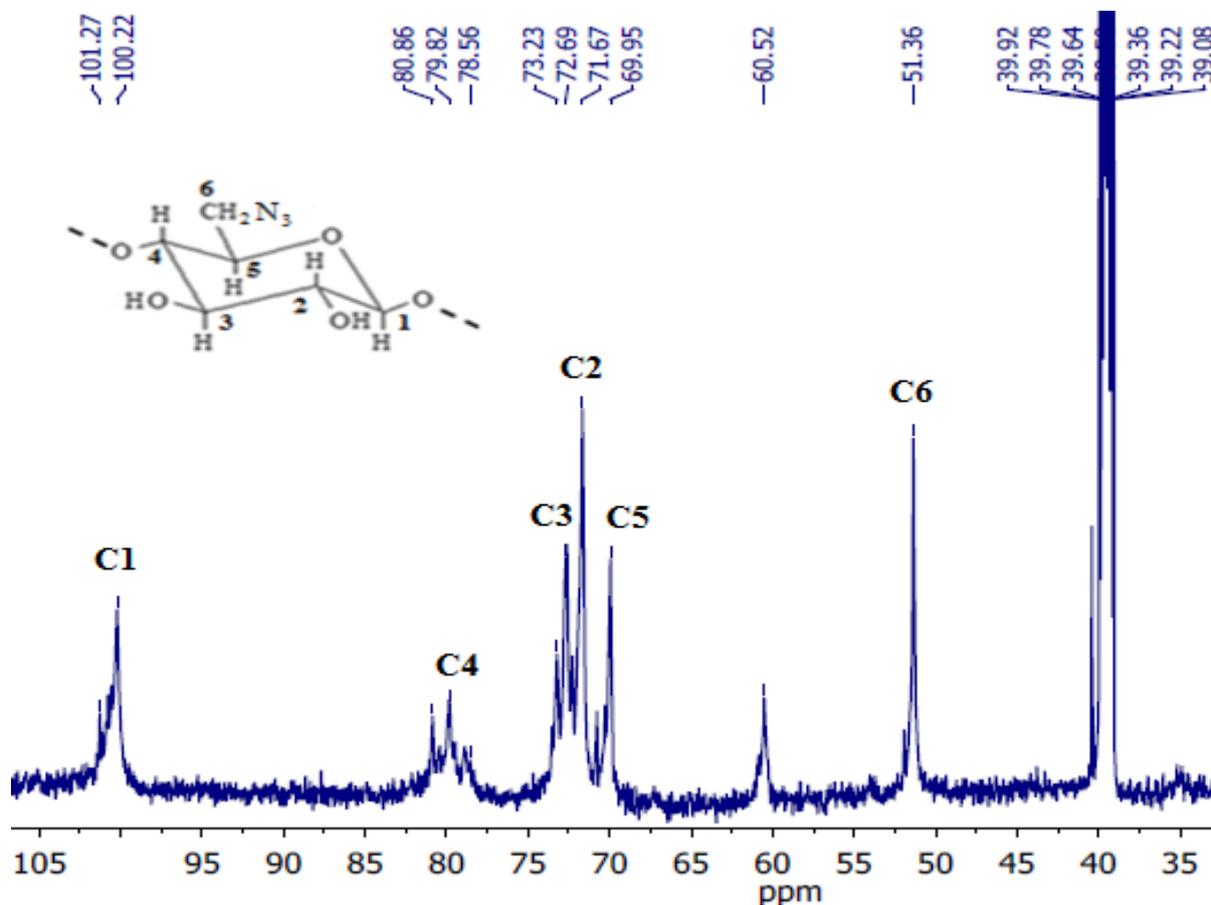


Figura 2.14 – Spettro ^{13}C -NMR dell'amilopectina azidata in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1.

I due prodotti di reazione, analizzati attraverso termogravimetria, mostrano un profilo di perdita di peso simile tra loro. In particolare le curve in blu e in nero di figura 2.15, che rappresentano il calo di peso percentuale rispettivamente dei campioni di amilosio azidato e di amilopectina azidata, mostrano un'iniziale perdita di peso che avviene nell'intervallo tra 30

°C e 160 °C. Le derivate delle curve (linee tratteggiate in figura 2.15) dell'amilosio e dell'amilopectina hanno massimo rispettivamente a circa 76 °C e a 55 °C, che corrisponde al flesso della curva di perdita in peso, e rappresenta la temperatura a cui tale perdita ha velocità massima. Come per i polimeri non modificati, questo step può essere attribuito alla perdita d'acqua sotto forma di umidità assorbita. Il secondo processo degradativo, che ha velocità massima in corrispondenza del secondo picco della derivata, avviene nell'intervallo compreso tra 210 °C (T_{onset}) e 260 °C. Esso porta ad una perdita in peso pari al 24,2% per l'amilosio e al 25,8% per l'amilopectina. Il terzo step, con inizio intorno ai 260 °C è dovuto alla decomposizione della catena polimerica organica¹⁵⁷. Il residuo pirolitico non volatilizzato al termine dell'analisi è di oltre il 24% del peso iniziale del campione.

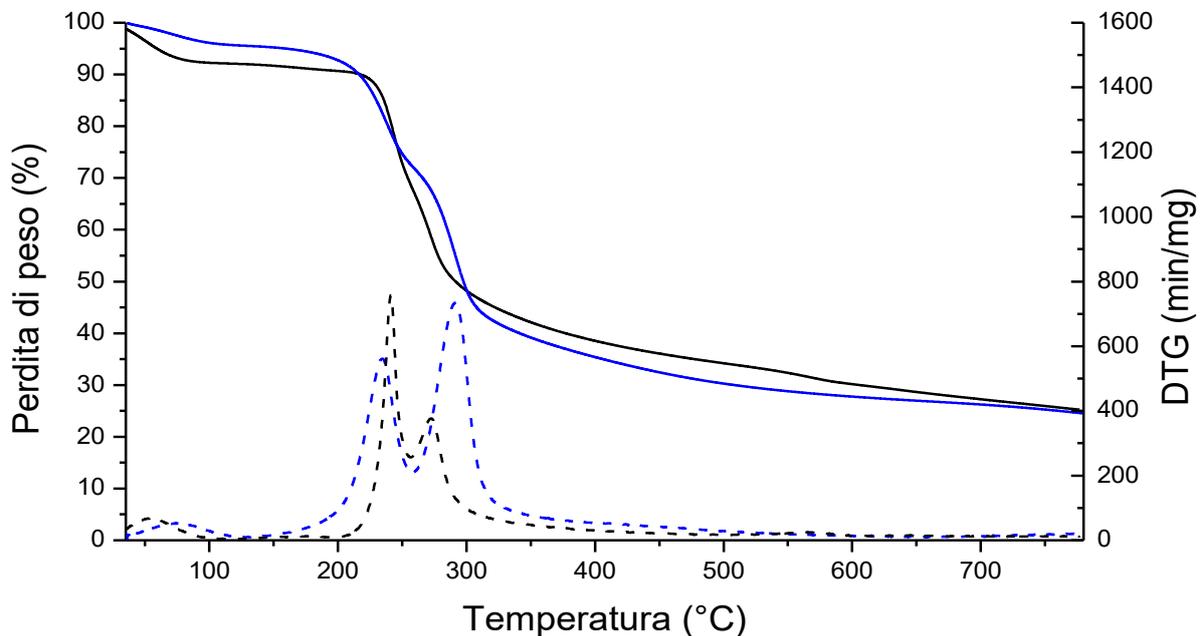


Figura 2.15 – Termogramma TGA dell'amilosio azidato (in blu) e dell'amilopectina azidata (in nero) e rispettive derivate prime (linee tratteggiate).

Utilizzando i termogrammi è possibile dimostrare che il calo di peso dello step degradativo tra 210 e 260 °C è probabilmente dovuto alla perdita dell'azide. Infatti, le perdite di peso, ricalcolate rispetto ai campioni secchi sono rispettivamente pari al 24,2% e al 25,8% per amilosio e amilopectina azidati. Questi valori sono in accordo con la frazione in peso di gruppi azidici presente nei campioni, le quali sarebbero del 22,5% assumendo un'azidazione completa. La piccola differenza tra il valore sperimentale e quello del contenuto teorico di azide calcolato può essere spiegato considerando che lo stadio degradativo non è netto e si sovrappone in una certa misura con quello successivo dovuto alla parte organica dei campioni.

Si noti che tale dato esclude che la degradazione avvenga con perdita di azoto gassoso, il quale era invece prevedibile data la tendenza dei gruppi azidici a dare le seguente reazione:



2.2.2 Reazione di click

Sui campioni di amilosio e di amilopectina azidati sono state eseguite una serie di reazioni di modifica con molecole recanti gruppi terminali alchinnici, ossia capaci di dare reazione di cicloadizione 1,3 dipolare⁶⁴ (click) (figura 2.16). In particolare è stata utilizzata una molecola fotoresponsiva, in cui la capacità di risposta è data dalla presenza di un gruppo spiroirano, e una molecola non responsiva quale il propargil alcool. Quest'ultima è stata utilizzata allo scopo di ottenere prodotti a differente grado di funzionalizzazione in spiroirano, senza lasciare però gruppi reattivi azidici sul prodotto finale. Questi, infatti, rendono i prodotti poco stabili sia se esposti alla luce che al calore¹⁵⁶.

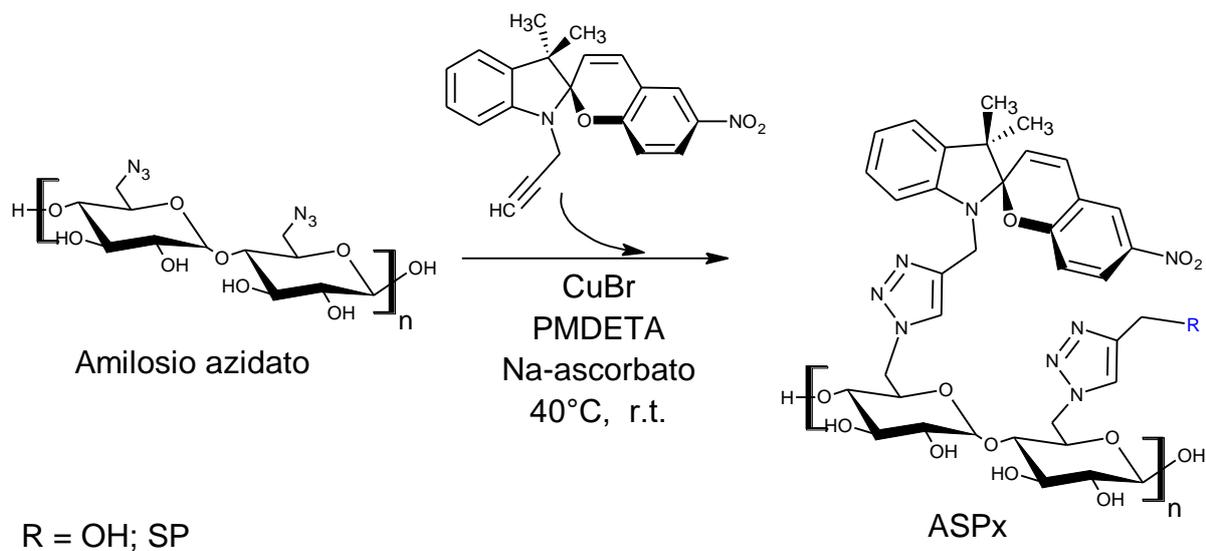


Figura 2.16 – Schema della reazione di click per i polisaccaridi azidati.

Nella tabella 2.1 sono riportati i valori di sostituzione target e i rapporti di alimentazione in spiroirano e in propargil alcool rispetto alle unità glicosidiche azidate, scelti per condurre le reazioni di click. I rapporti di alimentazione sono stati definiti assumendo che la reazione di click sia quantitativa e che la reattività degli alchini non dipenda dalla struttura dell'intera molecola. In particolare, le alimentazioni sono state solo in leggero eccesso rispetto ai gruppi

azidici disponibili e, nel caso delle reazioni con i due alchini, essi sono stati alimentati contemporaneamente.

Tabella 2.1 – *Prodotti ottenuti dalle reazioni di click dei due polisaccaridi azidati.*

Campione	Substrato	Grado di sostituzione target rispetto alle unità glicosidiche azidate (%)		Alimentazione effettiva (%) rispetto alle unità azidate	
		SPCC (spiropirano)	PA (propargil alcool)	SPCC	PA
ASP ₄₀	AN ₃	40	60	40,6	60,9
APSP ₄₀	APN ₃	40	60	41,5	62,1
ASP ₁₀₀	AN ₃	100	-	103,9	4,7*
APSP ₁₀₀	APN ₃	100	-	108,6	11,7*
APA ₁₀₀	AN ₃	-	100	-	125,6
APPA ₁₀₀	APN ₃	-	100	-	130,8

*Il propargil alcool è stato alimentato nel secondo step.

L'analisi FT-IR dei prodotti modificati solo con spiropirano, chiamati ASP₁₀₀ e APSP₁₀₀ in tabella 2.1, ha evidenziato la presenza di un picco residuo a circa 2106 cm⁻¹, relativo allo stretching dell'azide, ad indicare che la reazione non è andata a completezza (figura 2.17).

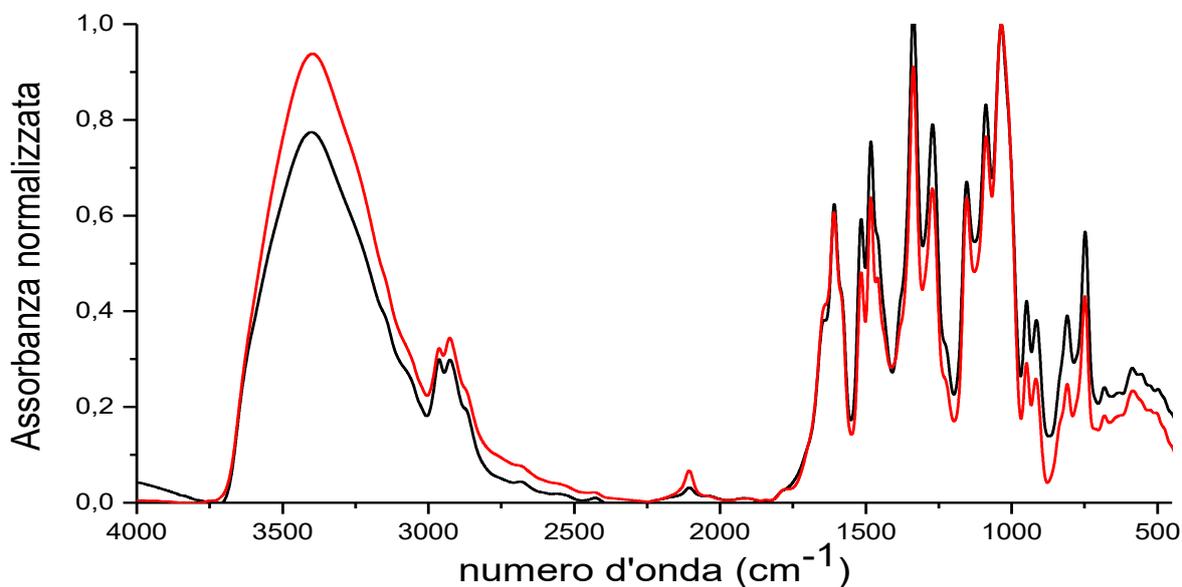


Figura 2.17 – *Sovrapposizione degli spettri FT-IR di ASP₁₀₀ (nero) e APSP₁₀₀ (rosso), normalizzati rispetto alla banda a 1035 cm⁻¹, in cui la presenza del picco a 2106 cm⁻¹ evidenzia il residuo di azide nei prodotti.*

Tale risultato potrebbe essere dovuto alla disattivazione del catalizzatore di rame durante la reazione a causa di una contaminazione accidentale con ossigeno, in quanto le reazioni sono state condotte in atmosfera inerte di azoto per diverse ore. La presenza di tracce di ossigeno avrebbe potuto ossidare il rame, facendolo passare da rame I a rame II. Tuttavia non si può escludere che la reazione non sia andata a completezza a causa di problemi di ingombro sterico dei gruppi SP legati.

Dal confronto tra gli spettri del polisaccaride azidato e quello del polimero dopo reazione di click (figure 2.18 e 2.19) è stato possibile stimare la percentuale di azide rimasta, dal rapporto tra le intensità dei picchi a circa 2105 cm^{-1} , previa normalizzazione degli spettri rispetto alla banda caratteristica degli stretching dei C–O dell'anello piranosico. Il rapporto tra le intensità dei picchi ha fornito una percentuale di gruppi N_3 residua di 2,75% per l'ASP₁₀₀ e di 7,25% per l'APSP₁₀₀.

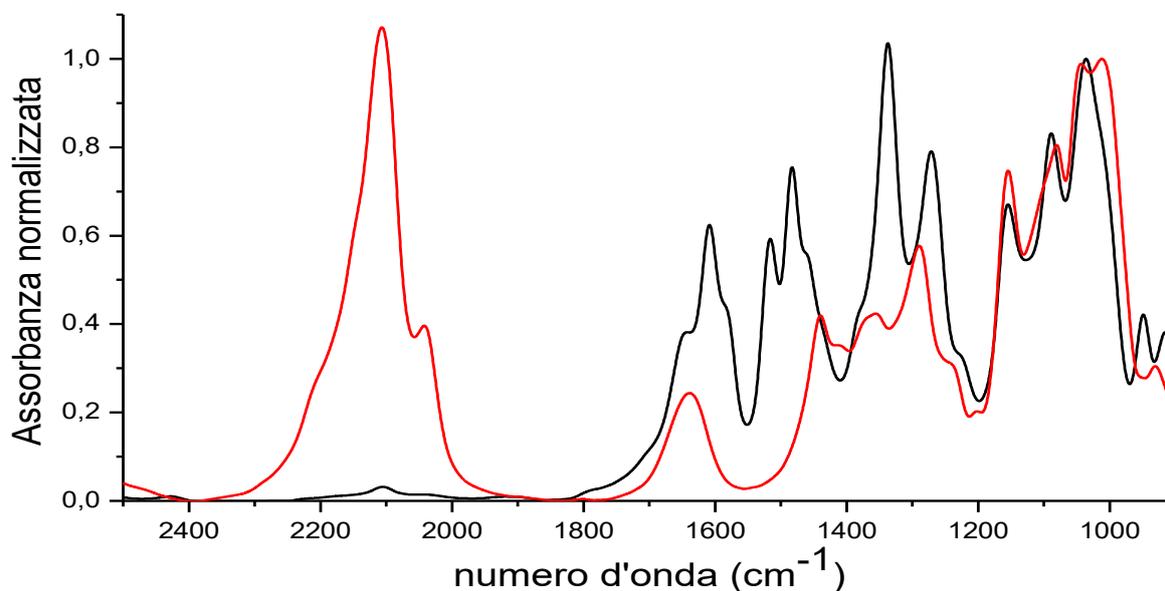


Figura 2.18 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR dell'amilosio azidato (rosso) e di ASP₁₀₀ (nero), normalizzati rispetto alla banda degli stretching dei C–O di anello, per la determinazione della percentuale di azide residua.

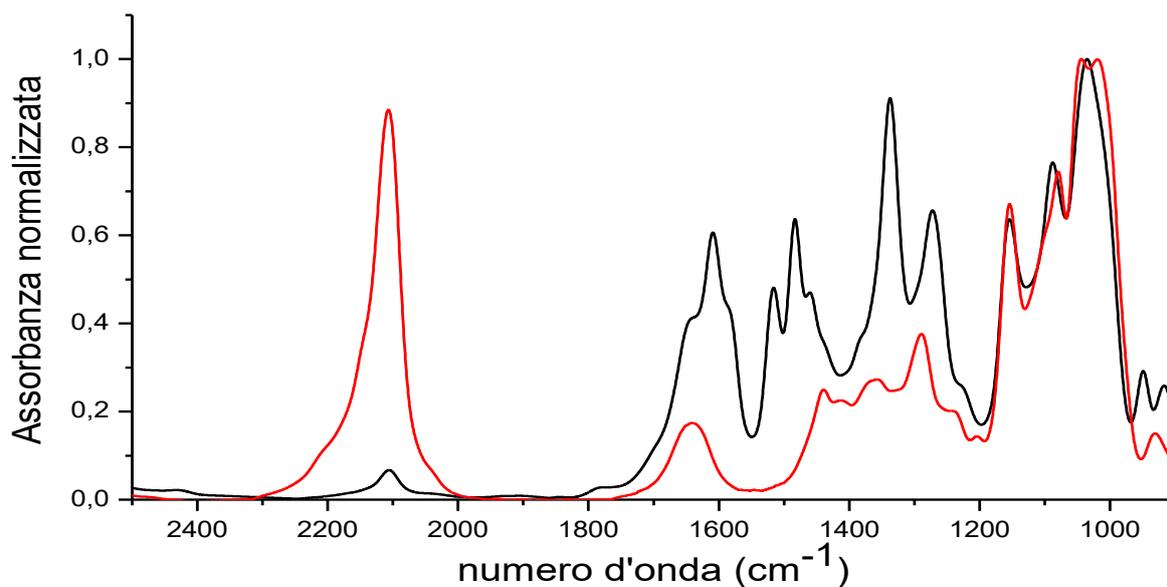


Figura 2.19 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR dell'amilopectina azidata (rosso) e di APSP₁₀₀ (nero), normalizzati rispetto alla banda degli stretching dei C–O di anello, per la determinazione della percentuale di azide residua.

Per rendere inattivi i gruppi azidici residui, i quali, essendo molto instabili, possono facilmente degradarsi anche a temperatura ambiente dando luogo a reazioni di reticolazione all'interno delle catene polimeriche, è stata condotta una seconda reazione di click sui prodotti già cliccati, utilizzando il propargil alcool come reagente. E' stato utilizzato un eccesso di alchino, ossia il doppio, in moli, rispetto ai gruppi azide residui. Questo per favorire il consumo completo dei gruppi azidici. La scelta di PA rispetto a SPCC è stata fatta per evitare problemi di ingombro sterico.

Un'ulteriore analisi infrarossa sui nuovi prodotti di click così ottenuti ha confermato la riuscita di questa seconda reazione, mostrando la scomparsa definitiva del picco a 2105 cm⁻¹ (figura 2.20). Questi prodotti risultanti dalla seconda click verranno chiamati ugualmente con il nome di ASP₁₀₀ e APSP₁₀₀, per questioni di praticità, considerando anche il fatto che, comunque, il grado di funzionalizzazione teorico in spiropirano, per entrambi i polisaccaridi, è superiore al 90%.

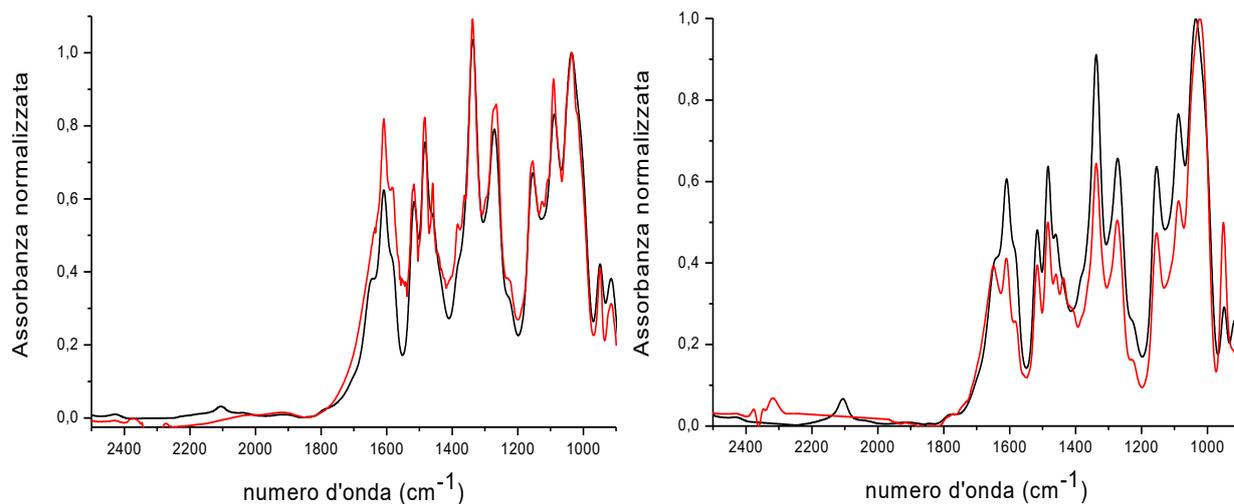


Figura 2.20 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR di ASP_{100} (a sinistra) e $APSP_{100}$ (a destra) dopo la prima reazione di click (curve nere) e dopo la seconda reazione di click (curve rosse), normalizzati rispetto alla banda degli stretching dei C–O di anello.

Gli spettri IR dei due prodotti mostrano anche la comparsa di bande tipiche dello spiropirano nella regione che va da circa 1600 a 1340 cm^{-1} , a conferma dell'avvenuta funzionalizzazione. L'inconveniente dell'incompleto consumo dei gruppi azidici durante la reazione di click non è stato osservato nel caso delle reazioni con solo propargil alcool o con miscele PA/SPCC. Tuttavia in questi casi è stata aggiunta alla miscela di reazione una quantità doppia di ascorbato di sodio rispetto a quella usata per ASP_{100} e $APSP_{100}$, in modo da ridurre i rischi di disattivazione del catalizzatore. Non è quindi possibile asserire che il diverso comportamento sia ascrivibile al minor ingombro sterico dei reagenti alchinnici, piuttosto che alla disattivazione del catalizzatore.

L'analisi attraverso spettroscopia FT-IR di ASP_{40} e $APSP_{40}$ ha mostrato spettri analoghi per i due polisaccaridi (figura 2.21), evidenziando in entrambi la scomparsa della banda azidica. Inoltre, come per ASP_{100} e $APSP_{100}$, gli spettri di ASP_{40} e $APSP_{40}$ mostrano la presenza di picchi dello spiropirano, come ad esempio il picco a 1338 cm^{-1} , caratteristico dell'anello aromatico. Tale dato indica che la scomparsa dell'azide è associabile al grafting dei gruppi fotoreponsivi.

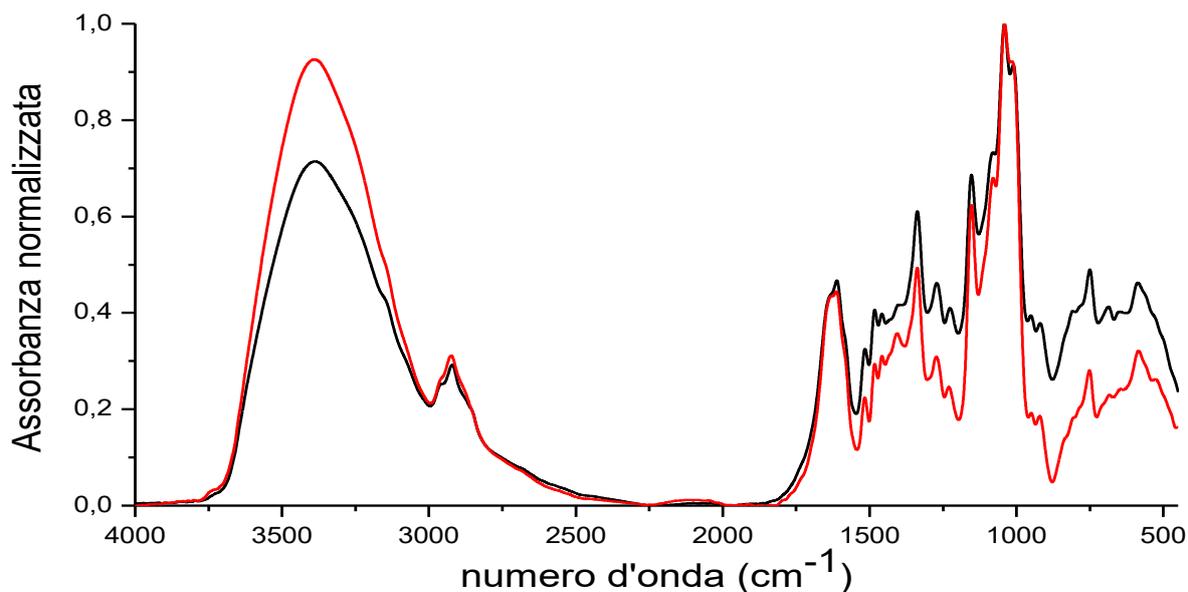


Figura 2.21 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR di ASP₄₀ (nero) e APSP₄₀ (rosso), normalizzati rispetto alla banda a 1041 cm⁻¹.

Anche per quanto riguarda i campioni funzionalizzati al 100% con propargil alcool (APA₁₀₀ e APPA₁₀₀) gli spettri FT-IR hanno evidenziato la scomparsa completa del picco dell'azide (figura 2.22). Tuttavia, a differenza dei campioni funzionalizzati con SPCC, non sono chiaramente individuabili bande attribuibili univocamente al propargil alcool.

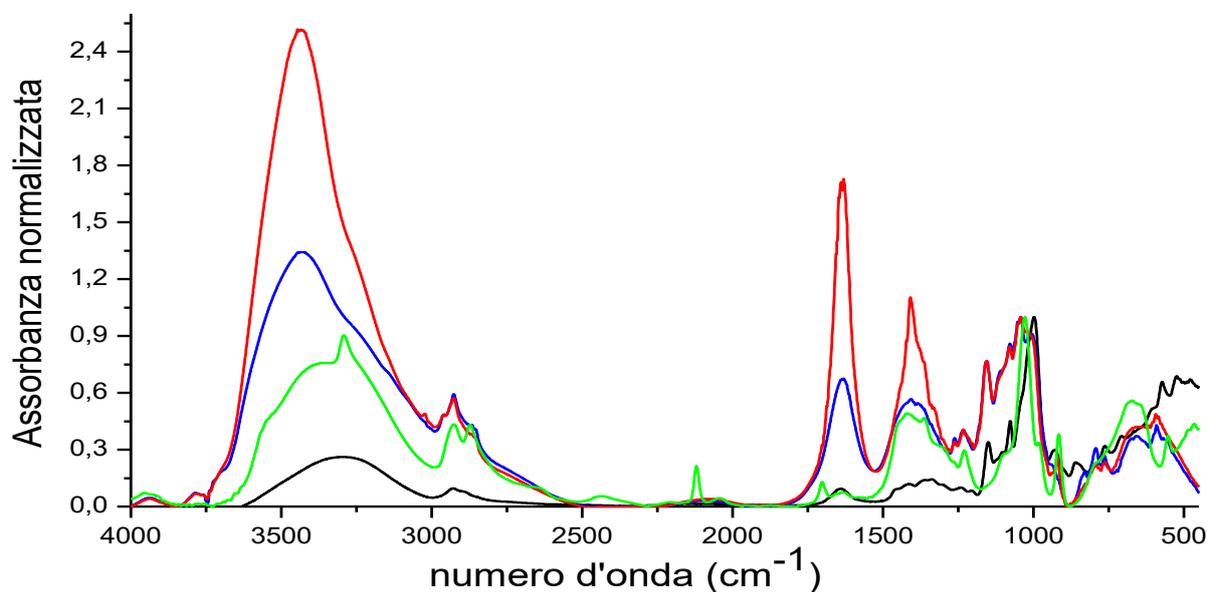


Figura 2.22 – Sovrapposizione degli spettri FT-IR di amiloso (nero), APA₁₀₀ (blu) e APPA₁₀₀ (rosso), normalizzati rispetto alla banda a 1041 cm⁻¹ e del propargil alcool (verde).

Oltre alle evidenze fornite dalla spettroscopia infrarossa, l'avvenuta reazione dei gruppi azidici è indicata anche dai risultati dell'analisi termogravimetrica (figura 2.23), i quali

mostrano la scomparsa dello step degradativo dovuto all'azide e la presenza del solo stadio dovuto alla parte organica del campione.

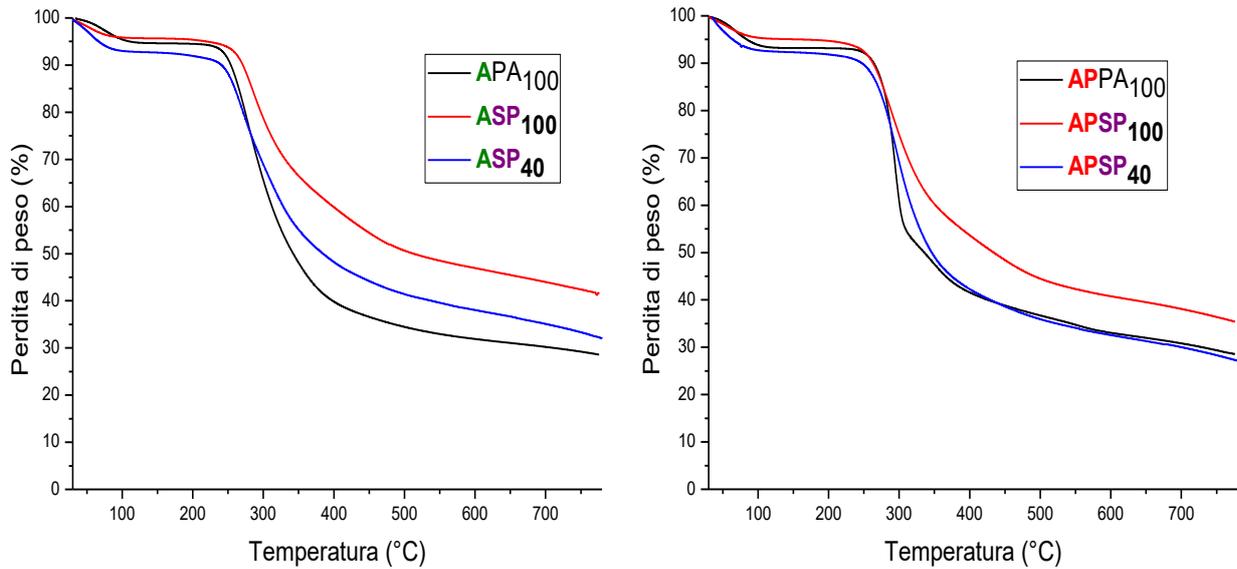


Figura 2.23 – Sovrapposizione dei termogrammi TGA dei prodotti ottenuti dalle reazioni di click: a sinistra quelli a base di amilosio, a destra quelli a base di amilopectina.

In figura 2.24 è riportato come esempio il termogramma di ASP₁₀₀ assieme alla derivata prima della curva sperimentale, che permette di individuare meglio i diversi processi. In particolare, l'iniziale perdita di peso (circa il 4%), con massimo della derivata prima a 53,5 °C, è attribuibile alla perdita d'acqua contenuta nel campione sotto forma di umidità assorbita. Il secondo stadio degradativo si estende in un intervallo di temperature molto più ampio del primo, ed è associato alla decomposizione della parte organica del campione. Questo step ha T_{onset} di circa 260 °C, confrontabile con l'inizio dell'ultimo step degradativo dei polisaccaridi azidati, e ha il suo massimo di velocità di degradazione ($T_{\text{inflection}}$) a circa 284 °C. Il residuo che rimane al termine dell'analisi, pari al 42% del peso iniziale del campione, indica la formazione di composti carboniosi resistenti alla pirolisi in quantità maggiore rispetto ai precursori.

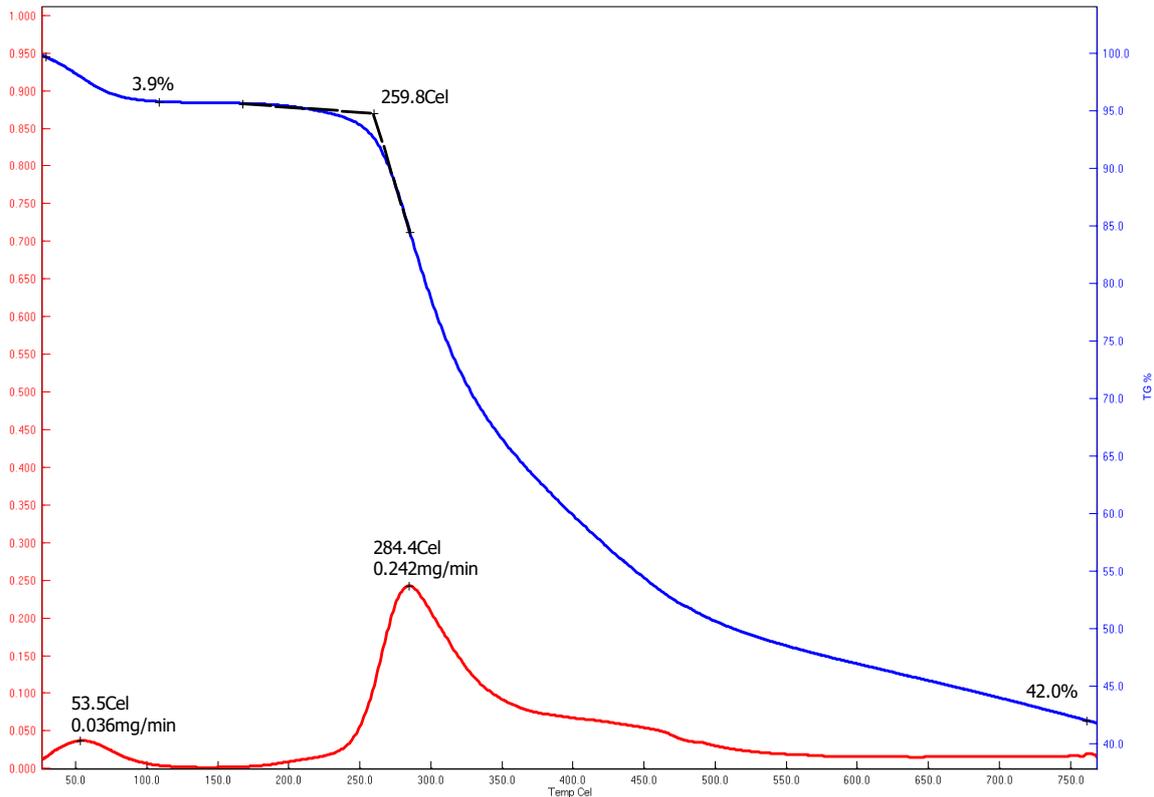


Figura 2.24 – Termogramma TGA di ASP₁₀₀ (blu) e relativa derivata prima (rosso).

In tabella 2.2 sono riportati i valori del contenuto di umidità, della T_{onset} , della $T_{\text{inflection}}$ e il residuo finale a 800°C dei 6 differenti prodotti di click analizzati. Per confronto sono stati riportati anche i valori ottenuti dall’analisi dei polisaccaridi di partenza.

Tabella 2.2 – Dati ricavati dai termogrammi TGA dei 6 prodotti di click.

Campioni	Umidità (%)	T_{onset} (°C)	$T_{\text{inflection}}$ (°C)	Residuo finale (%)
Amilosio	8,2	251,2	278,2	21,9
ASP₁₀₀	3,9	259,8	284,4	42,0
ASP₄₀	6,5	240,8	267,8	31,3
APA₁₀₀	5,1	243,8	278,6	28,8
Amilopectina	10,5	300,4	313,2	7,4
APSP₁₀₀	4,5	252,6	287,9	35,6
APSP₄₀	7,1	263,7	296,4	26,4
APPA₁₀₀	6,6	271,9	292,3	28,6

Dall’analisi dei dati in tabella 2.2 si nota che, in generale, i prodotti dell’amilopectina assorbono più acqua rispetto a quelli dell’amilosio, indicando un carattere maggiormente

idrofobico di quest'ultimo. Sempre per quanto riguarda l'acqua presente sotto forma di umidità nei campioni, si osserva, in generale, che la modifica dei polisaccaridi li rende più idrofobici, e in particolar modo la modifica con spiropirano, i cui derivati hanno una percentuale di umidità assorbita inferiore della metà rispetto ai polisaccaridi non modificati. Anche questo fenomeno è dovuto all'idrofobicità delle molecole di spiropirano in forma chiusa, che rende l'intera struttura macromolecolare più idrofoba.

Per i campioni al 40% di spiropirano e 60% di propargil alcool ci saremmo aspettati valori di umidità intermedi tra quelli dei campioni funzionalizzati solo con l'una o l'altra molecola; tuttavia sperimentalmente questi sono risultati i prodotti con maggior contenuto d'acqua.

La modifica dei polisaccaridi influenza anche la loro stabilità termica, diminuendola, come si può osservare dai valori di T_{onset} , che in generale risultano più bassi per tutti i prodotti modificati, tranne che per l'ASP₁₀₀, per il quale la stabilità termica aumenta.

Questo comportamento indica che la modifica ha effetto non solo sulla struttura chimica ma anche sull'organizzazione strutturale e sulle proprietà chimico-fisiche (densità, dinamica, ecc...), le quali concorrono a determinare la stabilità termica e l'idrofilia dei materiali.

Al fine di definire più in dettaglio la struttura chimica dei prodotti di modifica, sono state eseguite delle analisi NMR. Esse sono state condotte in soluzione per i prodotti modificati con il 100% di propargil alcool che sono risultati solubili. Tuttavia, gli spettri protonici ottenuti mostrano picchi larghi, non sempre attribuibili.

Più diagnostici sono risultati gli spettri al carbonio 13 (figure 2.26 e 2.27). In tali spettri, di entrambi i polisaccaridi modificati, è possibile riconoscere gli stessi segnali presenti negli spettri ¹³C dei reagenti azidati, dovuti ai carboni dell'anello glucopiranosidico (da 1 a 6 in figura 2.26 e 2.27); in aggiunta a questi, nei prodotti si trovano i segnali appartenenti ai 3 carboni del propargil alcool a circa 55, 124 e 147 ppm, attribuibili, nell'ordine, al metilene allilico e ai due carboni del triazolo. Anche in questo caso, per quanto riguarda l'amilopectina, affiancati a quelli principali, si distinguono anche segnali minori dovuti ai carboni delle diverse unità costituenti il polisaccaride, compreso il segnale a circa 60 ppm del C6 dell'unità di ramificazione, il quale è legato ad un atomo di ossigeno.

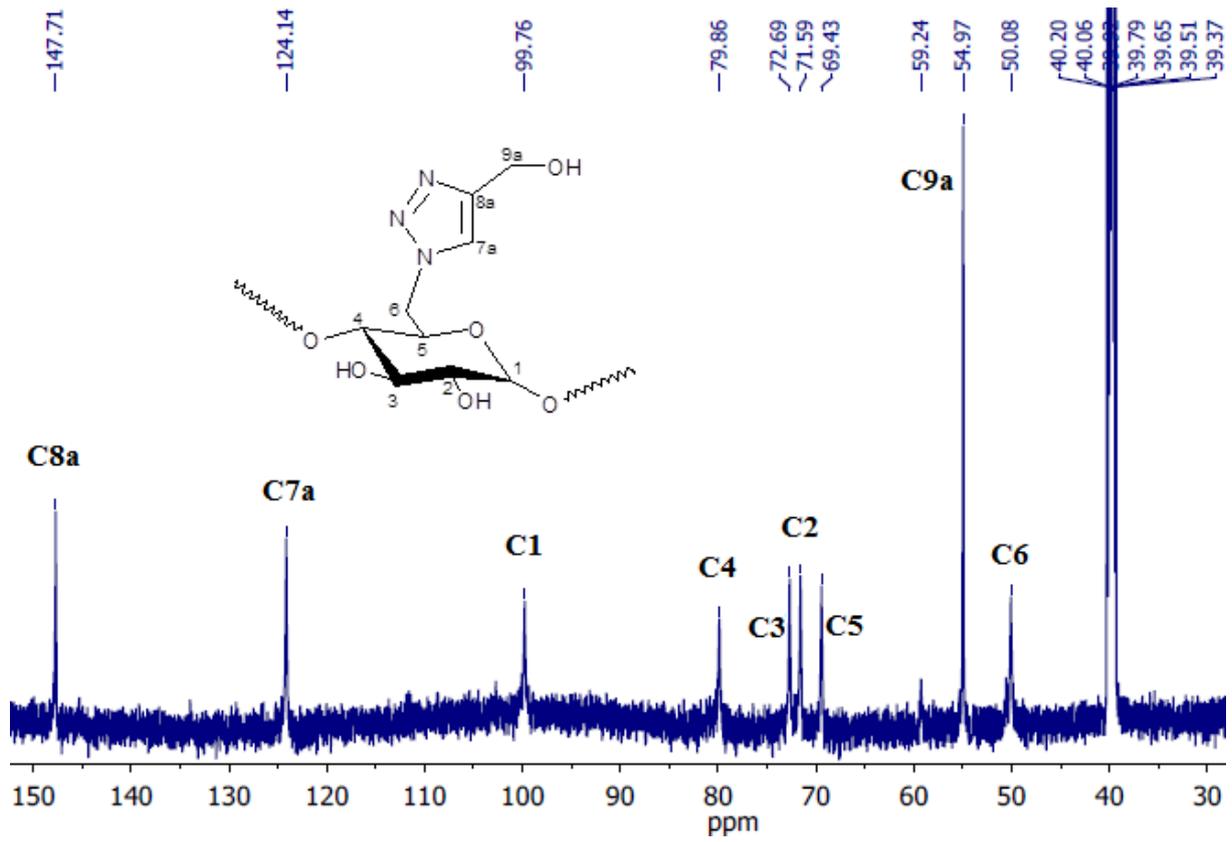


Figura 2.26 – Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ di APA₁₀₀ in DMSO- d_6 .

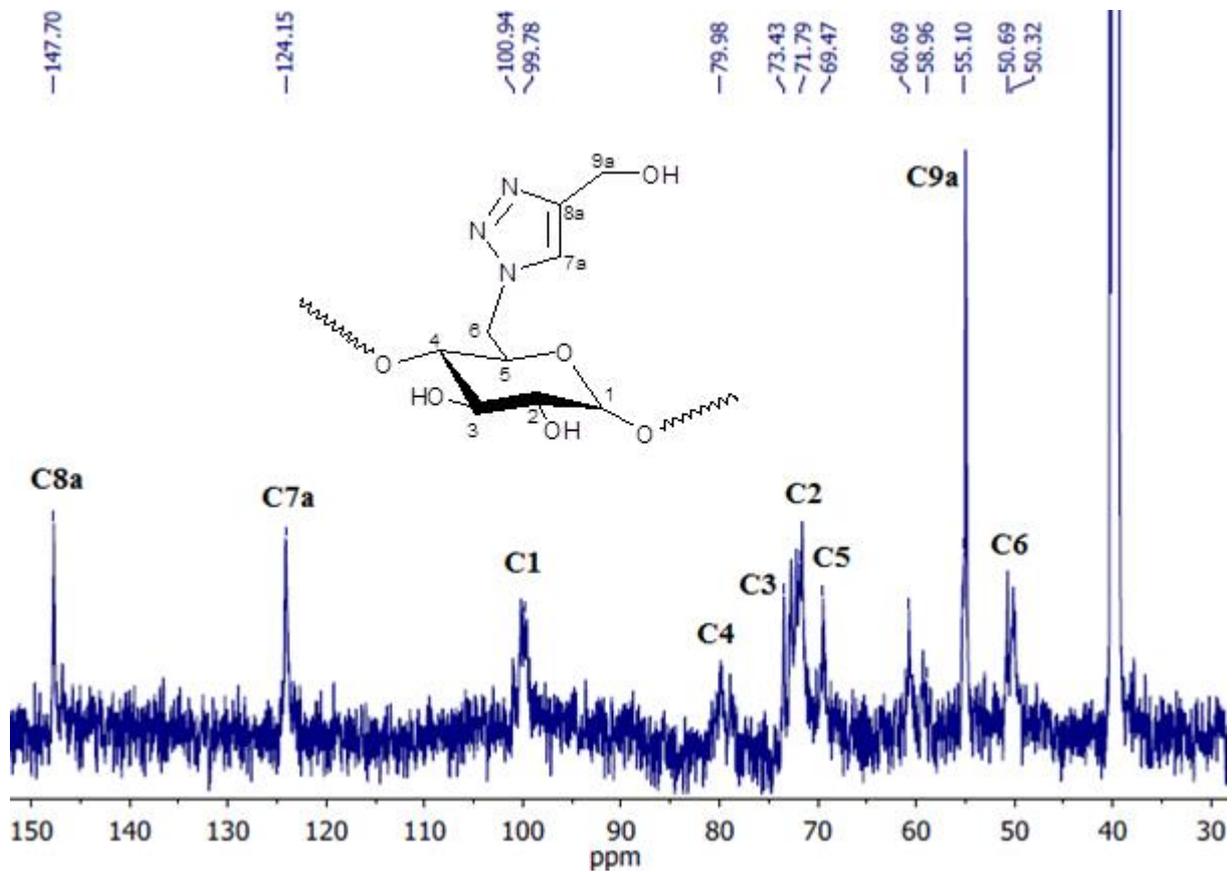


Figura 2.27 – Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ di APPA₁₀₀ in DMSO- d_6 .

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di questi prodotti (figure 2.28 e 2.29), sebbene poco risolti, ci permettono anch'essi di fare delle osservazioni diagnostiche.

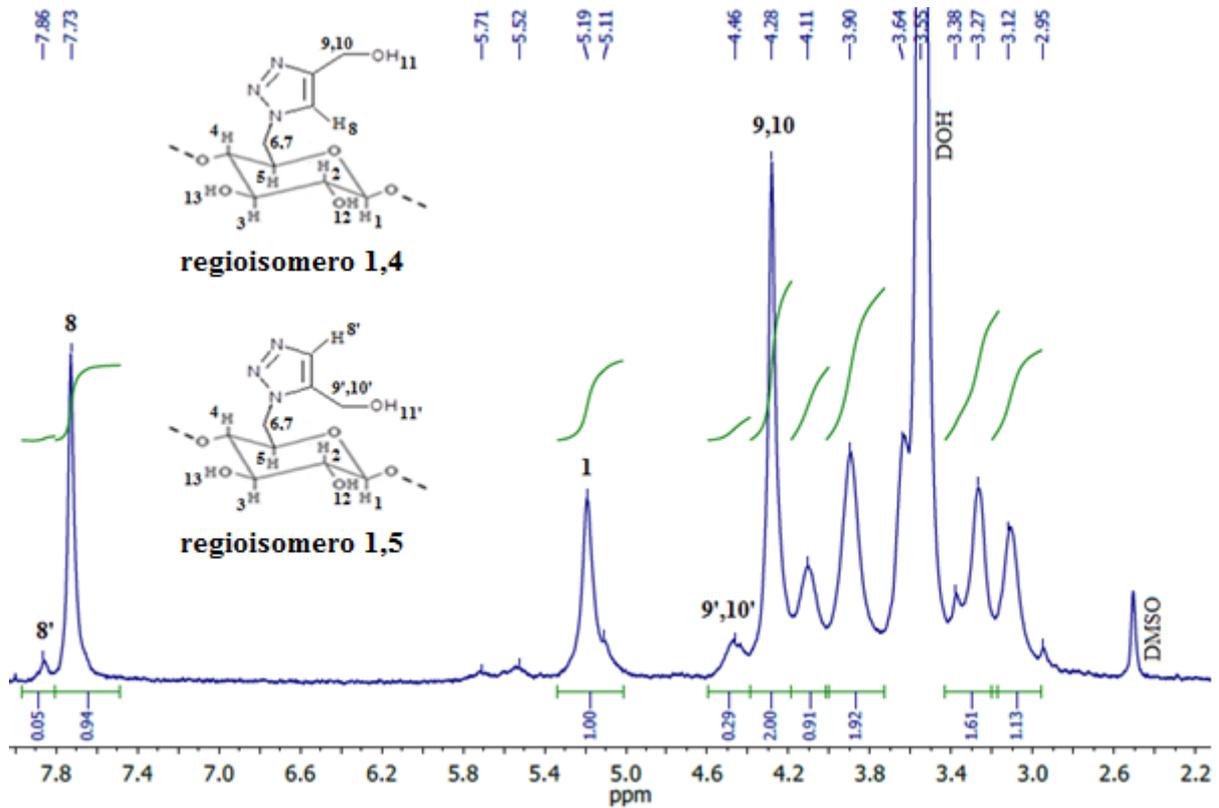


Figura 2.28 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ di APA_{100} in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1.

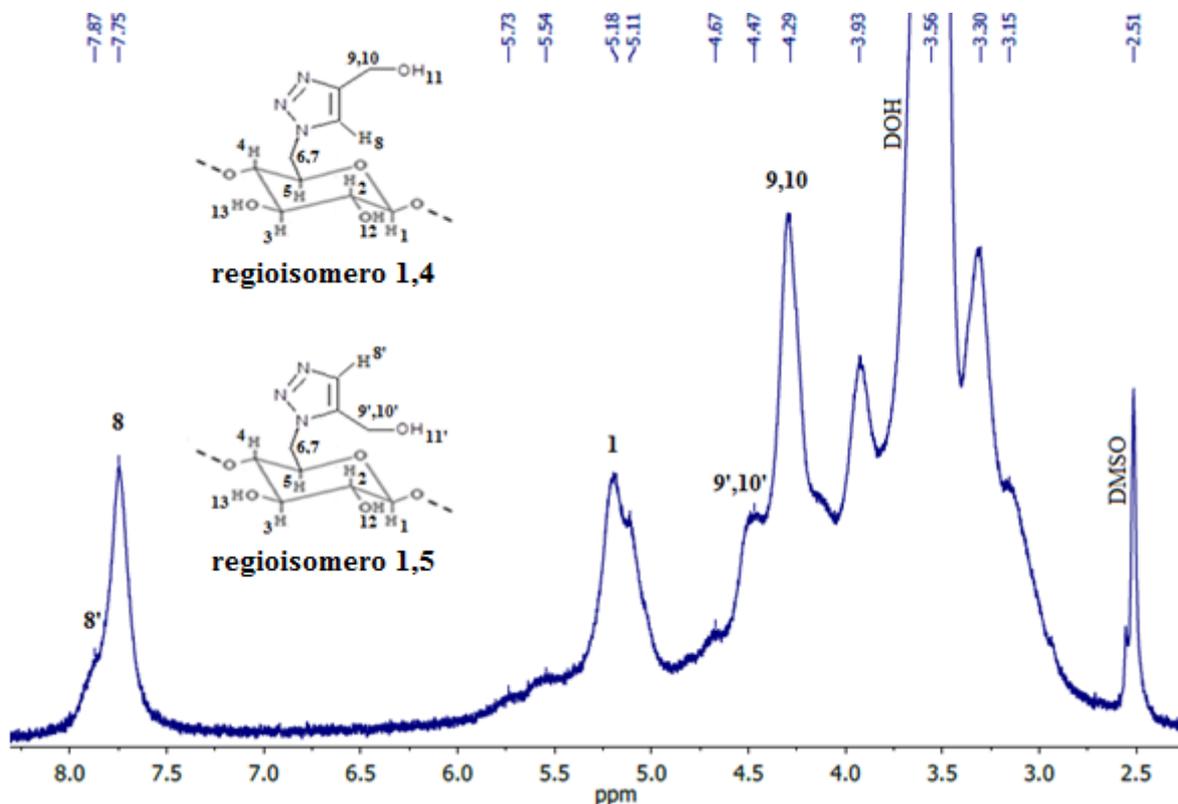


Figura 2.29 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ di APPA_{100} in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1.

In particolare, in entrambi si osserva la presenza di un picco intenso a circa 7,7 ppm attribuibile al protone dell'anello triazolico¹³⁶, che indica chiaramente la riuscita della reazione di click. Inoltre negli spettri si distinguono i protoni anomericici a 5,19 ppm per APA₁₀₀ e a 5,18 ppm per APPA₁₀₀, e i due protoni del gruppo metilenico del propargil alcool (9 e 10 nelle figure 2.28 e 2.29). L'attribuzione di quest'ultimi è basata sul risultato della mappa bidimensionale H-C HSQC di APA₁₀₀ riportata in figura 2.30, in cui è possibile osservare una correlazione tra il protone a 4,28 ppm ed il carbonio con chemical shift a circa 55 ppm e tra il protone a 7,73 ppm ed il carbonio risonante a circa 125 ppm. Questo conferma anche l'attribuzione dei segnali dei carboni nello spettro ¹³C-NMR nelle figure 2.26 e 2.27.

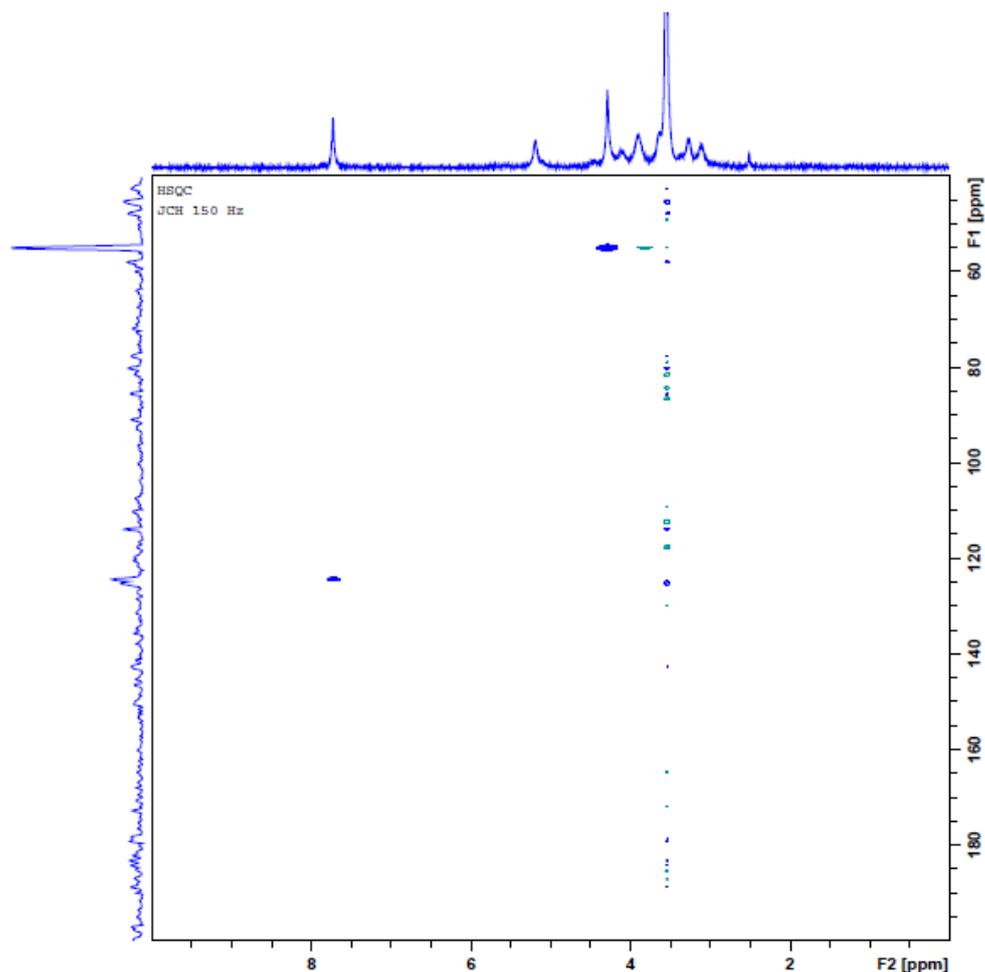


Figura 2.30 – Mappa bidimensionale H-C HSQC di APA₁₀₀ con costanti di accoppiamento geminali C-H di 150 Hz.

Negli spettri protonici (figure 2.28 e 2.29), affiancati al picco dei protoni metilenici e a quello del protone triazolico troviamo un secondo segnale molto meno intenso del vicino. E' stato ipotizzato che essi siano attribuibili al regioisomero 1,5 (vedi paragrafo 1.6 introduzione), formato per cicloaddizione non regioselettiva, che in una certa misura si verifica anche in presenza di catalizzatore¹²⁵. Il protone del regioisomero 1,5 del triazolo dovrebbe avere

spostamento chimico diverso rispetto a quello dell'isomero 1,4. L'intensità molto bassa di questi segnali indica che, comunque, l'inserzione preferenziale è quella che dà origine all'isomero 1,4. L'incompleta regioselettività in presenza del catalizzatore di rame può essere attribuita alla stabilizzazione attraverso legame ad idrogeno tra l'idrossile del propargil alcool del regioisomero 1,5 e l'anello glucopiranosidico. Dalla stima, se pur approssimativa, data dai valori degli integrali dei protoni triazolici dei due regioisomeri rispetto al protone anomero, si può stimare che circa il 5% delle unità glicosidiche sia funzionalizzata con isomeri triazolici 1,5 ed il restante 95% con isomeri 1,4.

Per quanto riguarda gli altri segnali, si notano variazioni notevoli di chemical shift rispetto a quelli degli spettri dei rispettivi polimeri non modificati. Questi spostamenti sono in accordo con la trasformazione del gruppo in C6 in triazolo. Tuttavia, sulla base delle informazioni disponibili non è possibile fare un'assegnazione certa di questi segnali.

Infine, si notano i picchi dei protoni residui degli OH in C2 e in C3 che non hanno scambiato completamente con il deuterio dell'acqua deuterata. La presenza di tali segnali conferma che essi non sono stati interessati dalla modifica, almeno non in modo quantitativo.

Gli spettri protonici dei derivati di amilosio funzionalizzati con il 40 e il 100% di spiropirano sono riportati nelle figure 2.31 e 2.32. A causa della presenza di un numero elevato di segnali, l'attribuzione risulta più complicata rispetto agli spettri dei prodotti precedenti. Esaminando lo spettro di ASP_{100} , nella regione che va da circa 1 ppm a 1,4 ppm cadono i 6 protoni dei due gruppi metilici dello spiropirano (18 e 19 in figura 2.31); i segnali a circa 4,1 ppm potrebbero essere attribuiti ai protoni metilenici dell'ex alchino (9 e 10 in figura 2.31); a 5,11 troviamo il segnale caratteristico del protone anomero dell'unità glicosidica; il picco a circa 5,9 ppm può essere attribuito al protone indicato con 21 in figura 2.31; nella regione che va da 6,3 ppm a circa 8,2 ppm troviamo la serie di segnali dovuti ai protoni aromatici dello spiropirano, oltre a quello triazolico a 7,7 ppm (indicato con 8 in figura). A 7,87 ppm si può notare un picco che ritroviamo, meglio identificabile, anche nello spettro di ASP_{40} e che era presente anche negli spettri dei campioni al 100% di propargil alcool, attribuibile al protone triazolico del regioisomero 1,5.

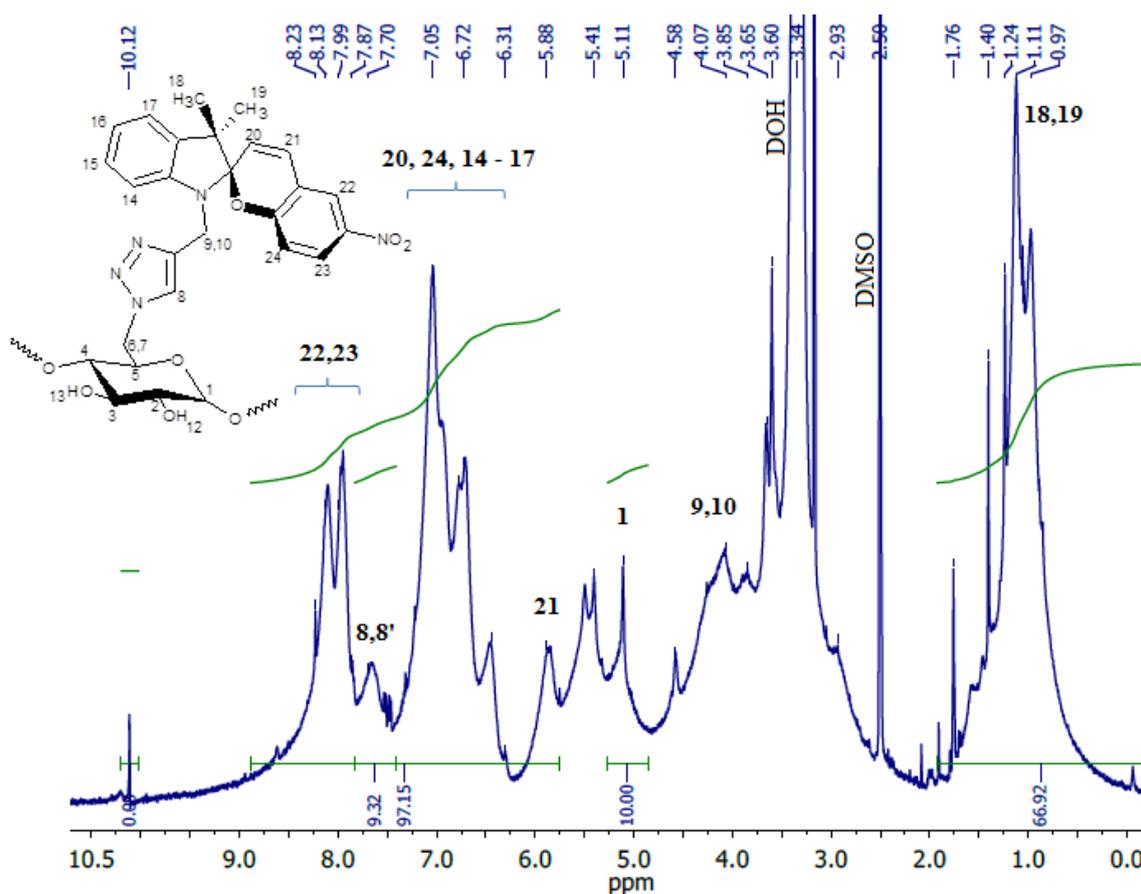


Figura 2.31 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ di ASP_{100} in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1.

I valori degli integrali in questa regione, comprendente gli 8 protoni dello spiropirano e 1 triazolico, se confrontati con quelli nella regione dei 6 protoni metilici dello spiropirano, sono in ragionevole accordo con l'attribuzione fatta, considerando l'approssimazione dovuta alla qualità relativamente modesta della linea di base dello spettro.

Inoltre, il rapporto tra i segnali attribuibili allo spiropirano e i protoni anomerici della catena saccaridica, nonostante la bassa risoluzione dello spettro, sono in buon accordo con i valori attesi per un grafting completo (> 90%) in ASP_{100} e (circa il 40%) in ASP_{40} .

I restanti segnali ai quali non è stato possibile dare un'attribuzione certa potrebbero essere dovuti alla risonanza dei protoni dell'isomero in forma aperta dello spiropirano, il quale è presente in una certa misura in soluzione, anche senza l'esposizione del campione alla radiazione ultravioletta.

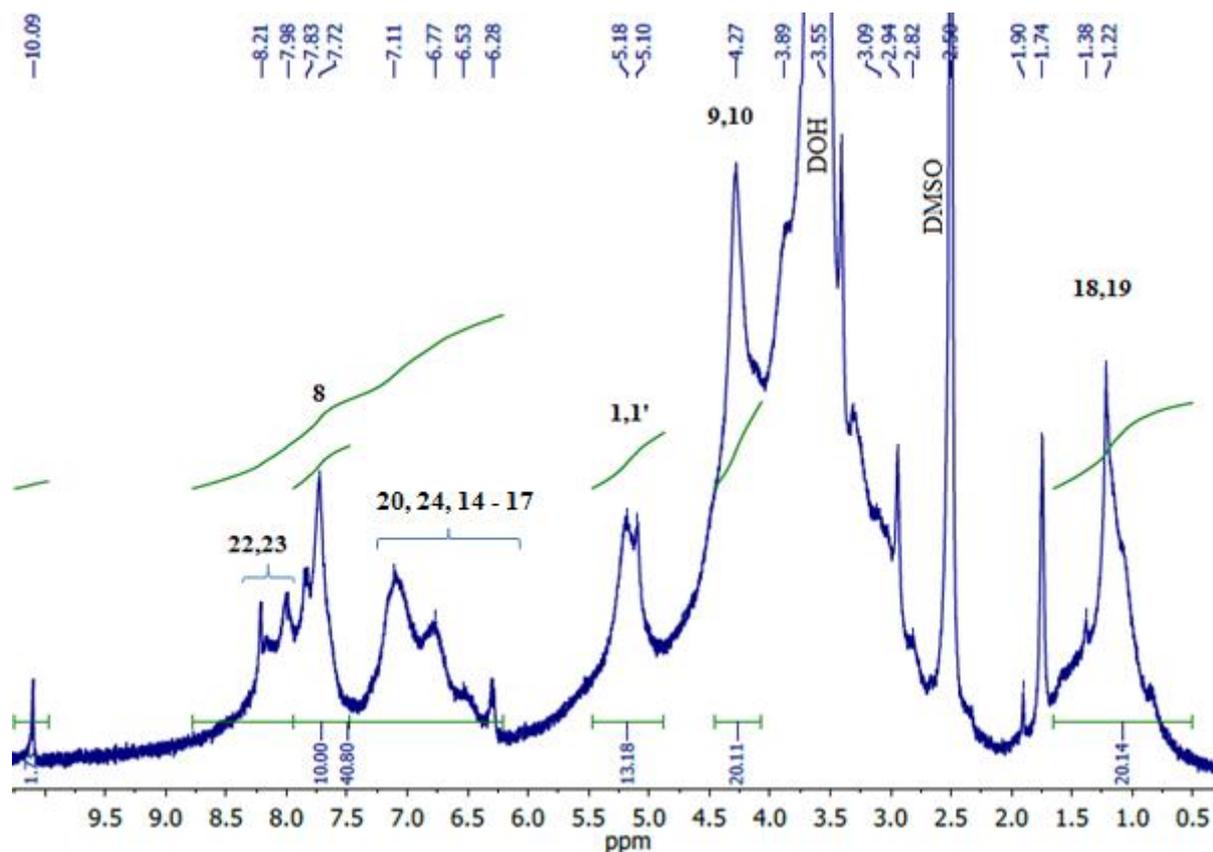


Figura 2.32 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ di ASP_{40} in $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1.

L'assenza di segnali nella regione dei 2 ppm sia nello spettro di ASP_{40} che di ASP_{100} , caratteristici del protone dell'alchino terminale presente nei reagenti, ci porta a concludere che la totalità dello spiropirano contenuto nei campioni sia legato covalentemente al polimero e non inglobato al suo interno, o almeno che eventuale spiropirano in forma non legata sia presente in quantità trascurabile.

In figura 2.33 sono riportati gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ a Stato Solido (SSNMR) di ASP_{100} e ASP_{40} , oltre a quelli dell'amilosio tal quale, registrato precedentemente¹⁵³. Gli spettri riportati sono stati registrati sia mediante Cross Polarization (CP), esperimento che sfrutta il trasferimento di magnetizzazione dai nuclei ^1H ai nuclei ^{13}C , che per Eccitazione Diretta (DE) dei nuclei ^{13}C , utilizzando in questo secondo caso un recycle delay corto tra due scansioni successive (5 s). Le condizioni scelte per registrare gli spettri CP e DE qui riportati tendono a favorire, rispettivamente, i segnali di nuclei in ambienti molecolari caratterizzati da scarsa ed elevata mobilità. La spiegazione di questo risiede nelle caratteristiche del processo CP e nelle proprietà di rilassamento dei nuclei ^{13}C , la cui discussione va oltre gli scopi di questa tesi. Nessuno dei due tipi di spettri può essere considerato intrinsecamente quantitativo, ma come vedremo in seguito sarà comunque possibile fare alcune valutazioni semi-quantitative.

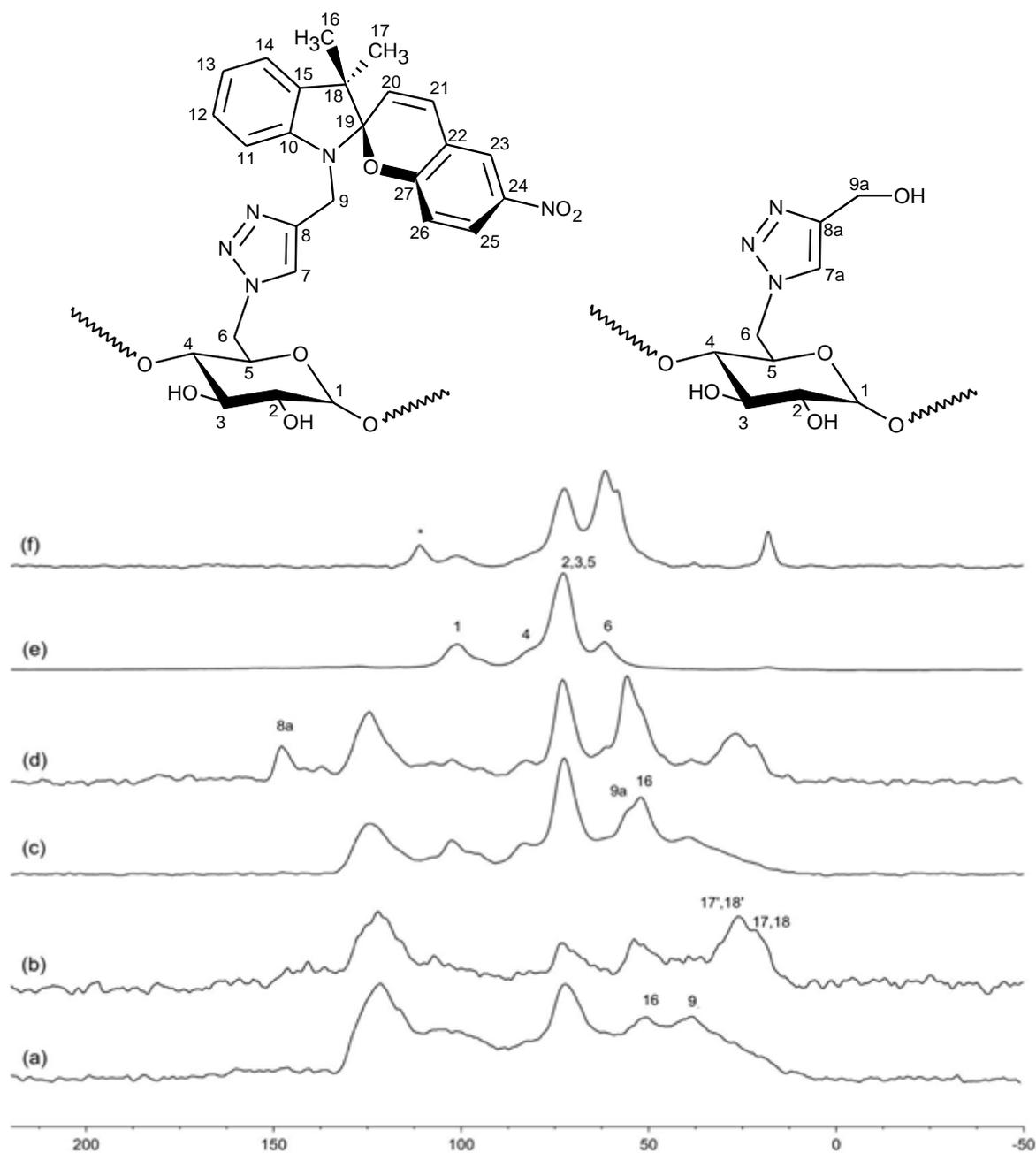


Figura 2.33 – Spettri ^{13}C SSNMR di ASP_{100} , ASP_{40} e dell'amilosio. In particolare in (a) e (b) sono riportati rispettivamente gli spettri ^{13}C CP-MAS e ^{13}C DE-MAS di ASP_{100} , in (c) e (d) gli spettri ^{13}C CP-MAS e ^{13}C DE-MAS di ASP_{40} , in (e) ed (f) gli spettri ^{13}C CP-MAS e ^{13}C DE-MAS dell'amilosio. I numeri contrassegnati con un apice sono relativi ai carboni dello spiropirano in forma aperta.

Lo spettro CP di ASP_{100} presenta una scarsa risoluzione, dovuta ad una notevole larghezza di riga intrinseca dei segnali, a sua volta derivante dal carattere estremamente amorfo del campione. Tuttavia è possibile riconoscere alcuni segnali significativi. In particolare, dal confronto con lo spettro CP dell'amilosio è possibile riconoscere i segnali di quest'ultimo

approssimativamente tra 70 e 100 ppm. Per quanto riguarda lo spiropirano, i suoi carboni aromatici danno origine al picco intenso e largo centrato a circa 123 ppm, mentre a circa 39 e 51 ppm è possibile riconoscere due segnali attribuibili ai carboni 16 ($C(CH_3)_2$) e 9 (NCCCN). Intorno a 50 ppm dovrebbe inoltre risuonare il carbonio 6 dell'amilosio reagito, il cui segnale potrebbe essere non distinguibile da quello del carbonio 9. Lo spettro DE permette inoltre di osservare chiaramente il segnale dei gruppi metilici, centrato a circa 23 ppm, poco visibile nello spettro CP a causa di una scarsa intensità e notevole larghezza di riga. Il chemical shift e la larghezza di questo segnale suggeriscono la possibile presenza di una miscela di spiropirano reagito in forma aperta e in forma chiusa, i cui metili dovrebbero risuonare rispettivamente a circa 25 e 18 ppm. La risoluzione spettrale scarsa e la differenza relativamente piccola tra i chemical shift dello spiropirano reagito e non reagito impediscono di considerare i segnali osservati rigorosamente diagnostici dell'avvenuta reazione tra spiropirano e amilosio, tuttavia essa è suggerita da diversi elementi: oltre alla scomparsa dei gruppi N_3 osservata mediante IR, la sostanziale assenza del segnale del protone alchिनico a circa 2 ppm negli spettri 1H e nello spettro DE dei carboni del gruppo alchिनico a circa 70-80 ppm, una certa rigidità dell'intorno dei carboni 9/9', indicata dalla scarsissima intensità del loro segnale nello spettro DE, nonché la presenza di una significativa quantità di spiropirano, indicata dall'intensità dei suoi segnali nello spettro CP. Sebbene gli spettri CP non possano essere considerati, come si è detto, rigorosamente quantitativi, le intensità dei segnali osservati sono infatti compatibili con la presenza di una quantità comparabile di amilosio e spiropirano.

Per quanto riguarda il campione ASP_{40} , dal confronto tra il suo spettro CP e quello di ASP_{100} sono evidenti una diminuzione del rapporto di intensità tra i segnali dei carboni aromatici dello spiropirano e dei carboni 2, 3, 5 dell'amilosio, in accordo con la diversa composizione dei campioni e la comparsa di un segnale centrato a circa 56 ppm, attribuibile al carbonio 9a del propargil alcool, la cui intensità è compatibile con una quantità di alcool paragonabile a quella del polisaccaride. Questo segnale è molto evidente anche nello spettro DE, compatibilmente con la sua possibile elevata mobilità. Il dato più importante è la comparsa nello spettro DE di un segnale a 148 ppm assegnabile al carbonio 8a dell'alcool, che dimostra l'avvenuta reazione con l'amilosio. Inoltre è di nuovo osservabile il segnale dei carboni metilici compatibile con la presenza delle forme aperte e chiuse dello spiropirano.

E' ampiamente riportato in letteratura che la cicloaddizione-1,3 rame catalizzata, specialmente utilizzata sui polimeri, abbia l'inconveniente di lasciare nei prodotti di reazione residui di catalizzatore, anche dopo lunga purificazione^{161,162,163}. Inoltre, complessi di Cu(II) possono innescare reazioni di depolimerizzazione del polisaccaride¹⁶³, attraverso ossido-riduzioni con meccanismo radicalico.

Allo scopo di verificare e quantificare l'eventuale presenza di rame residuo dalla reazione di click sono in corso, presso laboratori esterni, delle misure di ICP-MS su ciascun prodotto di reazione. Inoltre, per ottenere informazioni sulla struttura delle eventuali specie di Cu(II) presenti nei diversi prodotti sono state condotte misure di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) in banda X presso uno dei laboratori dell'Istituto ICCOM del CNR di Pisa. L'EPR è infatti una tecnica spettroscopica utilizzata per identificare sia radicali liberi che specie paramagnetiche presenti in campioni di varia natura anche a seguito di reazioni chimiche o prodotti da radiazioni esterne.

La forma aperta dello spiropirano (MC) è in grado di legare selettivamente ioni Cu^{2+} (vedi paragrafo 1.3.2.3), potenzialmente in grado di innescare reazioni di dimerizzazione tra molecole di spiropirano¹⁶⁴ (figura 2.34), attraverso un processo ossido-riduttivo.

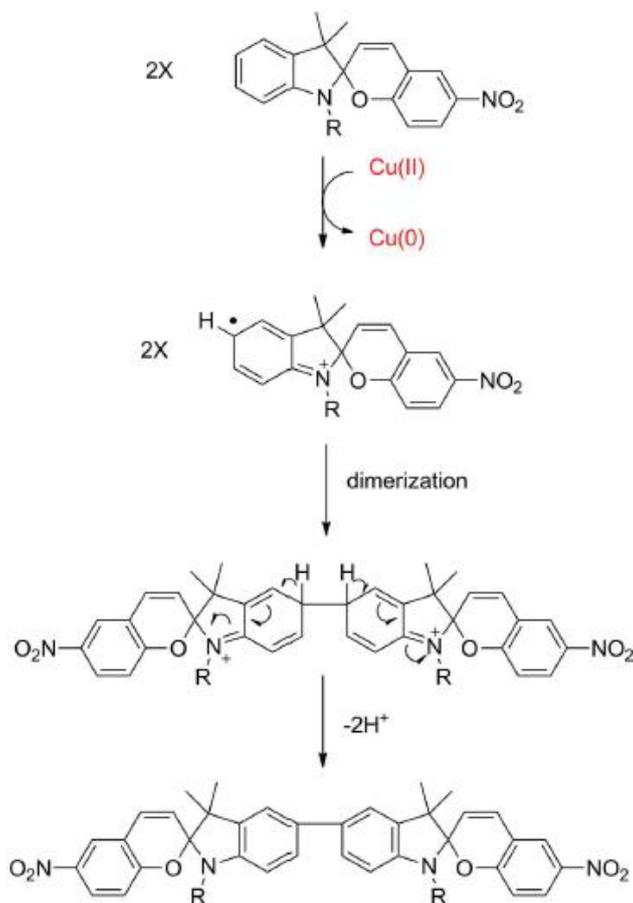


Figura 2.34 – Meccanismo di dimerizzazione via formazione di radicali.

I risultati dell'analisi EPR, effettuata sui composti allo stato solido, sono riportati nelle figure 2.35 e 2.36.

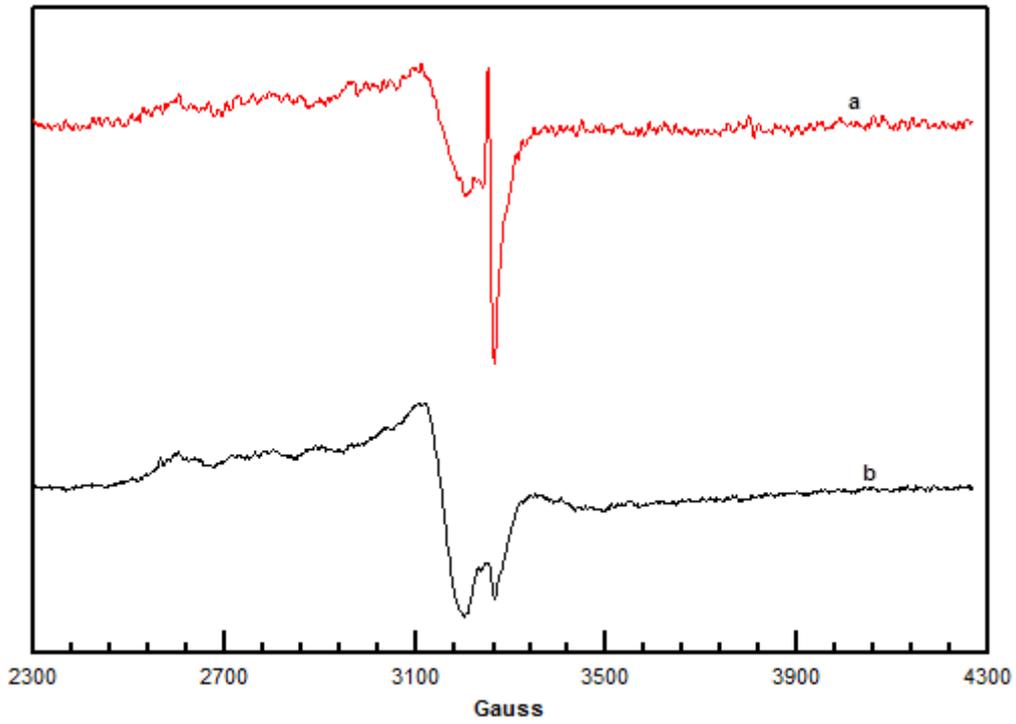


Figura 2.35 – Spettri EPR di (a) ASP_{100} e (b) ASP_{40} .

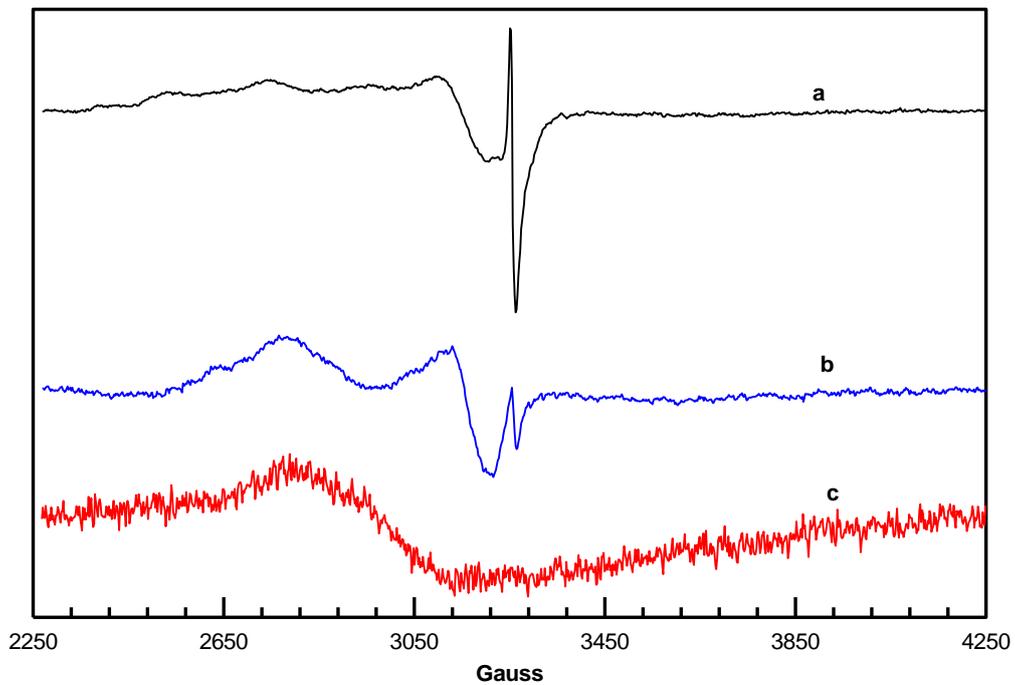


Figura 2.36 – Spettri EPR di (a) $APSP_{100}$, (b) $APSP_{40}$ e (c) $APPA_{100}$.

Tutti i campioni derivanti da reazione di click mostrano segnali EPR eccetto l'amilosio funzionalizzato al 100% con il propargil alcool (APA₁₀₀, il cui spettro, essendo privo di segnali, non è riportato). In tutti gli spettri è presente almeno un segnale attribuibile a Cu(II)¹⁵³ (figure 2.35 e 2.35) anche se la forma dello spettro è diversa per prodotti con diverso grado di funzionalizzazione con spiropirano e propargil alcool. In particolare, nello spettro di APPA₁₀₀ è presente un solo segnale molto largo centrato a $g \sim 2.2$ attribuibile a ioni Cu(II) inglobati all'interno della struttura polisaccaridica, probabilmente coordinati a gruppi OH¹⁵³. La mancanza di un segnale analogo in APA₁₀₀ sembrerebbe indicare la migliore capacità dell'amilosio di rilasciare il Cu(II) nelle procedure di purificazione grazie alla struttura meno ramificata. Lo stesso segnale è ben osservabile nello spettro di APSP₄₀ e potrebbe essere presente, anche se con bassa intensità, negli spettri degli altri campioni, mascherato da un più intenso segnale attribuibile a Cu(II) in complessi con geometria piramidale quadrata, in cui l'elettrone spaiato è nell'orbitale fondamentale $d_{x^2-y^2}$ e i tensori g e iperfine hanno simmetria assiale con $g_{//} > g_{\perp} > 2.0023$ ¹⁵³. La struttura iperfine, derivante dall'accoppiamento dello spin elettronico con lo spin nucleare del Cu (sia l'isotopo ⁶³Cu che quello ⁶⁵Cu hanno spin 3/2) è ben visibile nella regione parallela (2200 – 3000 Gauss). Il fitting dello spettro EPR di APSP₁₀₀ (figura 2.37) fornisce i seguenti parametri magnetici per il Cu(II) in questa forma:

Fattore g $g_{//} = 2.3034$, $g_{\perp} = 2.0784$;
 Costante Iperfine $A_{//} = 214.94$ Gauss , $A_{\perp} = 4.85$ Gauss.

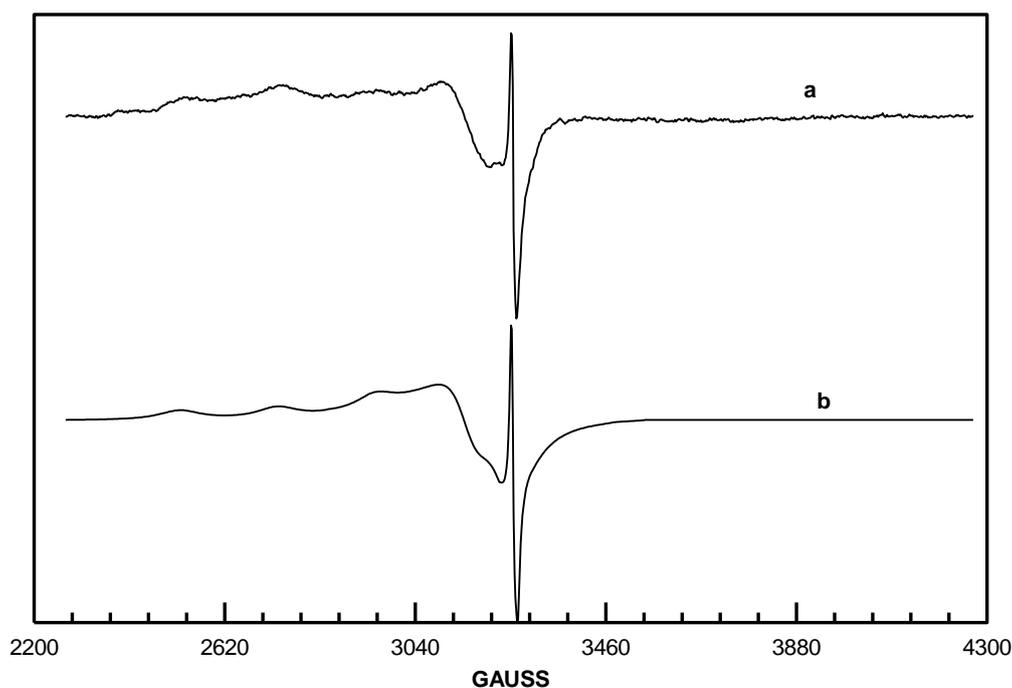


Figura 2.37 – Spettri EPR di APSP₁₀₀ (a) sperimentale e (b) simulato.

I valori ottenuti sono compatibili con una coordinazione del Cu(II) a PMDETA mediante azoto e ad altri gruppi coordinanti azotati ed ossigenati del polimero (triazolo e merocianina). Sapendo che il rame si coordina soltanto all'isomero carico, MC, dello spiropirano⁸⁰⁻⁸⁶, si può ipotizzare che nei composti solidi in cui è presente lo spiropirano lo ione metallico si trovi coordinato alle mero cianine, la cui presenza è testimoniata dal colore violetto della polvere di polimero.

Infine, nei composti modificati con spiropirano si osserva la presenza nello spettro EPR di un segnale molto più stretto a $g \sim 2.003$. Esso è stato attribuito, per forma e posizione, alla presenza di un radicale organico. È interessante osservare che sia il segnale attribuito al radicale organico che quello del rame coordinato con simmetria assiale sono più intensi negli spettri dei composti a più alto grado di modifica in molecola fotoattiva, considerando uguali parametri di acquisizione degli spettri e quantità di campione paragonabili.

Anche per il radicale organico è stata eseguita una simulazione della forma di riga del segnale (figura 2.38), che ha fornito i parametri spettroscopici riportati in tabella 2.3..

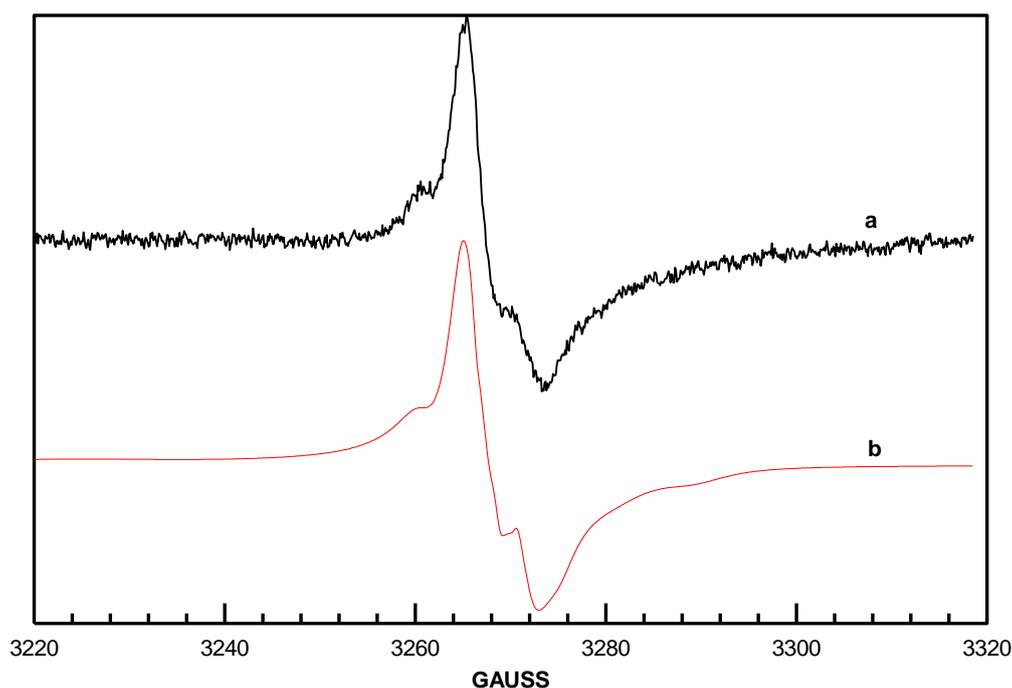


Figura 2.38 – Spettri EPR del radicale organico in ASP_{100} (a) sperimentale e (b) simulato.

Tabella 2.3 – Valori di g e della costante di accoppiamento iperfine (A) ricavati dal fitting del segnale del radicale organico nello spettro EPR di ASP₁₀₀ solido, e corrispondenti valori di A calcolati mediante DFT.

Parametri spettroscopici		
g	$g_{\text{iso}} = 2.00325$	
Costante Iperfine		
Nucleo	Sperimentale	Calcolato
N	$A_{\text{iso}} = 4.40 \text{ G}$	4.25 G (N1)
H	$A_{\text{iso}} = 4.80 \text{ G}$	4.71 G (H8)
H	$A_{\text{iso}} = 5.71 \text{ G}$	5.96 G (H17)

Allo scopo di indagare la natura del radicale organico sono stati eseguiti calcoli DFT (Density Functional Theory), utilizzando il software Spartan '10, per l'ottimizzazione della geometria molecolare e per la densità di spin del radicale. I valori delle costanti iperfini calcolati sono ragionevolmente simili a quelli sperimentali (tabella 2.3) e corrispondono ad un radicale di natura cationica la cui densità elettronica è distribuita prevalentemente sull'atomo di azoto N1 e sugli atomi di idrogeno H8 e H17 (figura 2.39).

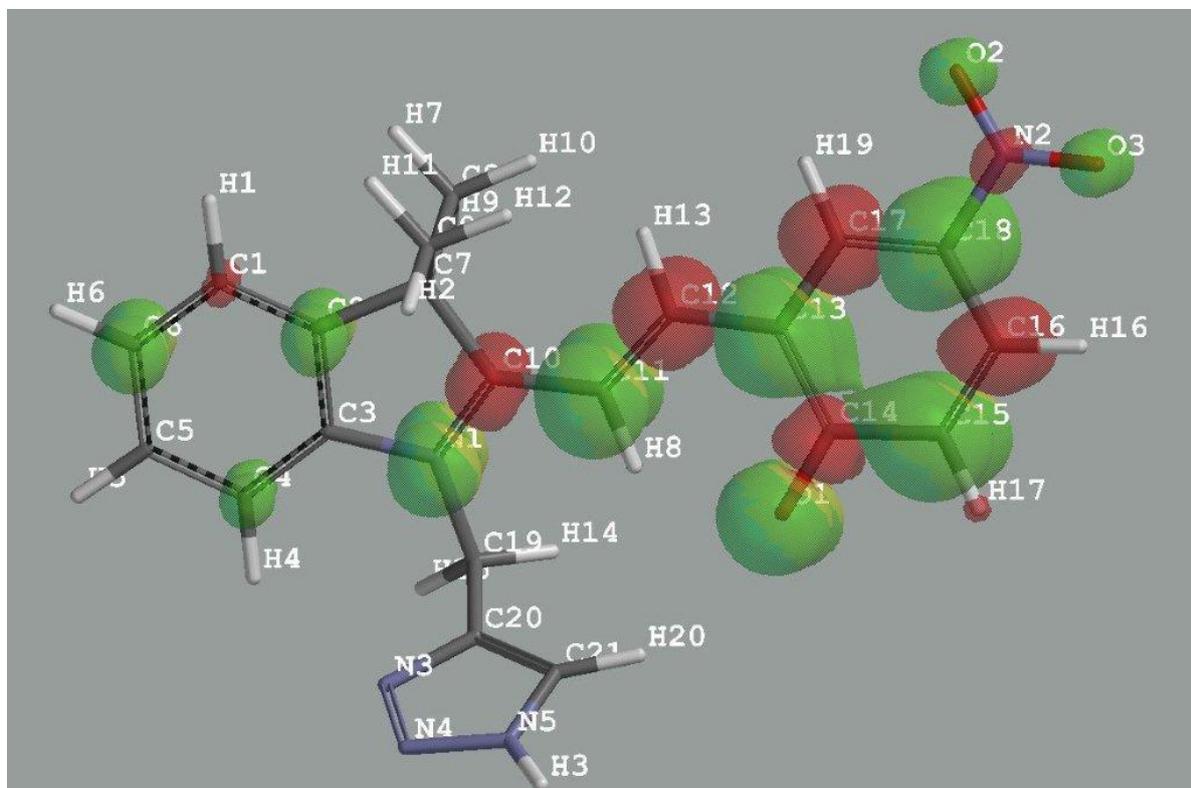


Figura 2.39 – Struttura del radicale catione in cui è evidenziata la densità di spin di superficie calcolata mediante DFT. Rosso: densità di spin negativa (0.001 electron/au³); verde: positiva (0.002 electron/au³).

Inoltre, per indagare la possibile genesi del radicale organico, sono state fatte prove di irraggiamento con lampada UV sul campione APSP₄₀. In figura 2.40 sono riportati gli spettri EPR del radicale organico sia prima che dopo aver sottoposto il campione a 10 minuti di irraggiamento. Come si osserva dagli spettri, l'intensità del segnale del radicale cresce dopo l'irraggiamento, ad indicare che il radicale si forma in presenza di irraggiamento UV.

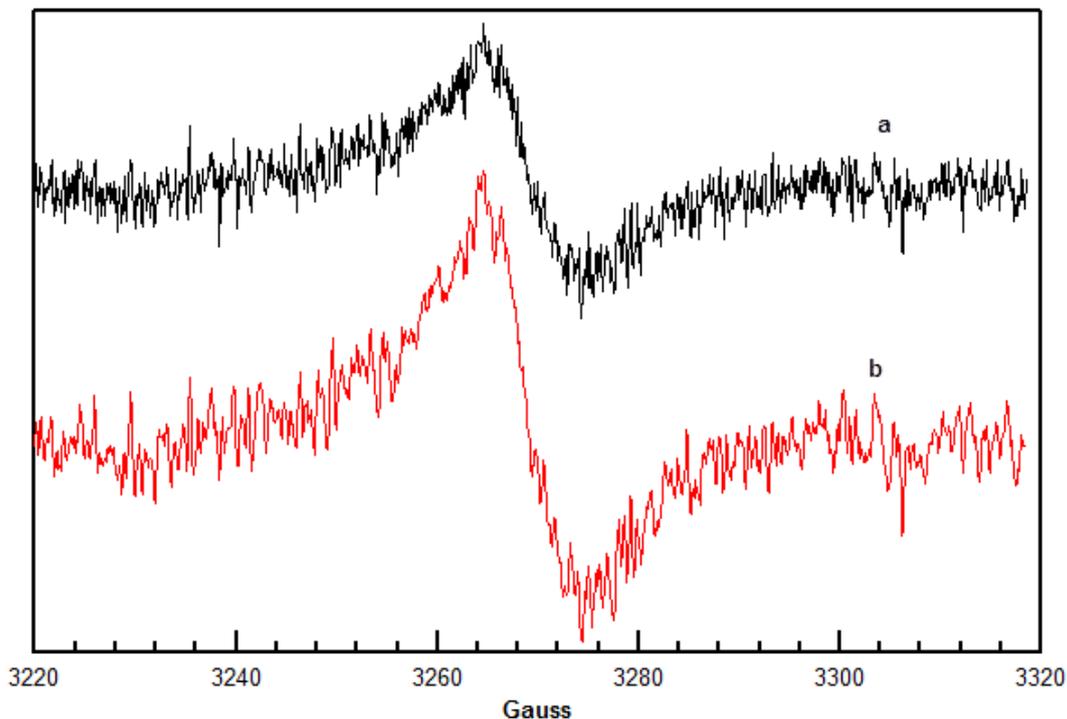


Figura 2.40 – Spettro EPR del catione radicale di a) APSP₄₀; b) APSP₄₀ dopo 10 minuti di irraggiamento UV.

Per spiegare il meccanismo di formazione di tale radicale organico è stata avanzata l'ipotesi che la concomitante presenza di rame(II) e l'irraggiamento con luce UV inneschi un processo ossido-riduttivo in cui una specie di Cu(II) ossida la merocianina, riducendosi a Cu(I). Quest'ultima specie, trovandosi in aria, è instabile e può essere facilmente riossidata a Cu(II) ad opera dell'ossigeno. Si osservi che lo stesso esperimento condotto in soluzione di DMSO non ha fornito segnali rilevabili all'analisi EPR, probabilmente a causa dell'elevata instabilità del radicale in soluzione.

Poiché il segnale della specie radicalica è stato osservato all'interno di campioni solidi, in cui la mobilità molecolare è ridotta, si deve ipotizzare che il rame responsabile del processo di ossido-riduzione sia legato alla merocianina per giustificare la reazione tra le due specie.

Al fine di corroborare le ipotesi di generazione del radicale organico in futuro saranno condotte ulteriori indagini su sistemi modello.

2.3 STUDIO DELLE PROPRIETA' OTTICHE DEI PRODOTTI FOTOATTIVI IN SOLUZIONE

2.3.1 Prove di solubilità

Prima di iniziare lo studio delle proprietà ottiche dei composti preparati è stata valutata la loro solubilità in diversi solventi.

Le prove di solubilità sono state condotte in DMSO, DMF H₂O e THF. I solventi sono stati scelti sulla base di risultati di uno studio condotto precedentemente nel laboratorio, il quale aveva mostrato come l'amilosio funzionalizzato con il solo spiropirano (DS ~ 0,4) fosse solubile in DMSO e DMF, non solubile in H₂O e mostrasse un comportamento intermedio in THF. In questo solvente, infatti, la solubilità diminuisce dopo irraggiamento.

Per le prove sono stati miscelati i polimeri ed i solventi in rapporto di 0,1 mg/mL e le miscele sono state lasciate in agitazione a 70 °C (60 °C nel caso del THF) per 24 ore. Dopo questo periodo di tempo per ogni campione è stato registrato lo spettro UV/Vis; successivamente il campione è stato sottoposto ad un altro riscaldamento a 70 °C per altrettante ore e ne è stato registrato nuovamente lo spettro. Questo ciclo di operazioni è stato ripetuto fino al raggiungimento della massima solubilizzazione possibile in ogni solvente, indicato dal fatto che non si osservano più sostanziali variazioni dei valori della linea di base a 750 nm negli spettri UV/Vis.

Come si può osservare dalle figure 2.41 e 2.42, tutti i campioni hanno raggiunto la loro massima solubilizzazione (corrispondente ad un minimo assorbimento di fondo, a 750 nm, dovuto allo scattering da parte delle particelle indissolte) nei solventi dopo 48 ore di agitazione a 60 o 70 °C, ad eccezione del DMSO, in cui già dopo 24 ore la linea di base non subisce più variazioni.

I derivati dell'amilosio sono risultati più solubili di quelli dell'amilopectina in tutti i solventi tranne in acqua, in cui hanno mostrato pari solubilità.

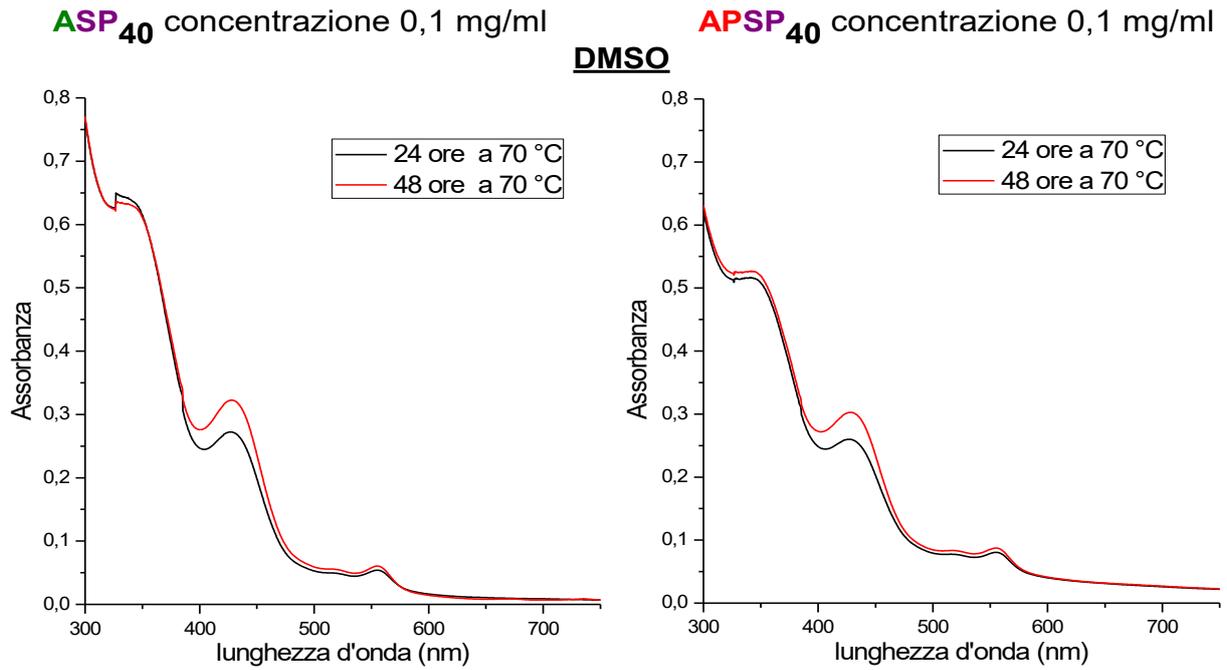


Figura 2.41 – Prove di solubilità in DMSO per ASP₄₀ (a sinistra) e APSP₄₀ (a destra), alla concentrazione di 0,1 mg/mL.

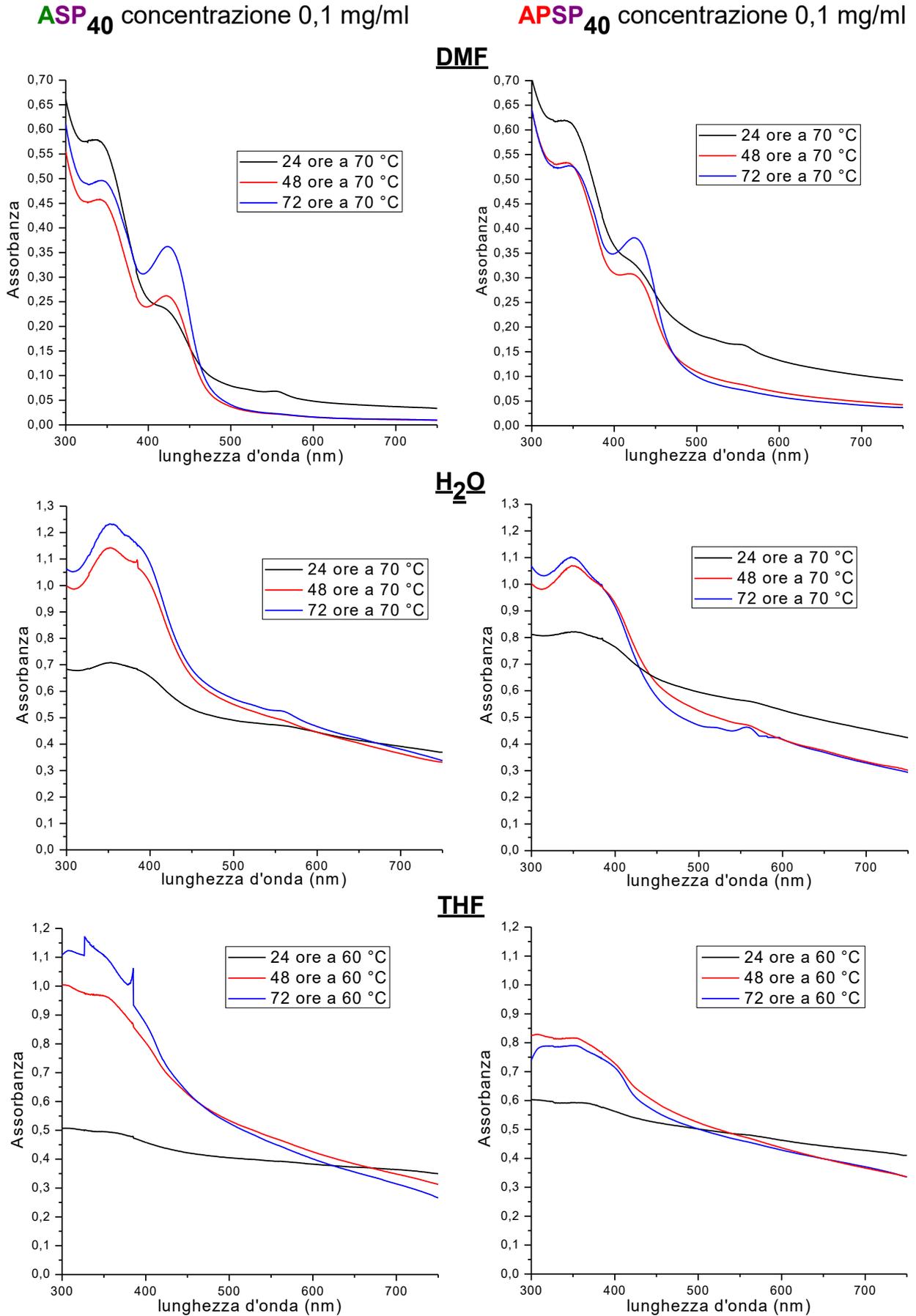


Figura 2.42 – Prove di solubilità in DMF, H₂O e THF per ASP₄₀ (a sinistra) e APSP₄₀ (a destra), alla concentrazione di 0,1 mg/mL.

Dal confronto dello scattering a 750 nm negli spettri, si osserva che i campioni in DMSO, oltre a raggiungere la massima solubilizzazione già dopo 24 ore di agitazione, hanno solubilità maggiore rispetto agli altri solventi; pertanto si è deciso di preparare altre soluzioni alla stessa concentrazione di 0,1 mg/mL, ma in questo caso per diluizione con i vari solventi di una soluzione madre di ASP_{40} in DMSO a concentrazione di 10 mg/mL.

Il confronto tra gli spettri delle soluzioni preparate in questo modo e di quelle ottenute sciogliendo il campione direttamente nel solvente di misura (figura 2.43), mostra che partendo dalla soluzione madre in DMSO il processo di solubilizzazione e presumibilmente anche la solubilità stessa sono migliorati, come si vede dallo scattering che in questi casi è molto minore, in particolare per quanto riguarda l' H_2O e il THF. Tale comportamento è probabilmente attribuibile alla minore dimensione e miglior solvatazione degli aggregati e/o dei “coil” macromolecolari generati per dispersione di una soluzione del polimero in un buon solvente, come il DMSO, in un solvente meno efficace.

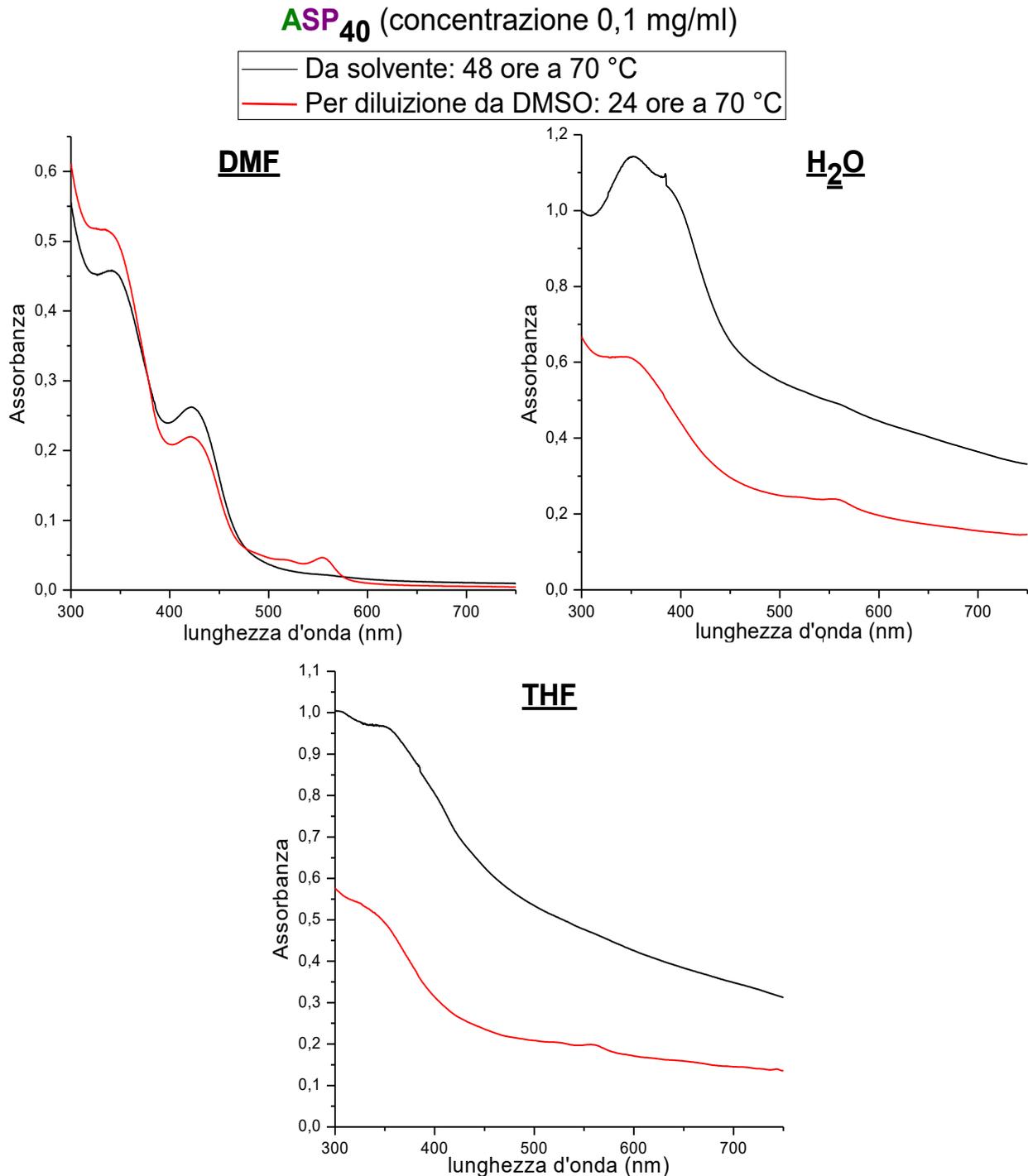


Figura 2.43 – Confronto tra gli spettri delle soluzioni di ASP₄₀ a concentrazione 0,1 mg/mL in DMF, H₂O e THF, ottenute direttamente nel solvente di misura (curve in nero) o preparate da diluizione di una soluzione madre in DMSO (curve in rosso).

Visti i migliori risultati ottenuti dalle prove di solubilità partendo dalla soluzione madre in DMSO, si è deciso di utilizzare questo metodo per preparare le soluzioni per i successivi studi ottici. Inoltre, si è deciso di proseguire il successivo studio spettroscopico UV/Vis in soluzione soltanto sui prodotti di click dell'amilosio, ritenuti più promettenti e più adatti, in

quanto risultati maggiormente solubili nei solventi studiati rispetto ai derivati dell'amilopectina.

2.3.2 Studio delle proprietà spettroscopiche e di solubilità dei composti quando esposti alla luce UV

Le soluzioni per l'analisi tramite spettroscopia UV/Vis sono state realizzate da una soluzione madre di DMSO, solvente in cui l'amilosio modificato è risultato essere più solubile. Questa soluzione madre, a concentrazione di 10 mg/mL, è stata ottenuta lasciando sciogliere il polimero all'interno del solvente per 24 ore, mantenendolo in agitazione alla temperatura di 70 °C. Dopodiché, per diluizione nei diversi solventi di misura, sono state ottenute le soluzioni per lo studio ottico.

Nel caso dei campioni di ASP_{100} , la concentrazione è stata fissata a 0,06 mg/mL, in modo da avere la stessa concentrazione di gruppi spiropirano ($1,11 \cdot 10^{-4}$ M) presente nei campioni in soluzione di ASP_{40} . La concentrazione di quest'ultimo campione è stata invece fissata a 0,1 mg/mL in quanto ottimale per avere un valore di assorbanza che non andasse oltre 1, sopra la quale le deviazioni dalla legge di Lambert-Beer (equazione 2.1) non sono più trascurabili.

$$(A = \epsilon \cdot l \cdot c) \quad (2.1)$$

Le soluzioni ottenute sono state analizzate sia prima dell'irraggiamento con luce ultravioletta sia dopo irraggiamento. Gli spettri di ASP_{40} e ASP_{100} non irraggiati, nei diversi solventi, sono riportati in figura 2.44.

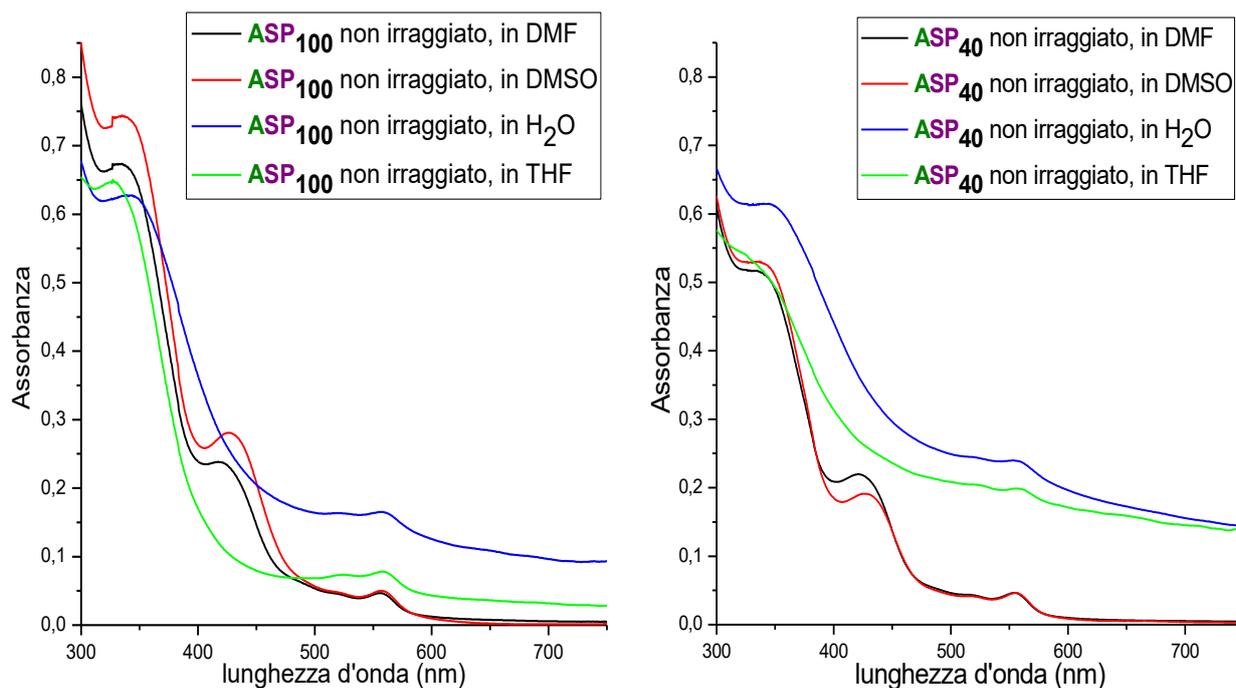


Figura 2.44 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₁₀₀ (a sinistra) e di ASP₄₀ (a destra) non irraggiati, in 4 solventi.

Gli spettri in DMF e in DMSO dei due derivati dell'amilosio sono molto simili tra loro. Essi presentano una banda localizzata nella regione da 320 a 350 nm corrispondente all'assorbimento della parte cromenica della molecola di spiropirano¹⁶⁵; una banda poco intensa centrata a circa 560-570 nm, attribuita all'assorbimento della forma merocianinica che, a causa della sua struttura planare e della sua estesa coniugazione, è situata nella regione del visibile; infine, si osserva una banda centrata a circa 420-430 nm, che può essere attribuita all'assorbimento della forma protonata della merocianina (MCH⁺)¹⁶⁵. Quest'ultima banda non è visibile negli spettri registrati in H₂O e in THF, nei quali tuttavia i due polimeri sono poco solubili. Infatti, tutte le soluzioni danno scattering di luce, come evidenzia bene la linea di base a 750 nm che, seppur non vi siano assorbimenti, corrisponde ad una assorbanza non nulla.

Per quanto riguarda l'acqua, è molto probabile che il campione abbia bassa solubilità a causa della natura idrofobica dell'isomero SP dello spiropirano.

Nel caso del THF è probabile che la scarsa solubilità sia dovuta all'amilosio, il quale non è solubile in questo solvente; tuttavia lo scattering meno intenso rispetto a quello dei campioni in acqua, suggerisce che la natura apolare dell'isomero SP dello spiropirano contribuisca in una certa misura ad una maggiore solubilizzazione in THF. Tale ipotesi è confermata dall'aumento di solubilità al crescere del grado di funzionalizzazione con unità di SP.

Negli spettri registrati dopo aver irraggiato i campioni con una lampada UV si osserva un netto incremento di intensità della banda centrata a circa 560-570 nm, dovuta all'assorbimento della forma aperta MC dello spiropirano¹⁶⁵ (figura 2.45). La presenza di questa banda anche nei campioni non sottoposti a irraggiamento è attribuibile al fatto che una parte di residui di spiropirano si trova in forma aperta già nei campioni allo stato solido, come è evidente dal colore viola della polvere dei polimeri; inoltre non si può escludere che una, seppur piccola, frazione di residui di spiropirano possa aver subito fotoisomerizzazione per effetto delle pur brevi esposizioni alla luce dell'ambiente, durante la preparazione della soluzione e la sua introduzione nella cuvetta di misura.

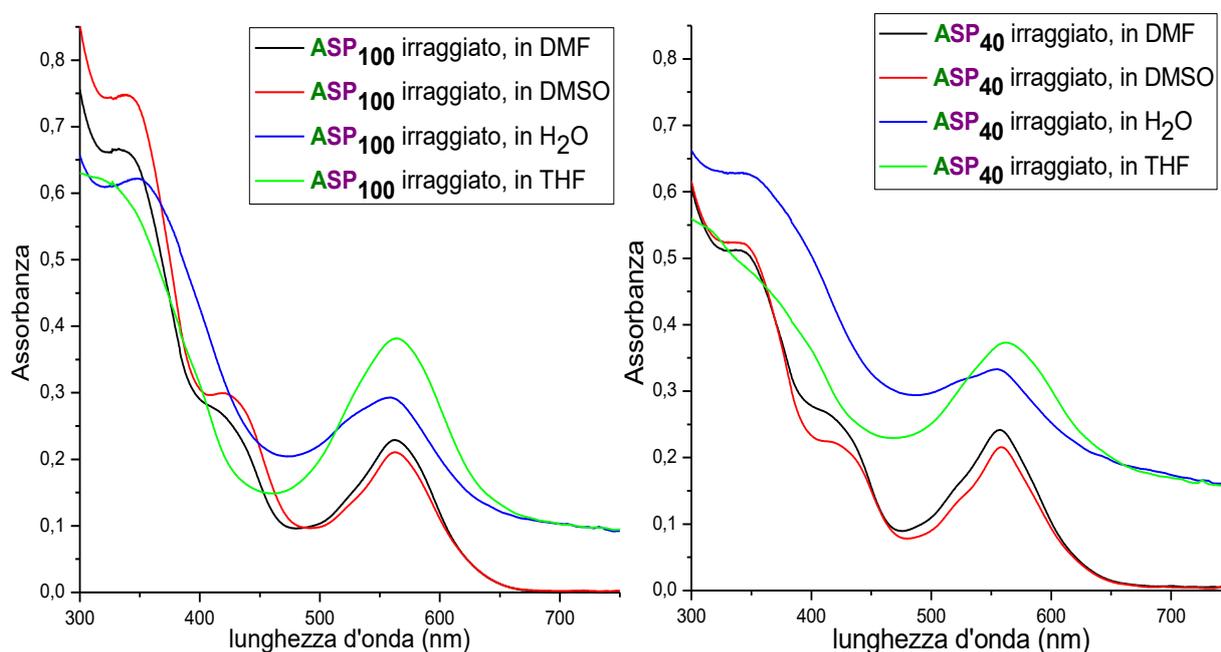


Figura 2.45 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₁₀₀ (a sinistra) e di ASP₄₀ (a destra) in 4 solventi, dopo irraggiamento con luce UV.

I valori di assorbanza della banda a circa 340 nm registrati per i vari campioni sciolti in uno stesso solvente sono risultati maggiori in ASP₁₀₀ che in ASP₄₀; unica eccezione il solvente acquoso, in cui essi sono risultati confrontabili ($A = 0,63$) (figura 2.44). Tale differenza permane dopo irraggiamento (figura 2.45). Al contrario l'intensità della banda della merocianina a 560-570 nm, che si forma a seguito dell'irraggiamento UV, è analoga per i due polimeri sia in DMSO che in DMF.

Uguali valori di assorbanza (A), a parità di concentrazione di SP in soluzione, corrisponderebbero ad un uguale valore di coefficiente di estinzione molare (ϵ), nelle condizioni in cui è valida la legge di Lambert-Beer (equazione 2.1). Nel nostro caso i diversi dati sperimentali di assorbanza possono essere discussi come diversi valori di ϵ della specie

SP. Le differenze riscontrate nei sistemi a diverso grado di funzionalizzazione in uno stesso solvente potrebbero essere spiegate considerando la diversità di intorno chimico di SP. E' infatti noto che i valori di ϵ dipendono dalla costante dielettrica del mezzo/intorno in cui una specie si trova e il diverso rapporto tra spiropirano e unità glucosidiche in ASP_{100} e in ASP_{40} corrisponde ad un diverso rapporto idrofobico/idrofilico, che si può tradurre in piccole differenze di costante dielettrica.

In H_2O e in THF gli effetti di ϵ sono sovrapposti a quelli di solubilità, per cui sono più difficilmente razionalizzabili. In ogni caso è interessante osservare che anche in questi solventi le ϵ sono più alte in ASP_{100} che in ASP_{40} .

La posizione precisa del massimo del picco della banda merocianinica dipende, anche se in modo lieve, dal solvente. Si osserva, così, il cosiddetto effetto solvatocromico, generalmente mostrato da questa classe di molecole, il quale è dovuto alla variazione di polarità dell'ambiente in cui si trovano le specie cromatiche. La posizione esatta di questa banda è dettata dai relativi contributi delle due forme di risonanza della merocianina, ovvero quella chinoide e quella zwitterionica (figura 2.46).

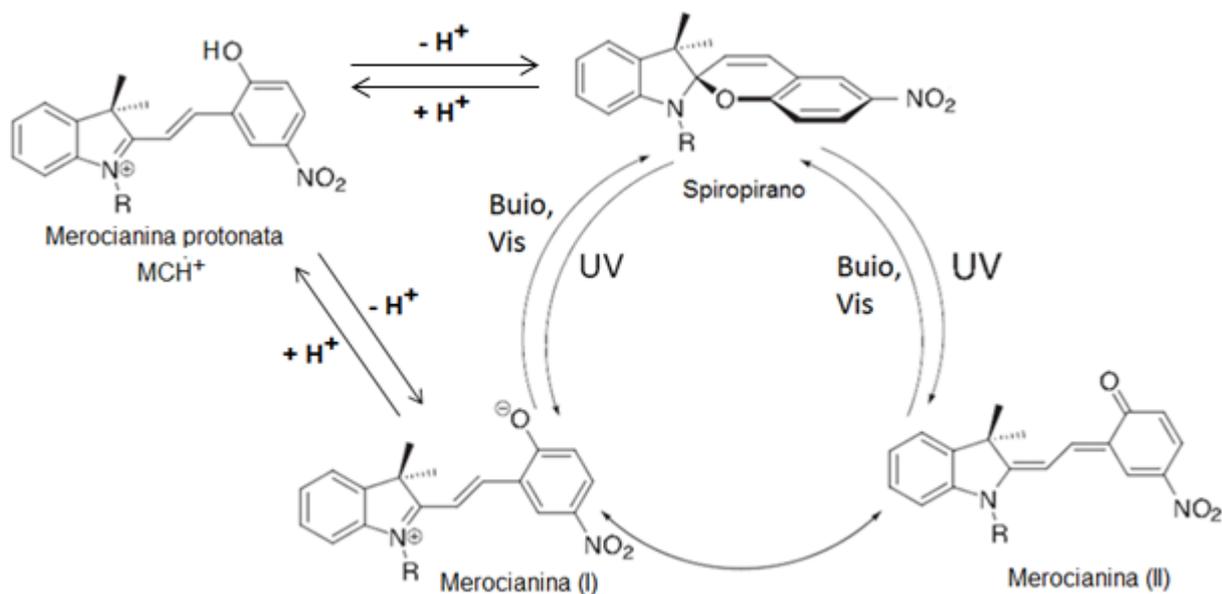


Figura 2.46 – Forme di risonanza della merocianina: (I) zwitterionica e (II) chinoide; merocianina protonata (MCH^+).

In mezzi non polari, i quali stabilizzano preferenzialmente la forma chinoide^{20,34}, diminuiscono la differenza di energia tra gli stati fondamentale ed eccitato della merocianina; come risultato si osserva uno spostamento batocromico della banda di assorbimento^{33,35}. Nei mezzi polari viene, invece, stabilizzata la forma carica zwitterionica, con conseguente spostamento

del massimo a lunghezze d'onda più basse (spostamento ipsocromico). In presenza di ioni H^{+165} , o in solventi molto polari, la forma carica della merocianina può protonarsi (MCH^+ in figura 2.46), causando così la comparsa di una banda di assorbimento a lunghezze d'onda ancora più basse (400-450 nm) (figura 2.47).

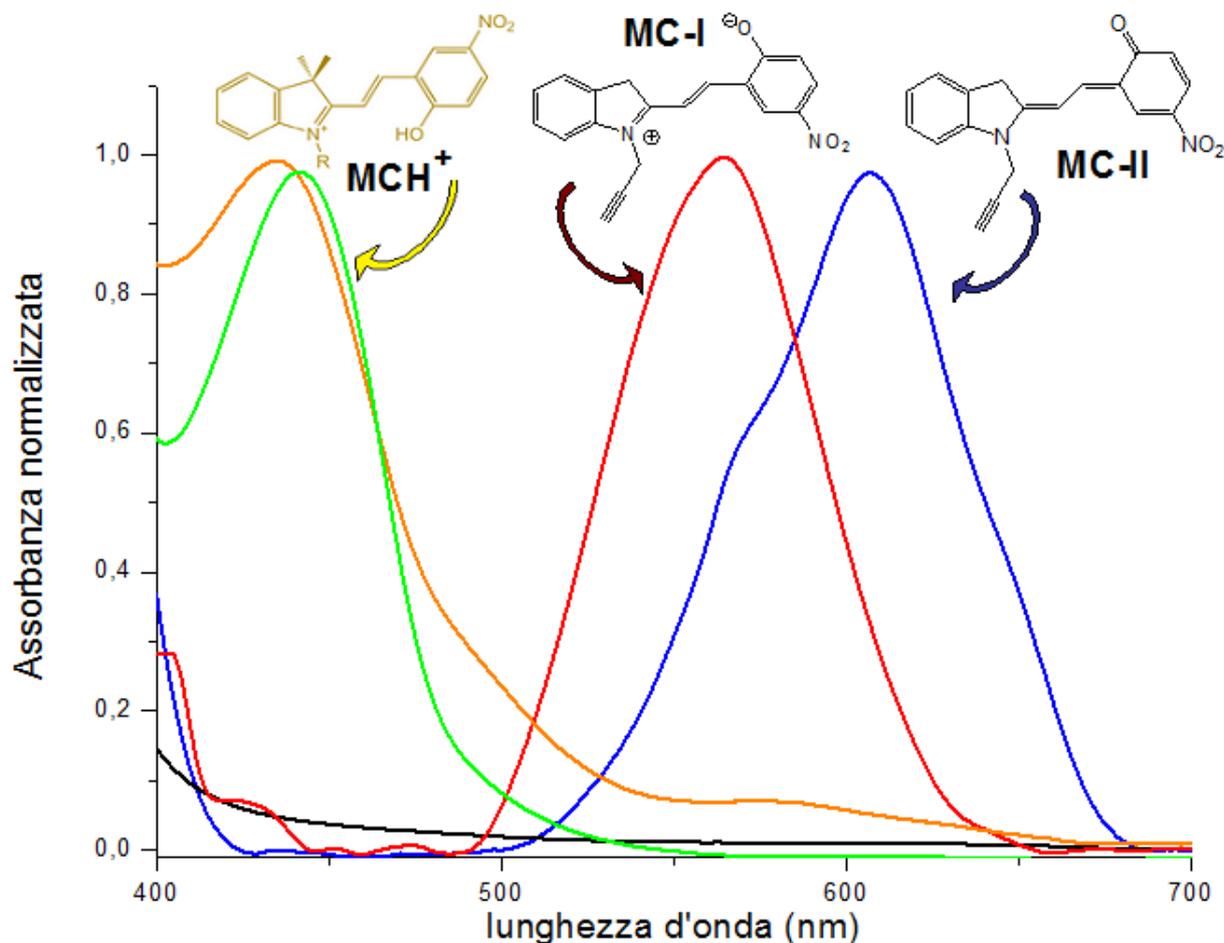


Figura 2.47 – Spettri di assorbimento UV/Vis di una soluzione di SPCC: in dietil etere prima (curva nera) e dopo irraggiamento UV a $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$ (curva blu), in etanolo dopo irraggiamento (curva rossa)⁶⁴, in DMSO prima (curva verde) e dopo (curva arancione) irraggiamento.

Dalla figura 2.47, in cui si riportano gli spettri di assorbimento UV/Vis di soluzioni di SPCC in diversi solventi, si osserva lo spostamento verso lunghezze d'onda inferiori della banda delle forme aperte passando da dietil etere ad etanolo e DMSO. Corrispondentemente la stabilità delle tre forme di MC prevalenti nei tre solventi diminuisce in quest'ordine: $MCH^+ > MC\text{-}(I) > MC\text{-}(II)$. Infatti, in dietil etere, è stato necessario raffreddare la soluzione a $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$ per avere il tempo di osservare l'assorbimento della forma chinoide, in quanto a temperature maggiori la retro-isomerizzazione verso SP risulterebbe immediata. In etanolo, solvente polare in cui prevale la forma zwitterionica, la sua stabilità è maggiore e la sua formazione è misurabile a temperatura ambiente. In DMSO si osserva sperimentalmente la formazione

della merocianina protonata anche senza irraggiamento del campione, mentre la stessa soluzione irraggiata non presenta grandi differenze se non la comparsa di una banda di scarsa intensità dovuta ad MC. Quest'ultimo comportamento evidenzia una differenza sostanziale tra le molecole di spiropirano in forma libera e quelle aggraffate ad un supporto. Infatti, l'irraggiamento con luce UV dei polisaccaridi funzionalizzati in DMSO provoca un notevole aumento della banda di MC (figura 2.45). Tale differenza indica un ruolo importante del polisaccaride nel determinare la stabilità di una delle forme in cui lo spiropirano può presentarsi.

In figura 2.48 sono mostrati gli spettri ottenuti dalla differenza tra quello registrato dopo esposizione di ASP_{40} e ASP_{100} alla luce UV e quello non irraggiato, per ogni solvente; in tal modo è possibile evidenziare i contributi (intensità e massimo di assorbimento) delle specie chimiche che si formano a seguito dell'irraggiamento per i due composti. Nel caso di ASP_{40} , il massimo del picco di assorbimento si sposta da 570 nm in DMSO e in THF a 556 e 560 nm rispettivamente in acqua e in DMF. Tale comportamento è diverso da quello osservato per lo spiropirano libero, in particolare nel caso del DMSO, in cui la banda di assorbimento prima e dopo irraggiamento è a 420 nm, quando libero, mentre quando legato si forma una banda a 570 nm, dopo irraggiamento. In questo caso si deve ipotizzare che l'effetto del sia sovrapposto all'effetto dell'intorno dovuto al polimero funzionalizzato. Tale punto verrà discusso in maniera più estesa successivamente.

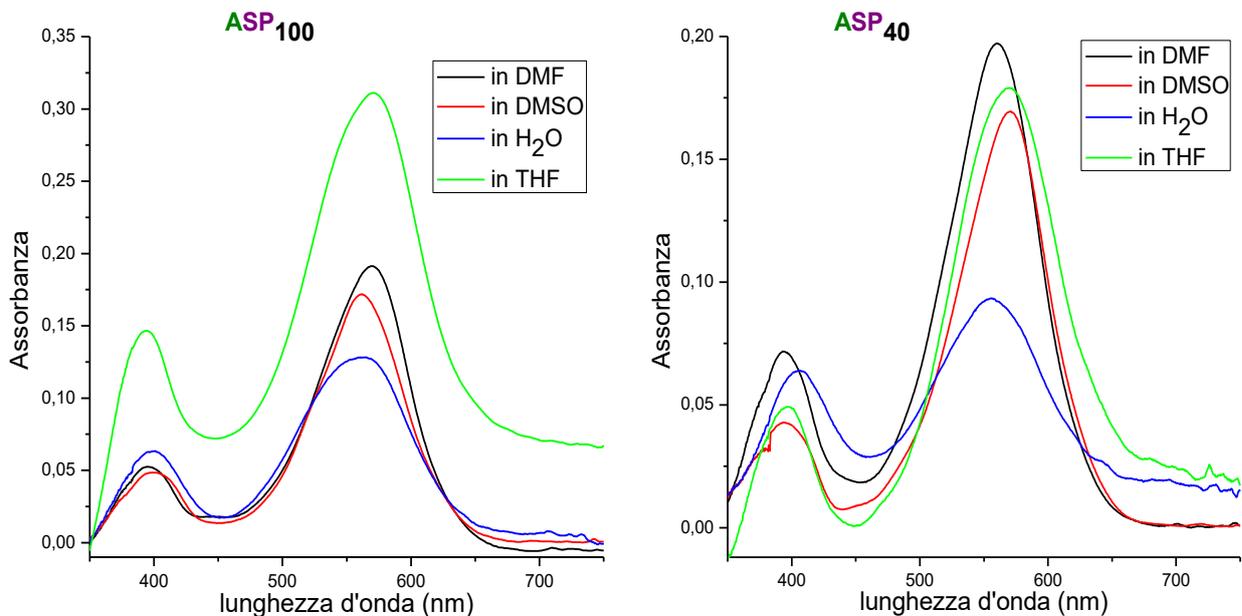


Figura 2.48 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis ottenuti facendo la differenza tra spettro del campione irraggiato e spettro del campione non irraggiato in ciascun solvente, per ASP_{100} (a sinistra) e ASP_{40} (a destra).

Anche per l'ASP₁₀₀ si osserva un effetto del solvente sulla posizione del massimo di assorbimento della merocianina che passa da 570 nm in DMF e THF, a 558 nm in acqua, a 560 nm in DMSO (figura 2.48, a sinistra). Anche in questo caso, come per ASP₄₀, si combinano effetti del solvente e dell'intorno dovuto al polimero, per cui vi sono differenze fra il comportamento dei cromofori aggraffati e quelli liberi.

In uno stesso solvente si osservano effetti ipsocromici e batocromici con il variare del grado di sostituzione (figura 2.49). Questo si può spiegare considerando la tendenza della forma carica della merocianina a formare aggregati, specialmente in solventi meno polari, per effetto delle interazioni attrattive intermolecolari dipolo-dipolo⁴⁸. In particolare le unità MC possono formare associazioni coplanari (si possono "impilare") in due modi diversi: l'arrangiamento "testa-coda" dei dipoli dà origine ai cosiddetti aggregati J, mentre quello "testa-testa" porta agli aggregati H (vedi paragrafo 1.2).

Questi due tipi di aggregati possono essere facilmente identificati nello spettro di assorbimento poiché l'impilamento di tipo J sposta la banda di assorbimento dell'isomero MC a lunghezze d'onda più alte (spostamento batocromico, o verso il rosso), mentre quello di tipo H si manifesta con lo spostamento ipsocromico (verso il blu), a lunghezze d'onda più basse.

Un grado di funzionalizzazione maggiore del polimero, mette a disposizione un maggior numero di molecole di merocianina le quali possono interagire più facilmente con altre molecole nelle vicinanze e portare alla formazione di aggregati.

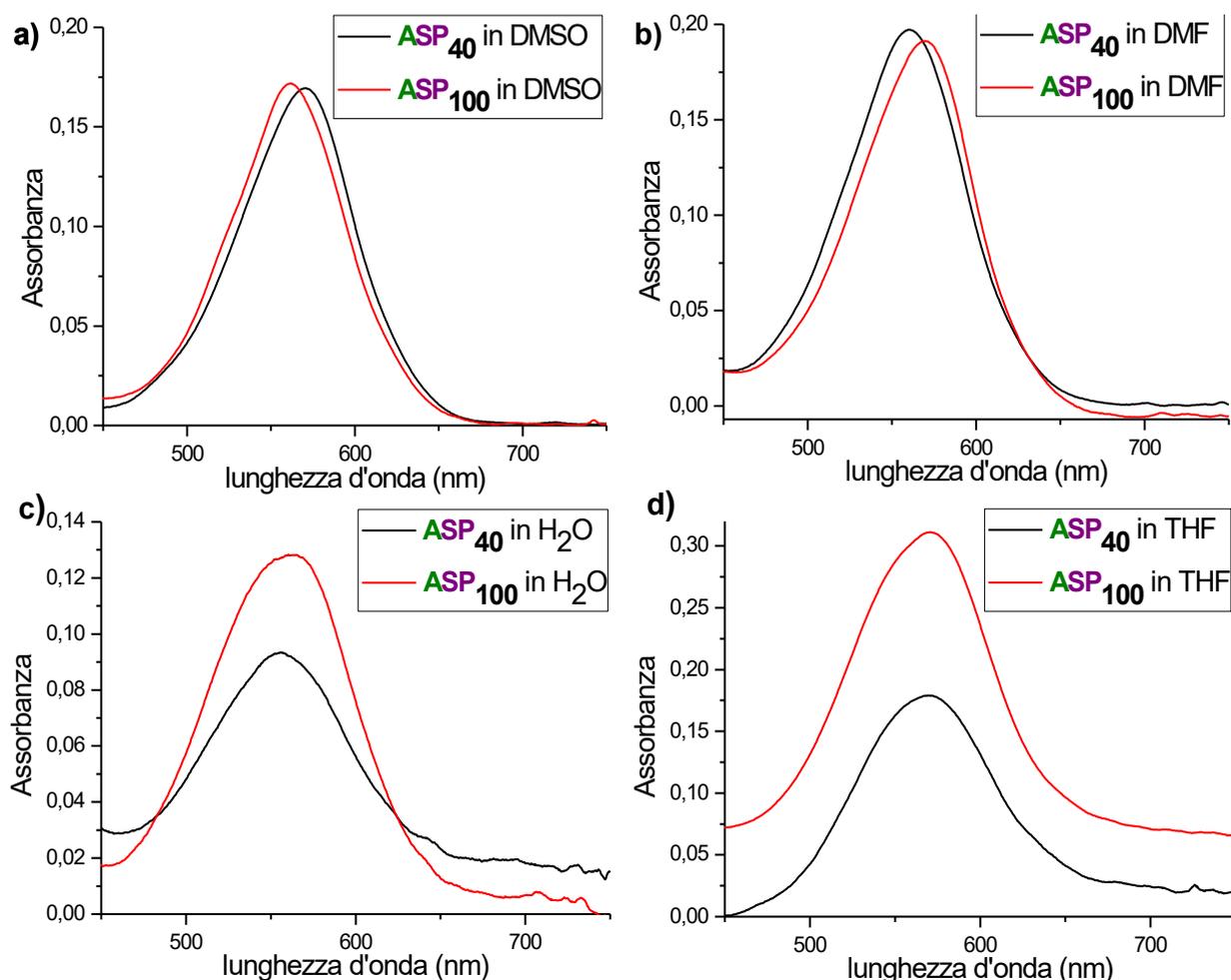


Figura 2.49 – Confronto tra spettri UV/Vis ottenuti facendo la differenza tra spettro del campione irraggiato e spettro del campione non irraggiato, per ASP₄₀ e ASP₁₀₀: (a) in DMSO; (b) in DMF; (c) in H₂O; (d) in THF.

Nel caso del solvente DMSO, si osserva uno spostamento ipsocromico della banda da 570 a 560 nm passando dal sistema al 40% a quello al 100% di molecola fotoresponsiva; questo fenomeno può essere spiegato, sulla base di quanto detto in precedenza, con la formazione di aggregati di tipo H tra molecole di merocianina.

In DMF si osserva un comportamento inverso (figura 2.49, b): il massimo del picco di assorbimento della merocianina subisce uno spostamento batocromico da 560 a 570 nm, attribuibile alla formazione di aggregati di tipo J passando dal sistema al 40% a quello al 100% di molecola fotoresponsiva.

Per i sistemi in acqua e in THF (figura 2.49, c e d) non si osservano variazioni significative della posizione del massimo di assorbimento in funzione della percentuale di spiropirano presente sulla catena polimerica; ciò è dovuto probabilmente alla bassa solubilità del sistema, e quindi alla concentrazione di saturazione della soluzione che è troppo bassa per favorire la formazione di aggregati supramolecolari.

Un'altra cosa da notare nell'osservazione della figura 2.49 è che, mentre in DMF e in DMSO non c'è sostanziale variazione di solubilità tra i sistemi prima e dopo irraggiamento (sia per quelli al 40 che al 100% di funzionalizzazione in spiropirano), il passaggio dalla forma chiusa a quella aperta dello spiropirano provoca una riduzione di solubilità in H₂O e in THF. Infatti la linea di base a 750 nm dello spettro ottenuto per differenza tra quello rispettivamente dei campioni irraggiato e non irraggiato ha valori più alti di zero. Per i sistemi in THF la diminuzione di solubilità è maggiore per quelli con grado di modifica del 100%. Ciò è spiegabile facilmente col fatto che il passaggio da una forma apolare chiusa, che favorisce la solubilizzazione in un solvente poco polare come il THF, ad una forma carica aperta con carattere polare determina un abbassamento della solubilità dell'intero sistema. Per quanto riguarda l'acqua, invece, non vi sono variazioni di solubilità nel caso di ASP₁₀₀, mentre l'effetto è evidente in ASP₄₀.

2.3.3 Ottimizzazione dei tempi di irraggiamento UV delle soluzioni

Prima di iniziare lo studio vero e proprio del comportamento ottico in soluzione dei materiali ottenuti, è stato determinato sperimentalmente il tempo ottimale di irraggiamento UV per ciascun campione, ossia il minimo tempo necessario per raggiungere la massima assorbanza in corrispondenza del massimo di assorbimento della merocianina.

A questo scopo soluzioni di ASP₄₀ a concentrazione di 0,1 mg/mL in ciascuno dei quattro solventi sono state irraggiate con lampada UV a tempi crescenti: in figura 2.50 sono riportati gli spettri UV registrati al termine di ogni periodo di irraggiamento nei diversi solventi.

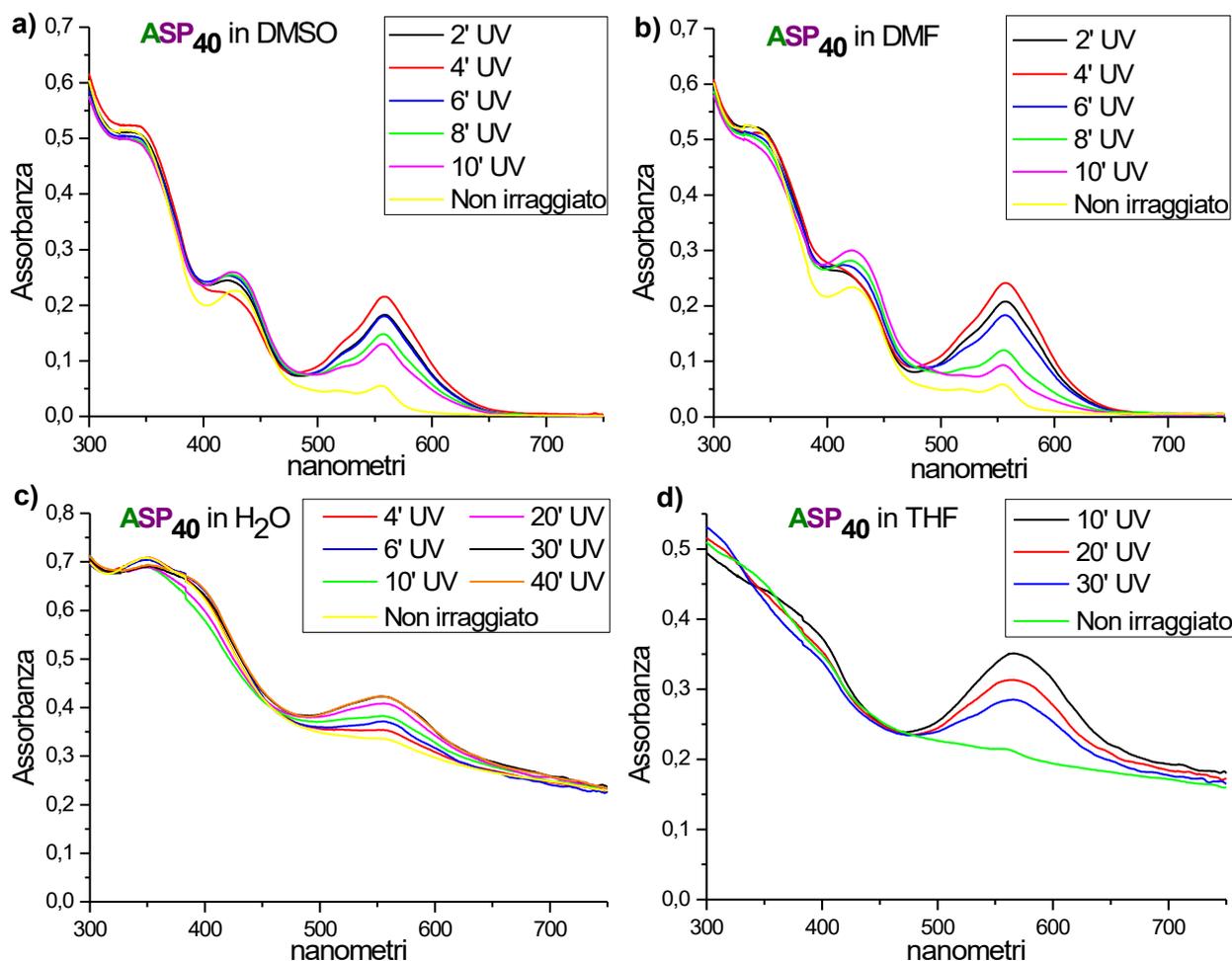


Figura 2.50 – Spettri UV/Vis di ASP_{40} a tempi crescenti di irraggiamento UV: (a) in DMSO; (b) in DMF; (c) in H_2O ; (d) in THF.

Le soluzioni in DMF e in DMSO (figura 2.50, a e b), irraggiate per periodi successivi di 2 minuti, hanno raggiunto un valore massimo di assorbanza a circa 560 nm già dopo 4 minuti di irraggiamento (curva rossa negli spettri). Per tempi di irraggiamento superiori il picco è apparso diminuire di intensità. In H_2O (figura 2.50, c) il valore massimo di assorbanza è stato raggiunto dopo 30 minuti di irraggiamento (curva nera nello spettro), mentre per tempi maggiori non si sono osservate modifiche ulteriori.

Infine, il campione in THF, irraggiato a step di 10 minuti, ha raggiunto un assorbimento massimo già dopo il primo ciclo di irraggiamento, mentre per i cicli successivi (20 e 30 minuti) si è notata una graduale diminuzione dell'assorbanza, analogamente a quanto visto in DMSO e DMF.

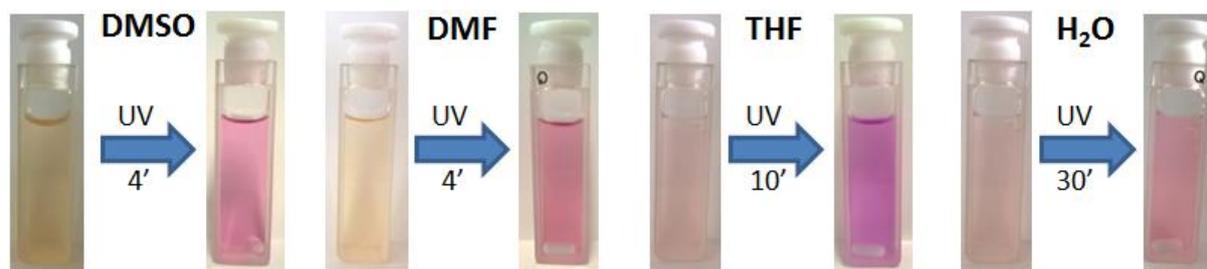


Figura 2.51 – Cuvette contenenti le soluzioni/dispersioni di ASP_{40} nei diversi solventi (DMSO, DMF, H_2O , THF), rispettivamente prima e dopo l'irraggiamento UV condotto per il tempo necessario a raggiungere la massima conversione di fotoisomerizzazione.

Per i successivi studi si è quindi deciso di irraggiare i campioni per un tempo pari a quello risultato necessario per raggiungere la massima conversione in merocianina, come riportato in tabella 2.4.

Tabella 2.4 – Tempi di irraggiamento ottimale per ciascun campione, ottenuti sperimentalmente.

Campione	Tempo di irraggiamento ottimale
ASP_{40} in DMSO	4 minuti
ASP_{40} in DMF	4 minuti
ASP_{40} in H_2O	30 minuti
ASP_{40} in THF	10 minuti
ASP_{100} in DMSO	4 minuti
ASP_{100} in DMF	4 minuti
ASP_{100} in H_2O	30 minuti
ASP_{100} in THF	10 minuti

2.3.4 Cinetica di retro-isomerizzazione

Nel caso di ASP_{40} e ASP_{100} in DMSO e in DMF è stata studiata la cinetica di retro-isomerizzazione della merocianina all'isomero spiropiranico dopo l'iniziale irraggiamento UV per 4 minuti. Le cinetiche di retro-isomerizzazione sono state seguite per via spettrofotometrica, registrando ogni 5 secondi la variazione di assorbanza in corrispondenza del massimo di assorbimento della merocianina (figura 2.52). E' stato possibile effettuare lo studio cinetico solo per i campioni sciolti in DMSO e in DMF, in quanto la scarsa solubilità

dei campioni in H₂O e in THF, nonché la sua variazione durante la retro-isomerizzazione con formazione di aggregati che davano luogo a scattering e si depositavano progressivamente sul fondo della cuvetta, rendeva l'analisi dei dati complessa ed inaccurata.

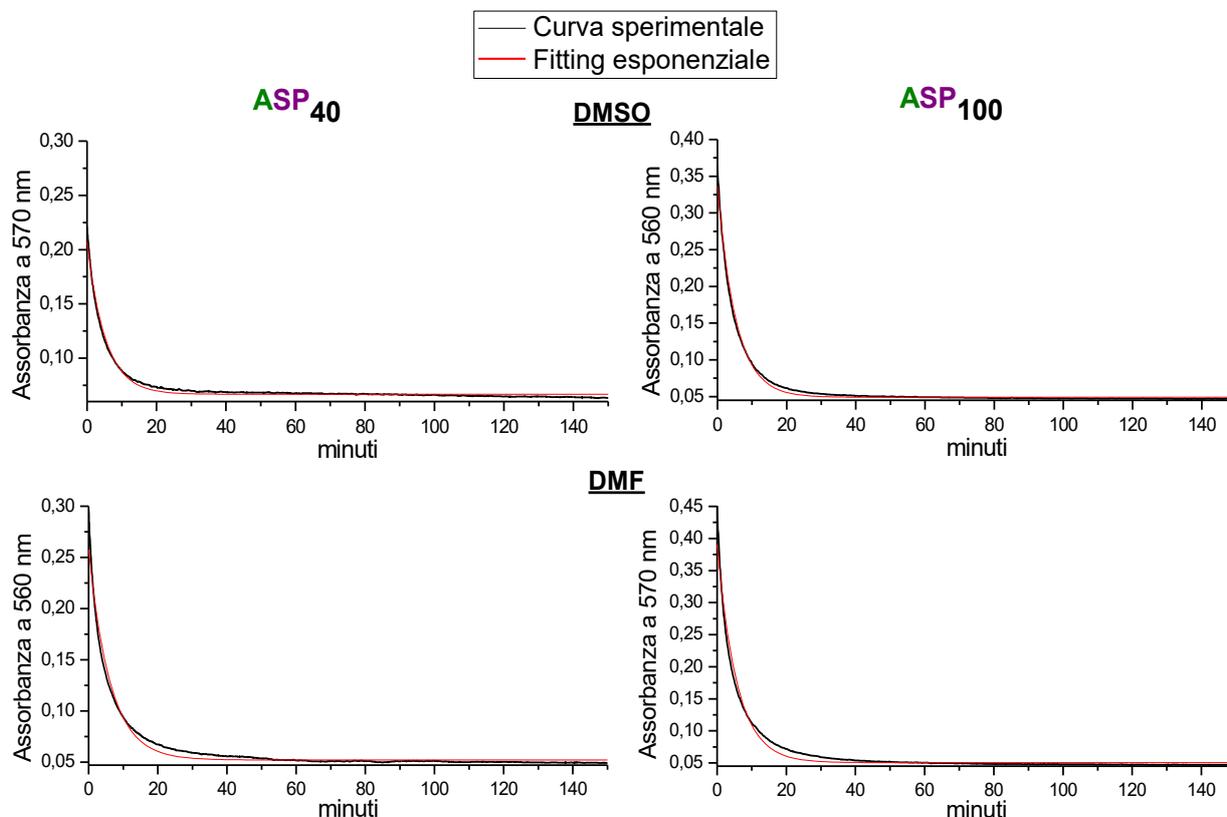


Figura 2.52 – Cinetiche di retro-isomerizzazione da MC a SP in DMSO e in DMF, per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra): curve sperimentali (in nero) e fitting esponenziale (in rosso).

L'interpolazione dei dati sperimentali con una funzione mono-esponenziale (equazione 2.2)

$$y = A1 \cdot \exp(-x/t1) + y0 \quad (2.2)$$

in cui A1 è il fattore pre-esponenziale, y0 è il valore di assorbanza residua al tempo infinito e t1 è il tempo di dimezzamento, forniscono i valori dei parametri riportati in tabella 2.5.

Tabella 2.5 – Valori dei termini dell'equazione ottenuta dal fitting esponenziale delle curve sperimentali e relative deviazioni standard.

Prodotto	Solvente	y0 * 10 ²	A1	t1	R ²
ASP ₄₀	DMSO	6,672 ± 0,004	0,1400 ± 0,0004	5,24 ± 0,02	0,98626
ASP ₁₀₀	DMSO	4,906 ± 0,007	0,2875 ± 0,0007	5,29 ± 0,02	0,99376
ASP ₄₀	DMF	5,203 ± 0,008	0,2055 ± 0,0007	6,23 ± 0,03	0,98213
ASP ₁₀₀	DMF	5,04 ± 0,01	0,340 ± 0,001	5,69 ± 0,03	0,9836

I valori di R^2 (coefficiente di determinazione) ottenuti per i fitting delle quattro curve indicano che gli andamenti sperimentali sono descritti discretamente bene da un esponenziale del primo ordine, corrispondente quindi ad un processo monomolecolare, a conferma del previsto meccanismo monomolecolare del processo di retro-isomerizzazione della merocianina. In particolare il fitting che ha mostrato una migliore correlazione lineare (valore di R^2 più vicino ad 1) è risultata la soluzione di ASP_{100} in DMSO.

Da un'ulteriore analisi dei dati in tabella, si osserva che il t_1 , cioè il tempo di dimezzamento dell'assorbimento della specie MC, è intorno ai 5-6 minuti per tutti i campioni. In particolare si nota che per le soluzioni in DMSO t_1 è leggermente inferiore a quello delle soluzioni in DMF, ovvero che la merocianina retro-isomerizza più velocemente in DMSO che in DMF.

2.3.5 Cicli luce/buio

Per valutare l'entità dell'effetto fotodegradativo della radiazione UV sullo spiroirano, problema comunemente associato a questa classe di molecole fotoresponsive^{26,27}, si sono fatti esperimenti di fatica, effettuando ripetuti cicli luce/buio. Per i cicli di fatica, su ogni singolo campione si è proceduto nella maniera seguente: è stato acquisito lo spettro di assorbimento UV/Vis del campione lasciato al buio, dopodiché esso è stato irraggiato per il tempo ottimale precedentemente fissato (tabella 2.4), registrando immediatamente dopo lo spettro. A questo punto al campione è stato dato il tempo di ritornare allo stato in cui si trovava prima dell'irraggiamento, lasciandolo riposare al buio per 24 ore. Le operazioni descritte sono ripetute per 7 giorni successivi con le stesse identiche modalità. I risultati ottenuti in ciascun solvente sono stati riportati nei paragrafi seguenti.

2.3.5.1 DMSO

Gli spettri di ASP_{40} e ASP_{100} in DMSO dopo i periodi di buio (figura 2.53 e 2.54, a sinistra) mostrano una piccola banda a circa 560 nm, attribuibile alla forma merocianina dello spiroirano. La presenza di questa banda negli spettri dei campioni non irraggiati è già stata spiegata in precedenza. L'intensità di tale banda, comunque, aumenta di molto dopo irraggiamento del campione con luce UV, come atteso. Il valore di intensità dopo irraggiamento oscilla di ciclo in ciclo, come si può osservare in figura 2.55, dove sono

riportati i valori di assorbanza della banda attribuita alla merocianina in funzione del numero di cicli luce/buio.

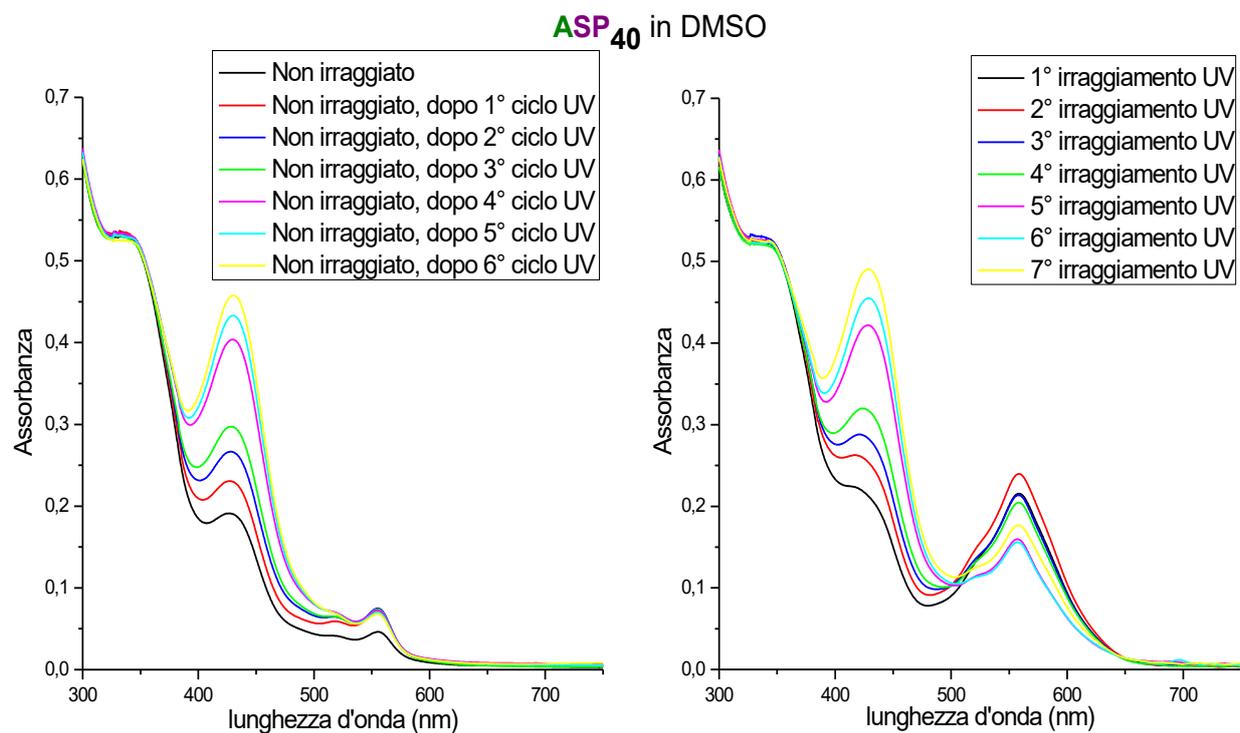


Figura 2.53 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₄₀ in DMSO, non irraggiato (a sinistra) e irraggiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

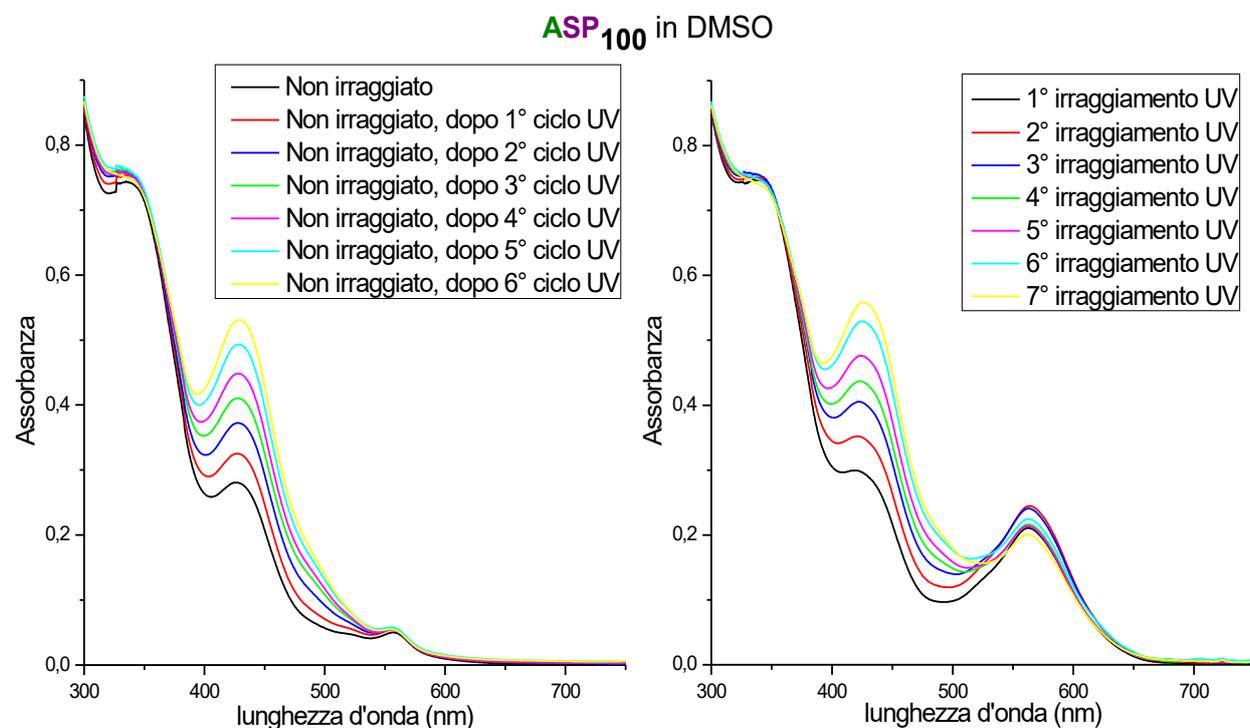


Figura 2.54 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₁₀₀ in DMSO, non irraggiato (a sinistra) e irraggiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

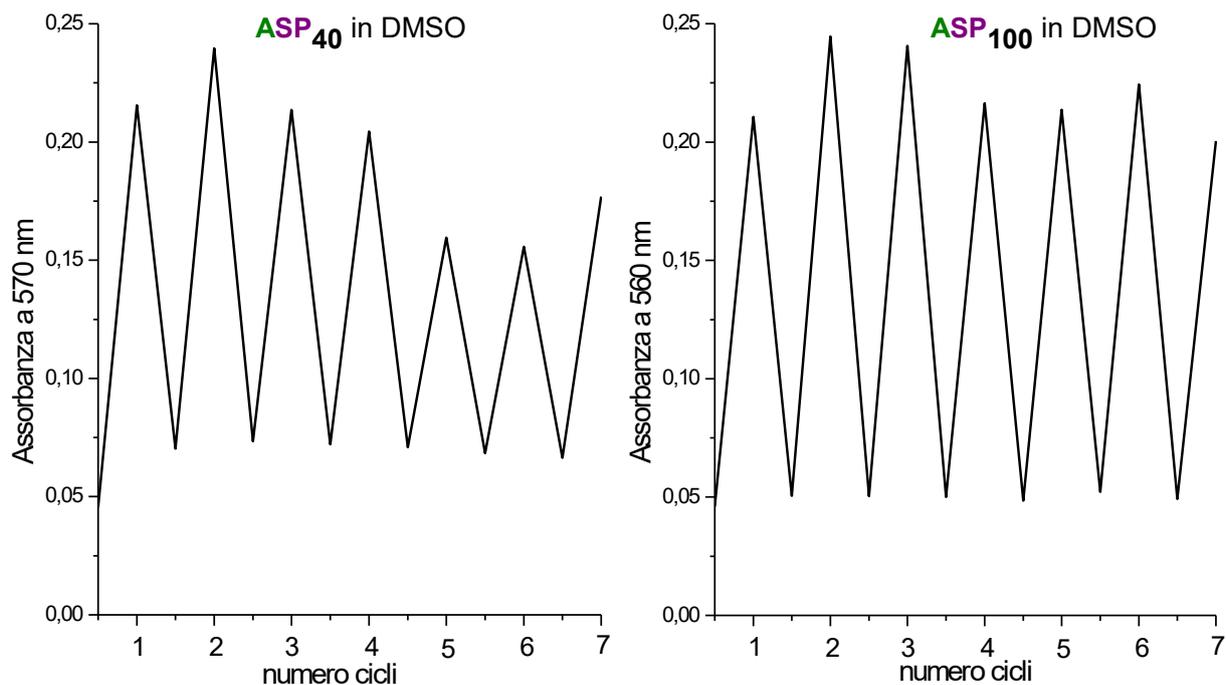


Figura 2.55 – Assorbanza della banda merocianinica in funzione del numero di cicli luce/buio per ASP_{40} (a sinistra) e ASP_{100} (a destra), in DMSO.

Nonostante queste oscillazioni di intensità, dovute probabilmente alla velocità del decadimento della specie MC che è confrontabile con il tempo intercorso tra la rimozione del campione dalla lampada UV e la misura, è possibile osservare per il campione al 40% di spiropirano (figura 2.55, a sinistra) una graduale diminuzione di assorbanza di tale banda. Nel caso del campione al 100% di molecola fotoattiva tale diminuzione è ancora difficilmente apprezzabile dopo 7 cicli di irraggiamento.

Esaminando gli interi spettri registrati ad ogni ciclo (figure 2.53 e 2.54) si può osservare un aumento progressivo della banda centrata a circa 425 nm con il progredire dei cicli di irraggiamento. Essa non cala di intensità neanche dopo aver lasciato i campioni al buio per le 24 ore successive. In figura 2.56 sono riportati in grafico i valori del massimo di assorbanza della suddetta banda in funzione del numero di cicli di irraggiamento UV, per i sistemi lasciati a riposo al buio.

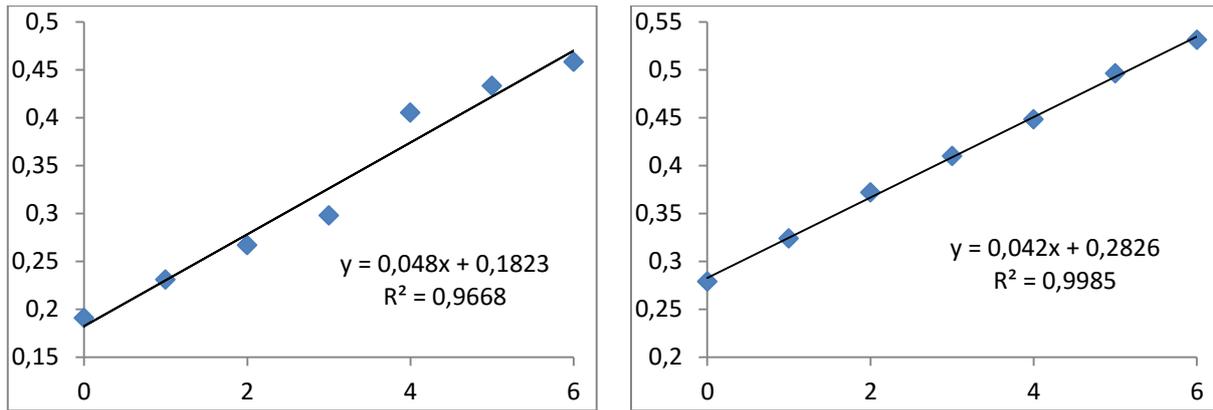


Figura 2.56 – Assorbanza a 425 nm in funzione del numero di cicli di irraggiamento UV per ASP_{40} (a sinistra) e ASP_{100} (a destra) in DMSO.

Come si può osservare l'assorbanza cresce in modo pressoché lineare con il tempo cumulativo di irraggiamento UV (e quindi col numero dei cicli). Inoltre è interessante osservare che la velocità di crescita dell'assorbanza della banda a circa 425 nm (pendenza della retta) è confrontabile in ASP_{40} e ASP_{100} , seppure il valore al tempo zero sia più alto per ASP_{100} .

Una ulteriore evidenza dell'effetto della radiazione UV sull'evoluzione delle specie chimiche presenti nei sistemi è data in figura 2.57, dove si confrontano gli spettri ottenuti sottraendo lo spettro del campione non irraggiato a quelli dei campioni irraggiati con luce UV dopo il primo e dopo il settimo ciclo. Con questa operazione di sottrazione si eliminano eventuali contributi di scattering del campione inizialmente non irraggiato, rendendo possibile il confronto delle intensità relative delle varie bande.

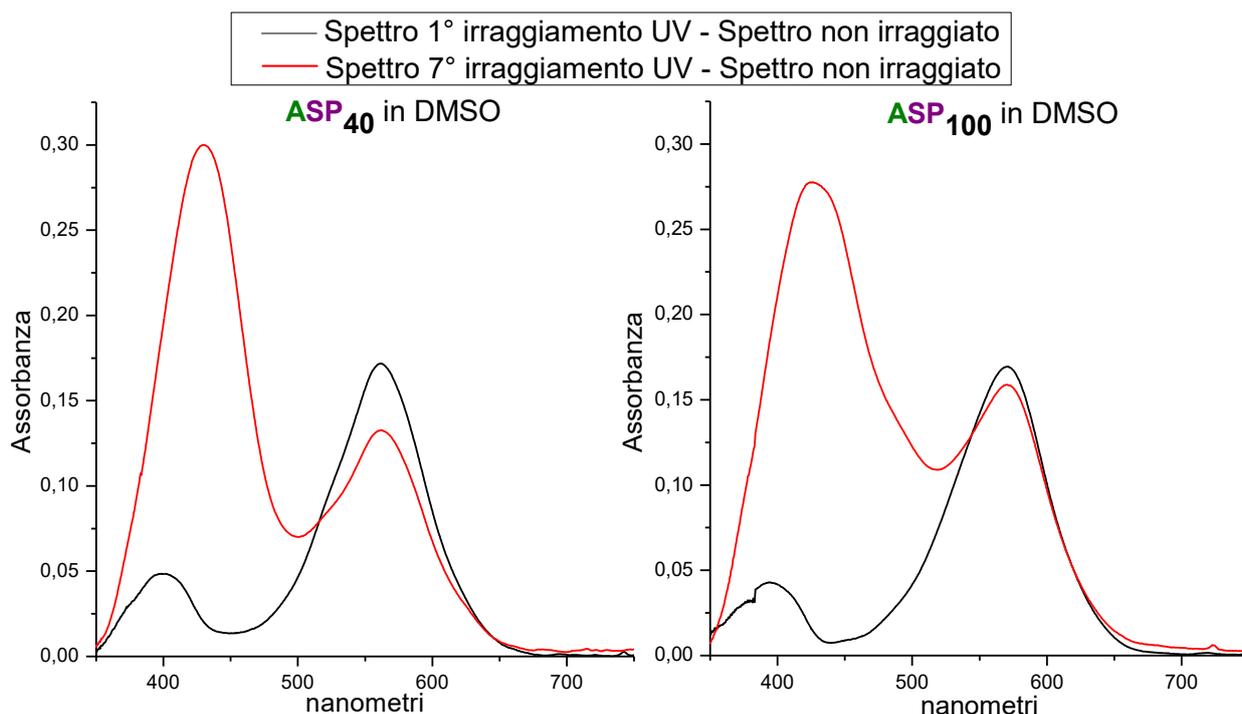


Figura 2.57 – Sottrazione tra spettro del campione subito dopo il 1° irraggiamento UV e spettro del campione non irraggiato (curve nere) e tra spettro del campione subito dopo il 7° irraggiamento UV e quello del campione non irraggiato (curve rosse), per ASP_{40} (a sinistra) e ASP_{100} (a destra) in DMSO.

Dal confronto appare chiaro che la specie che si forma è caratterizzata da due bande di assorbimento, una avente massimo intorno ai 560-570 nm e una a circa 400 nm. Tale specie tuttavia evolve nel corso dell'irraggiamento causando uno spostamento verso il rosso della banda a più alta energia, la quale dopo 7 cicli ha massimo a 425 nm. Tale banda cade nella stessa regione spettrale di quella dell'SPCC libero in DMSO (vedi figura 2.47).

2.3.5.2 DMF

Il comportamento dei campioni in DMF è analogo a quello in DMSO sia per quanto riguarda l'evoluzione della banda della merocianina che della banda tra 400 e 450 nm (figure 2.58 e 2.59). L'unica differenza sta nella posizione del massimo di assorbimento di queste due bande, che in DMF sono leggermente spostate rispetto al DMSO, come già discusso nel paragrafo 2.3.2.

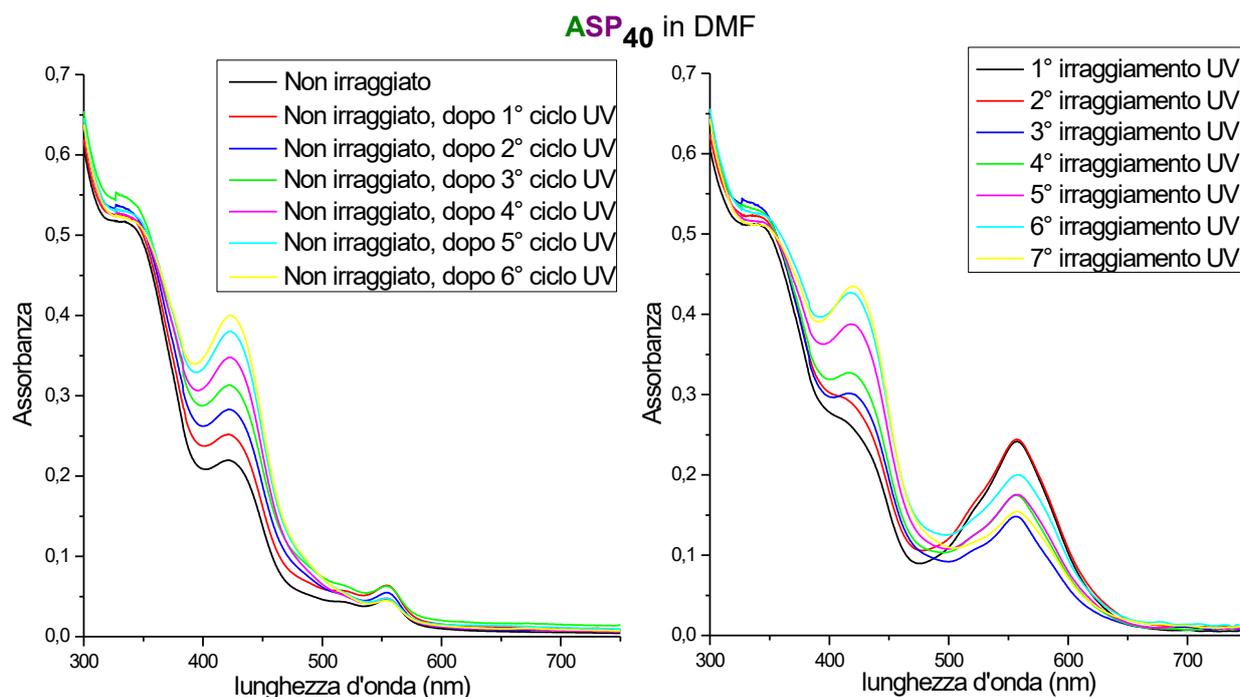


Figura 2.58 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₄₀ in DMF, non irraggiato (a sinistra) e irraggiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

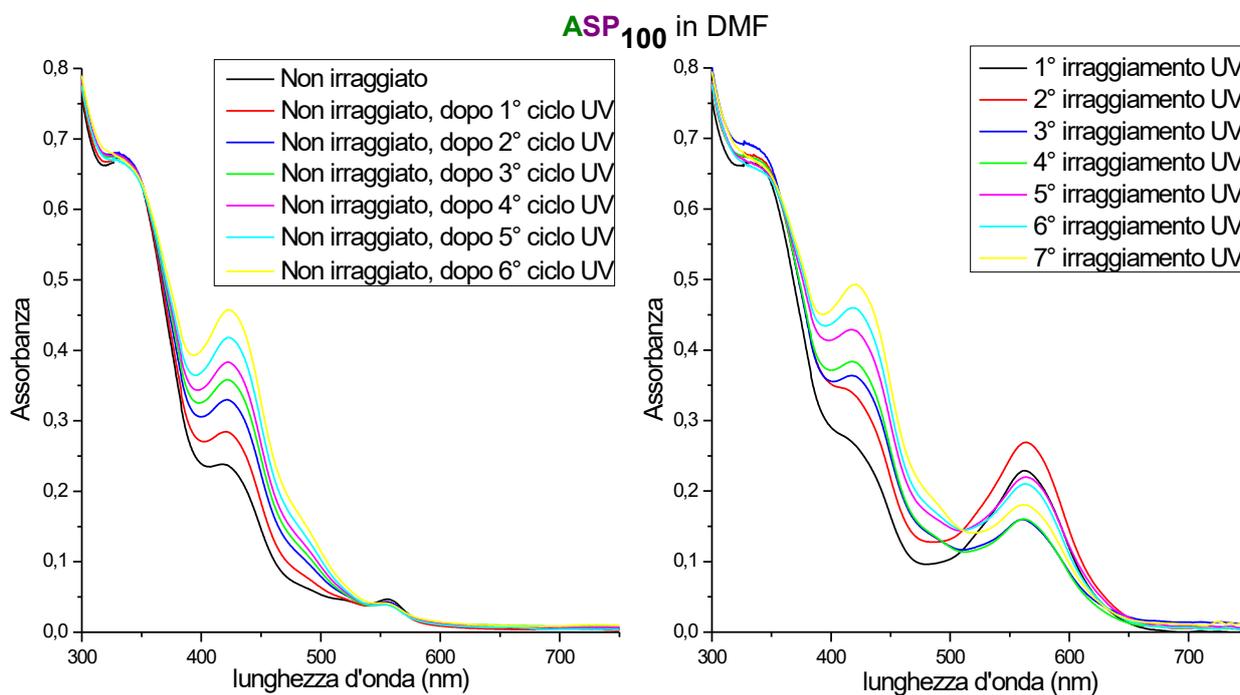


Figura 2.59 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₁₀₀ in DMF, non irraggiato (a sinistra) e irraggiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

Anche in questo solvente sono stati riportati i valori di assorbanza per entrambe le bande di interesse in funzione dei cicli di irraggiamento (figure 2.60 e 2.61). I risultati portano alle stesse conclusioni già discusse per il caso del DMSO, con l'unica differenza che in DMF **i**

dati sperimentali relativi alla intensità della banda di MC sono più dispersi rispetto al caso del DMSO.

L'intensità della banda della forma protonata cresce, invece, in modo perfettamente lineare, come indicato dai valori di R^2 dei fitting, i quali sono superiori a 0,99.

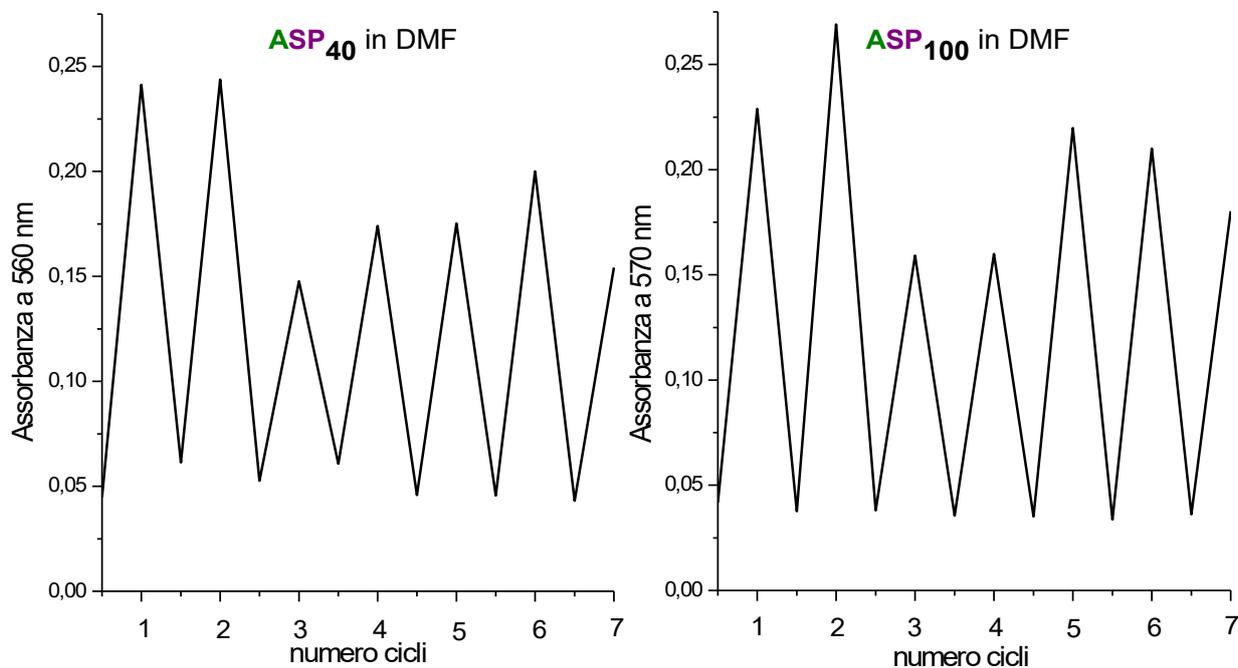


Figura 2.60 – Assorbanza della banda merocianinica in funzione del numero di cicli luce/buio per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra), in DMF.

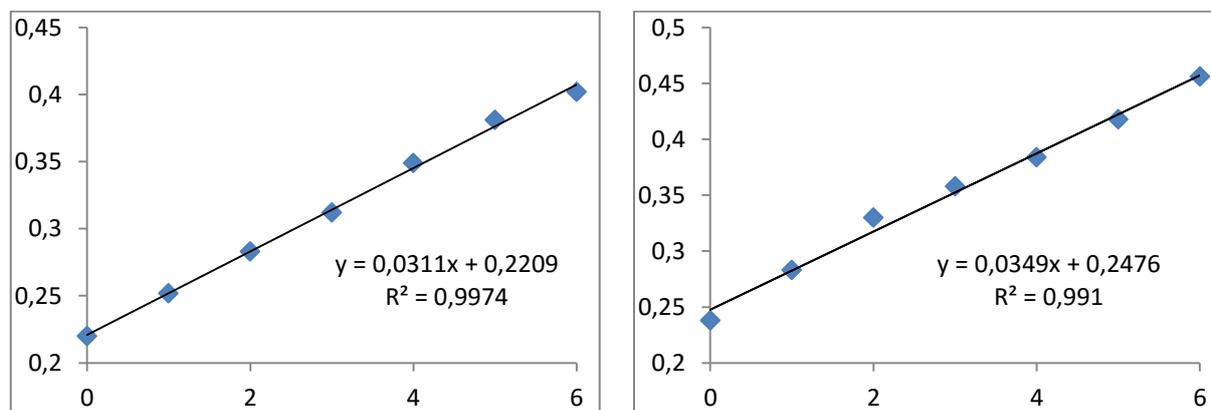


Figura 2.61 – Assorbanza a 420 nm in funzione del numero di cicli di irraggiamento UV per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra) in DMF.

La sottrazione spettrale eseguita analogamente a quanto fatto per le soluzioni in DMSO fornisce una più chiara evidenza dell'effetto della radiazione UV sull'evoluzione delle specie chimiche (figura 2.62).

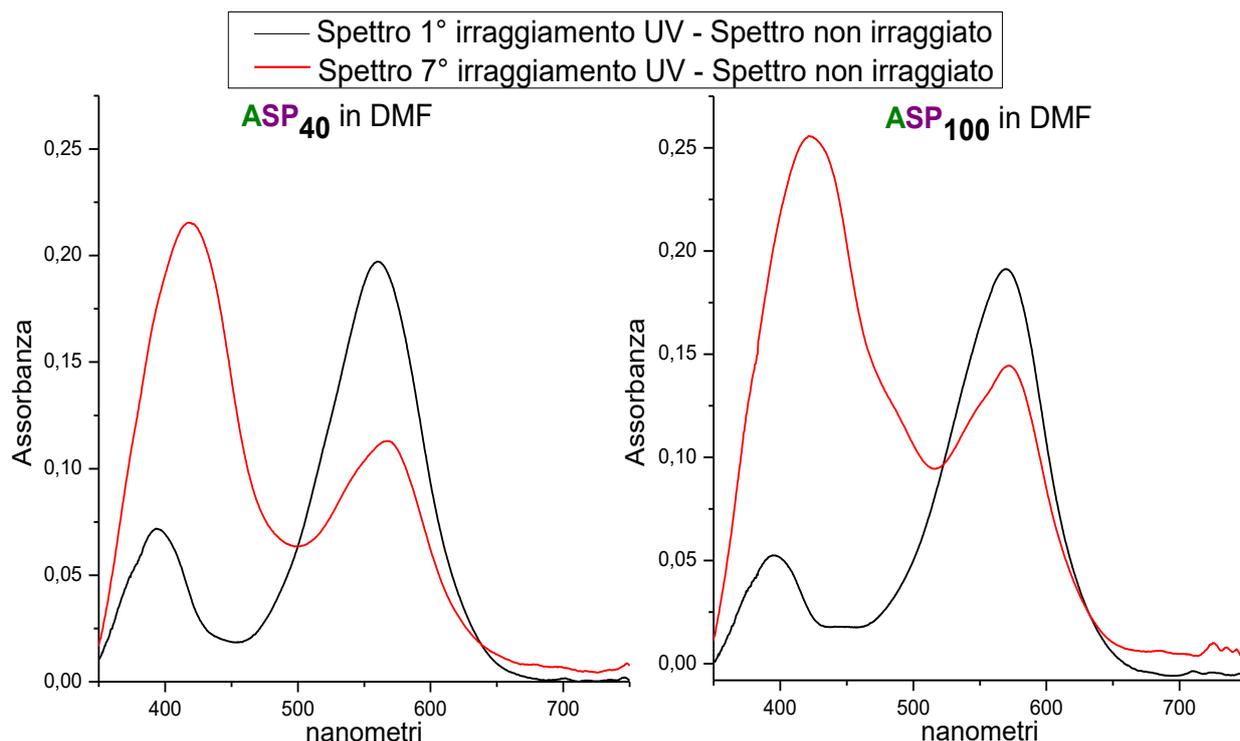


Figura 2.62 – Sottrazione tra spettro del campione subito dopo il 1° irraggiamento UV e spettro del campione non irraggiato (curve nere) e tra spettro del campione subito dopo il 7° irraggiamento UV e quello del campione non irraggiato (curve rosse), per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra) in DMF.

L'osservazione degli spettri così ottenuti ci porta alle stesse conclusioni che abbiamo già discusso nel paragrafo precedente.

2.3.5.3 H₂O

Per quanto riguarda i cicli luce/buio dei campioni in acqua (figure 2.63 e 2.64) è opportuno fare delle distinzioni, in quanto i sistemi a diverso grado di modifica presentano sì delle analogie, ma allo stesso tempo anche dei comportamenti differenti tra loro. Le analogie stanno nell'evoluzione della banda attribuita alla forma protonata della merocianina, che in questo solvente è spostata a circa 400 nm: essa cresce all'aumentare del numero di cicli di irraggiamento, anche se questo andamento può sembrare mascherato a causa della scarsa risoluzione delle bande. Tuttavia, la sottrazione dello spettro del campione non irraggiato a quelli dei campioni irraggiati con luce UV, dopo il primo e dopo il settimo ciclo (figura 2.65), evidenzia bene l'effetto.

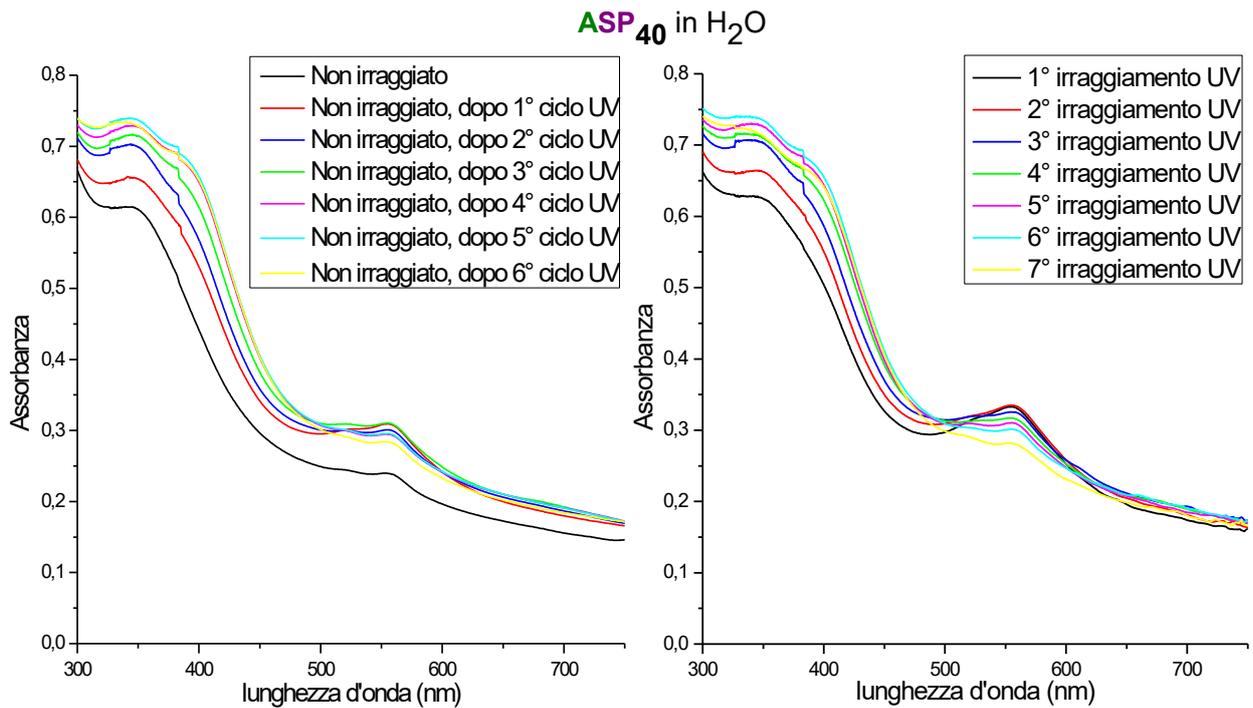


Figura 2.63 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₄₀ in H₂O, non irraggiato (a sinistra) e irraggiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

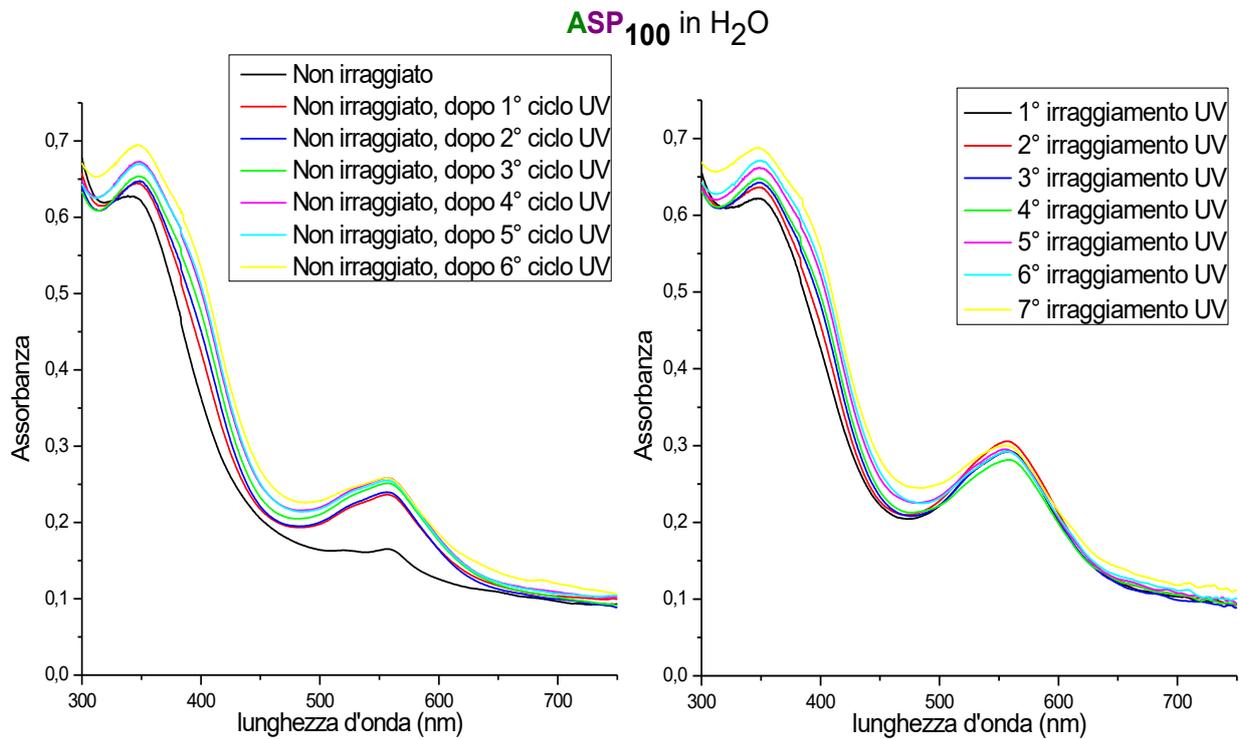


Figura 2.64 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₁₀₀ in H₂O, non irraggiato (a sinistra) e irraggiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

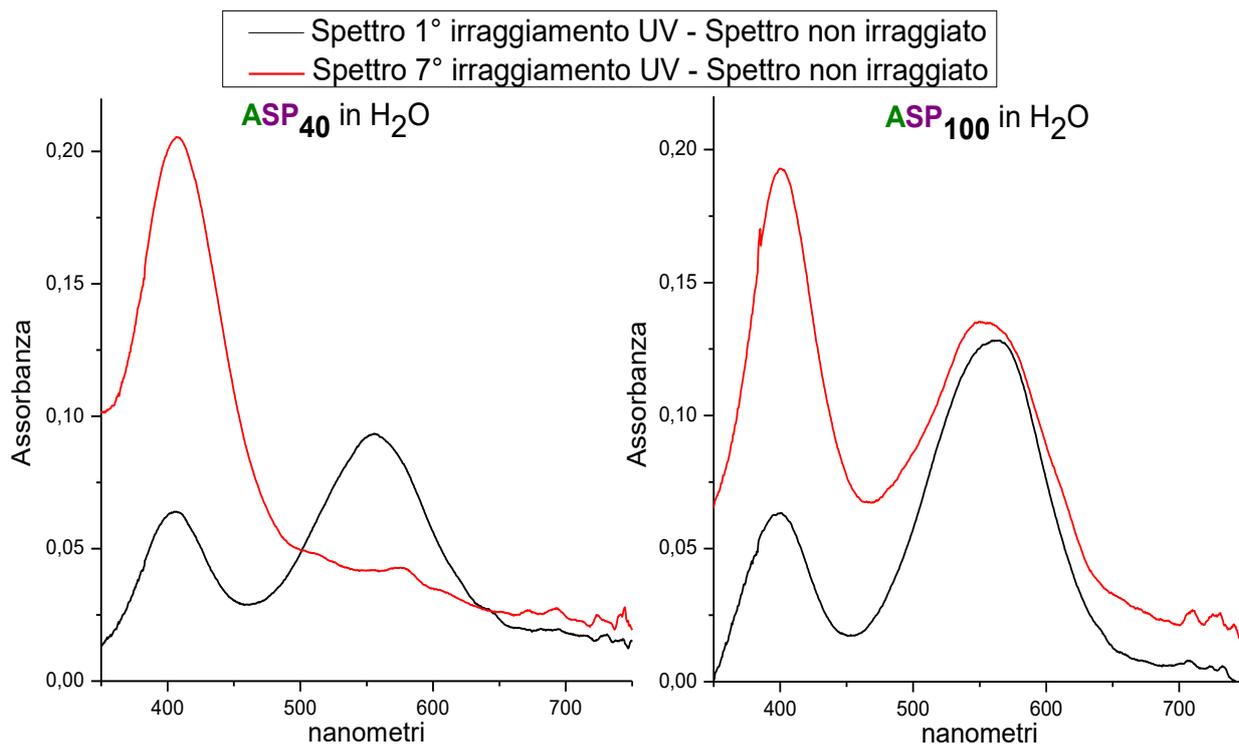


Figura 2.65 – Sottrazione tra spettro del campione subito dopo il 1° irraggiamento UV e spettro del campione non irraggiato (curve nere) e tra spettro del campione subito dopo il 7° irraggiamento UV e quello del campione non irraggiato (curve rosse), per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra) in H₂O.

Anche in questo caso sono stati riportati in grafico (figura 2.66) i valori di assorbanza a 400 nm dopo ogni ciclo luce/buio. A differenza di quanto osservato in DMSO e DMF, per le soluzioni acquose il fitting lineare dei dati sperimentali mostra una scarsa correlazione (basso valore di R^2).

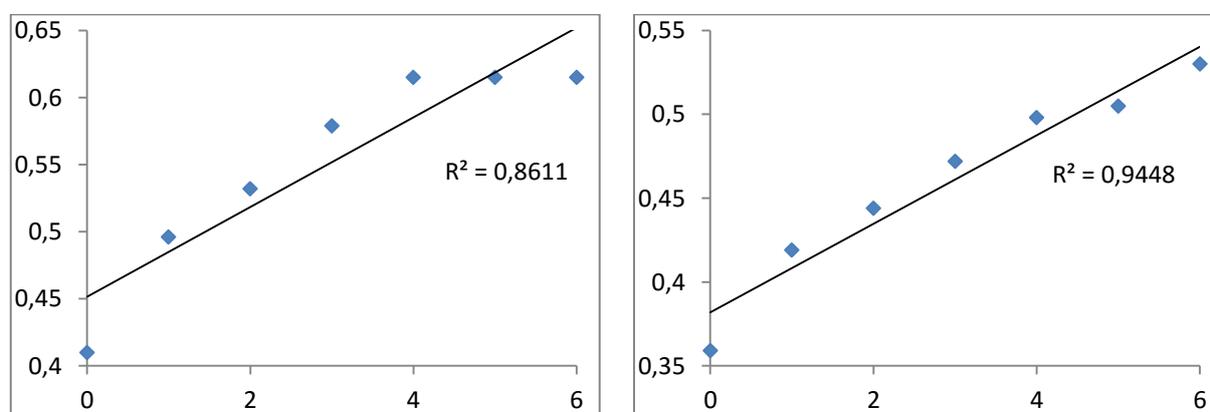


Figura 2.66 – Assorbanza a 400 nm in funzione del numero di cicli di irraggiamento UV per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra) in H₂O.

Osservando gli interi spettri nelle figure 2.63 e 2.64, è possibile valutare il comportamento della specie merocianina per i due sistemi a diverso grado di funzionalizzazione con l'aumentare dei cicli di esposizione UV. Per entrambi i campioni, dopo un primo ciclo si osserva un incremento dell'assorbanza a circa 560 nm, che risulta solo parzialmente reversibile anche dopo aver lasciato le soluzioni al buio per 24 ore. Per spiegare questo fenomeno si può ipotizzare che la specie MC che si forma a seguito dell'irraggiamento si venga a trovare in una situazione di ingombro sterico che ne impedisce o comunque ne rallenta considerevolmente la retro-isomerizzazione a SP. L'effetto più marcato osservato per ASP_{100} potrebbe supportare tale ipotesi, data la maggior vicinanza tra molecole MC in questo campione rispetto a ASP_{40} , in cui, invece, meno della metà delle unità glicosidiche sono funzionalizzate con lo spiropirano.

Oltre a questo, l'assorbimento della suddetta banda, nel caso di ASP_{40} subisce una progressiva diminuzione all'aumentare dei cicli luce/buio. Invece nel caso di ASP_{100} l'intensità di assorbimento dopo irraggiamento rimane pressoché invariata passando dal primo all'ultimo ciclo, facendo concludere che esso non soffre di apprezzabile fotodegradazione dopo 7 cicli (figura 2.67).

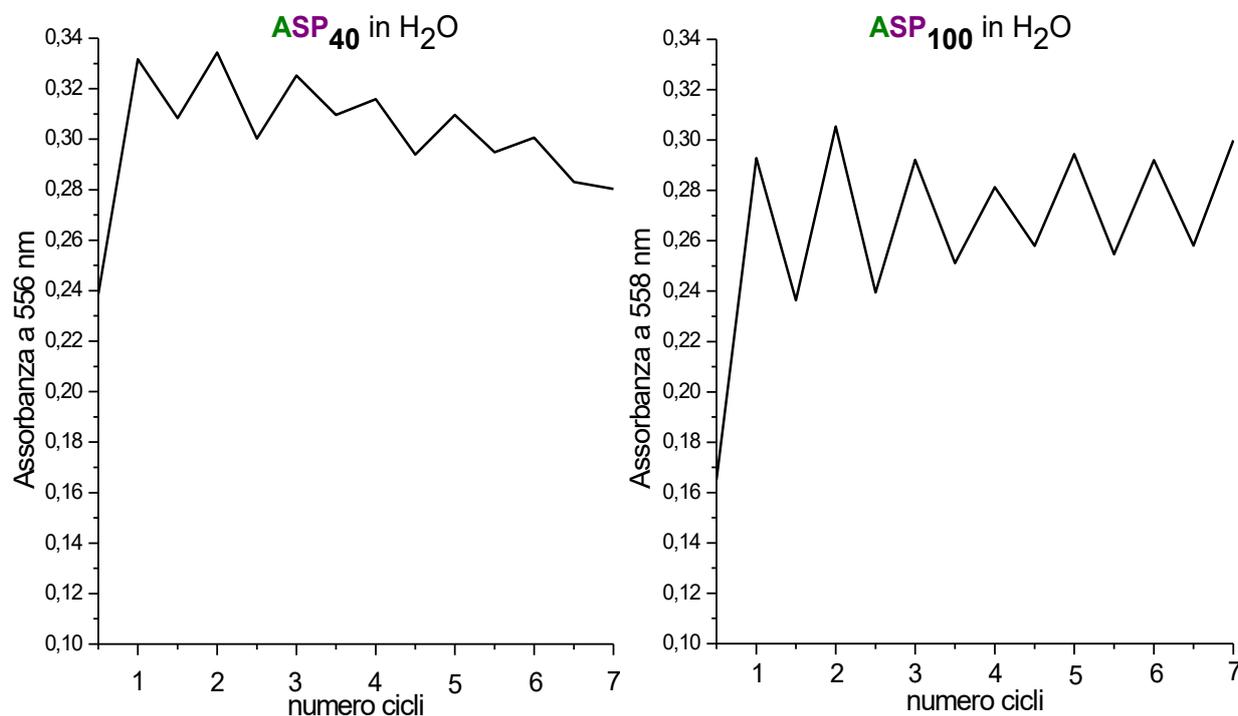


Figura 2.67 – Assorbanza della banda merocianinica in funzione del numero di cicli luce/buio per ASP_{40} (a sinistra) e ASP_{100} (a destra), in H_2O .

2.3.5.4 THF

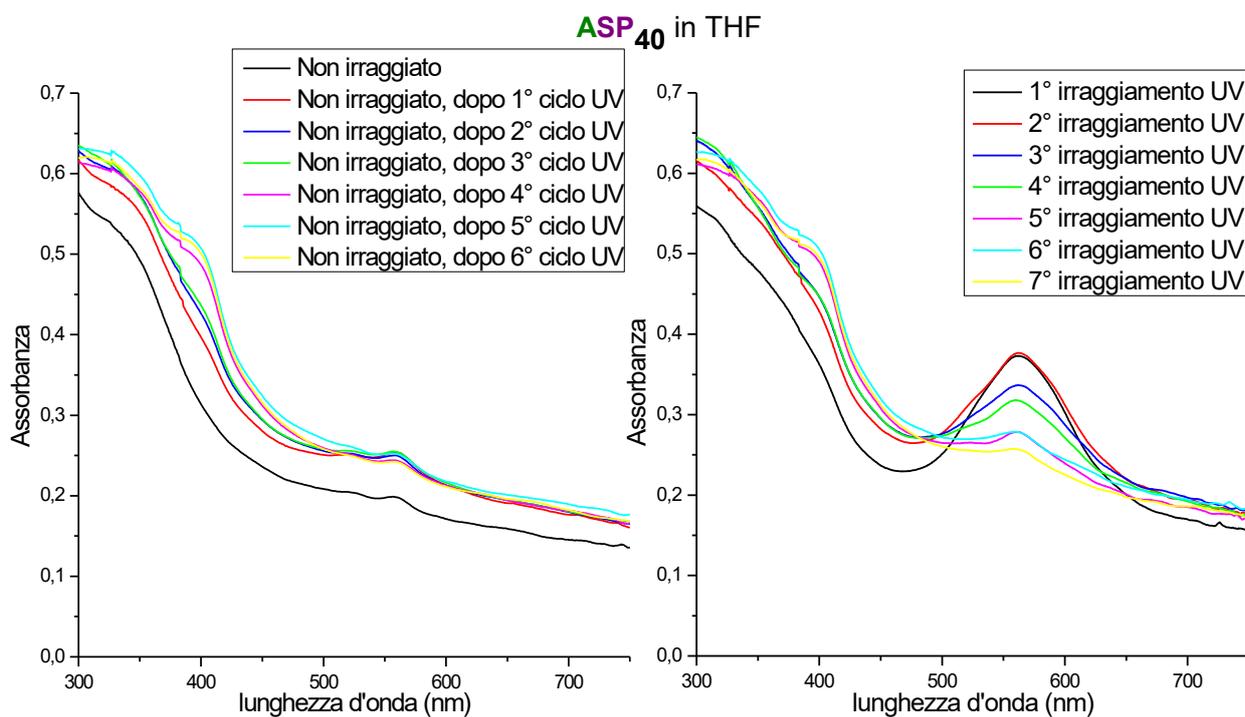


Figura 2.68 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₄₀ in THF, non irradiato (a sinistra) e irradiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

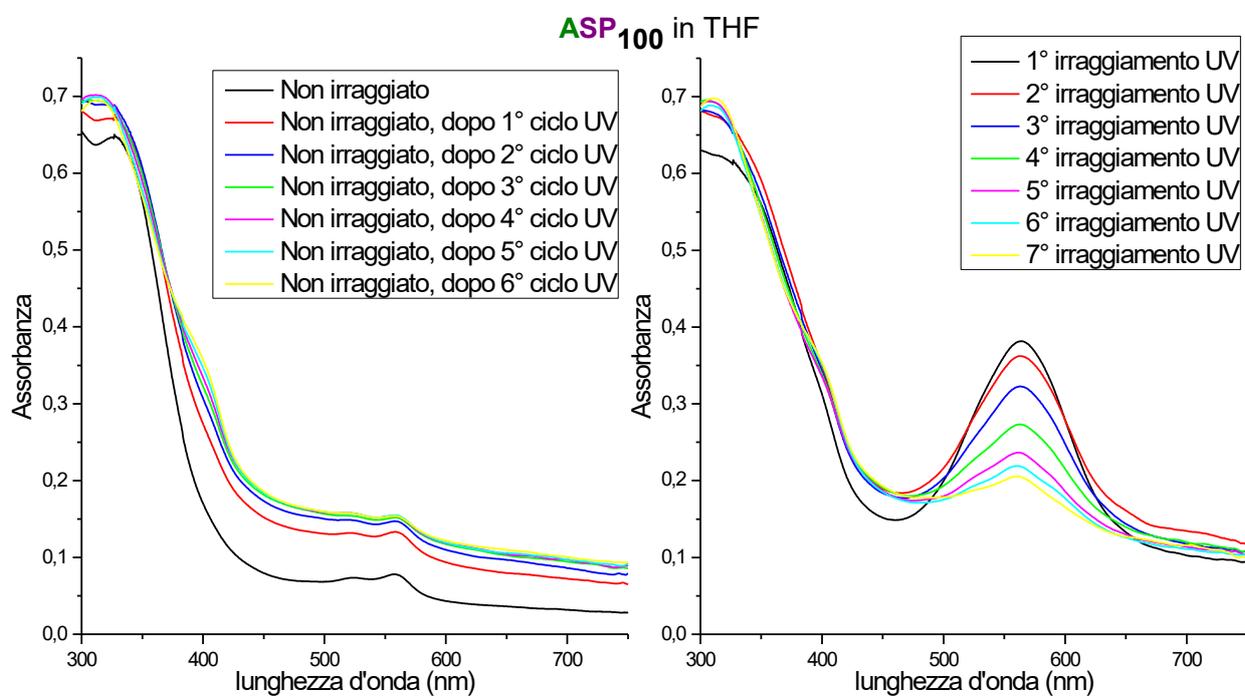


Figura 2.69 – Sovrapposizione degli spettri UV/Vis di ASP₁₀₀ in THF, non irradiato (a sinistra) e irradiato (a destra), dopo ogni ciclo luce/buio.

Per i sistemi in THF si nota che l'ASP₄₀ è più insolubile di ASP₁₀₀ e che, in generale per entrambi i sistemi, si osserva un aumento di scattering di luce dopo il primo ciclo di irraggiamento, come mostrato dall'aumento del valore della linea di base negli spettri in figura 2.68 e 2.69. Il motivo di questo risultato sperimentale è ricercabile nella natura della merocianina, che nei solventi apolari tende a formare aggregati insolubili, stabili anche al buio. La variazione di scattering osservata è attribuibile ad una variazione delle dimensioni delle particelle in dispersione. Infatti, è noto che la quantità di luce diffusa aumenta con le dimensioni della fase dispersa.

Esaminando gli spettri dei campioni irraggiati, si può invece notare che l'assorbanza della banda della merocianina a 570 nm diminuisce gradualmente dopo ogni ciclo di irraggiamento, come evidenziato in figura 2.70.

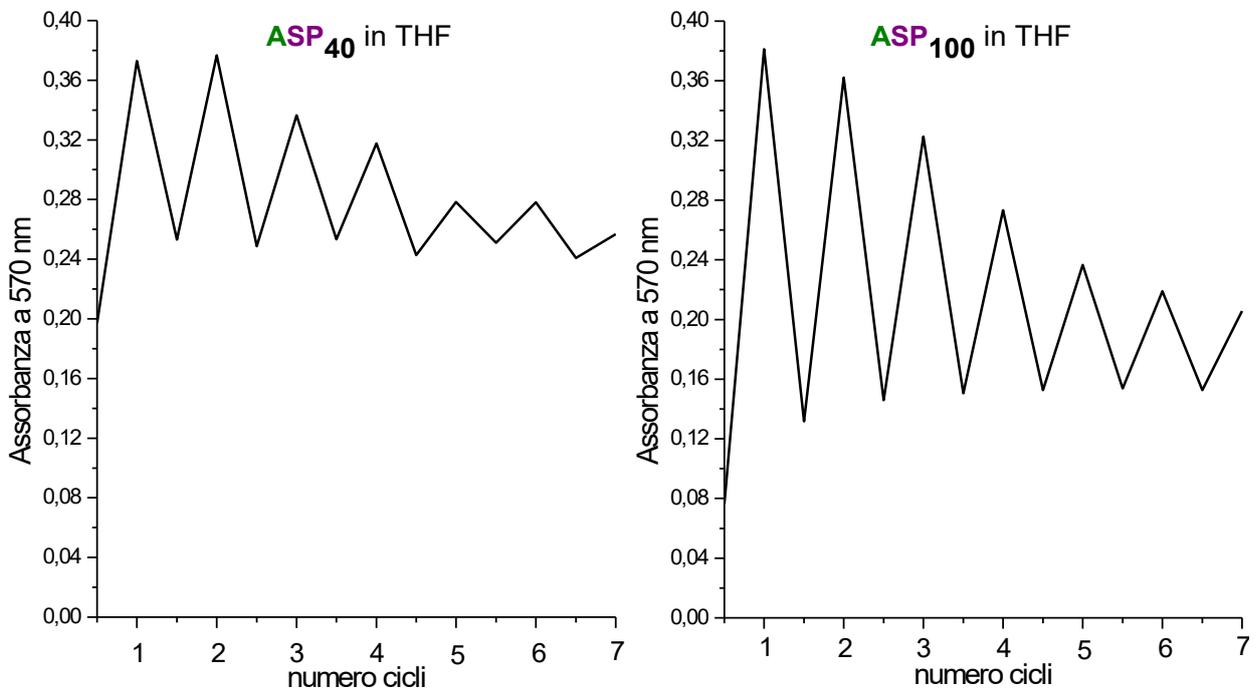


Figura 2.70 – Assorbanza della banda merocianinica in funzione del numero di cicli luce/buio per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra), in THF.

Come in H₂O, anche in THF la banda a 400 nm attribuita alla merocianina protonata è poco evidente dagli spettri di assorbimento UV/Vis. Anche in questo caso, allo scopo di evidenziarne la presenza e la sua crescita con i cicli di irraggiamento, è stata fatta la sottrazione dello spettro del campione non irraggiato a quelli dei campioni irraggiati con luce UV, dopo il primo e dopo il settimo ciclo (figura 2.71), che elimina i contributi di scattering lasciando solo quelli di assorbimento.

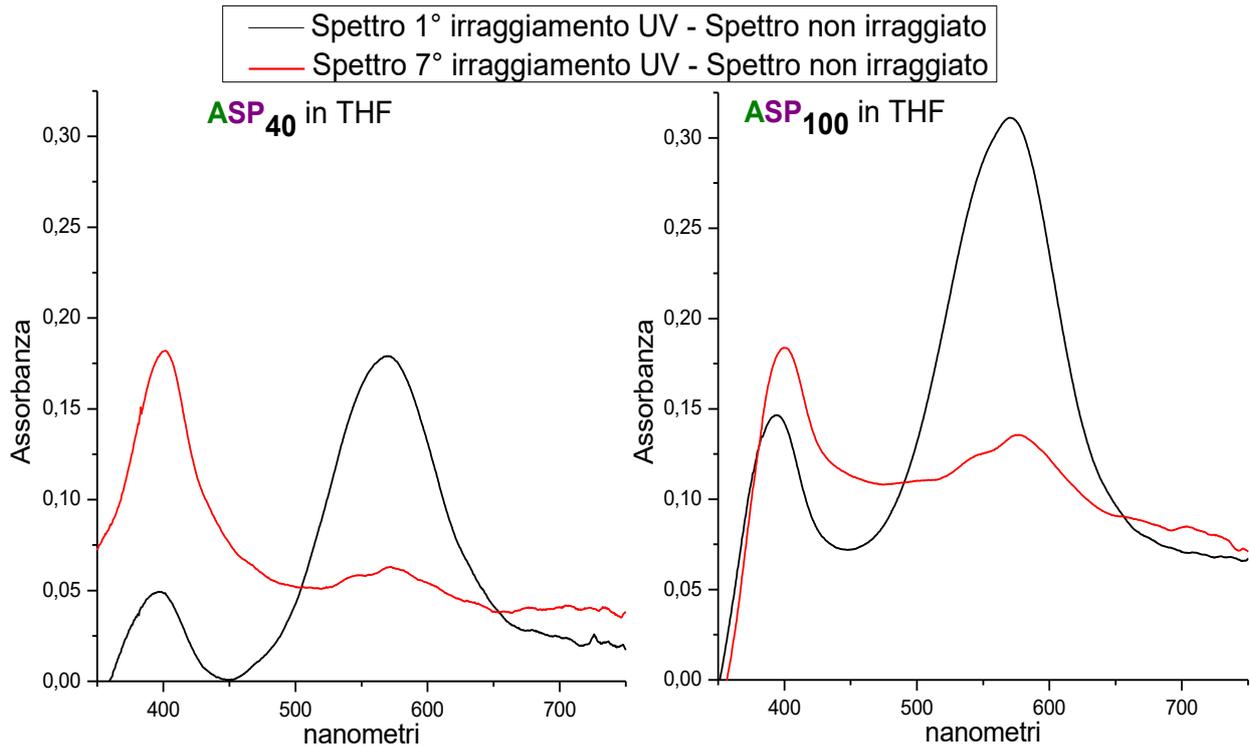


Figura 2.71 – Sottrazione tra spettro del campione subito dopo il 1° irraggiamento UV e spettro del campione non irraggiato (curve nere) e tra spettro del campione subito dopo il 7° irraggiamento UV e quello del campione non irraggiato (curve rosse), per ASP₄₀ (a sinistra) e ASP₁₀₀ (a destra) in THF.

Da questa operazione di sottrazione risulta evidente anche il progressivo aumento delle dimensioni delle particelle disperse, discusso precedentemente, parallelamente all'aumento del tempo cumulativo di irraggiamento. In particolare, questo effetto è osservabile dalla assorbanza progressivamente crescente a 750 nm, che raggiunge il valore massimo al termine dei 7 cicli di irraggiamento (curve rosse in figura 2.71).

A differenza di quanto osservato per le soluzioni in DMSO, DMF e H₂O, sia per l'ASP₄₀ che per l'ASP₁₀₀ l'incremento dell'assorbanza a 400 nm non segue un andamento lineare in funzione del tempo cumulativo di irraggiamento (proporzionale al numero di cicli luce/buio) ma piuttosto una crescita di tipo esponenziale (figura 2.72).

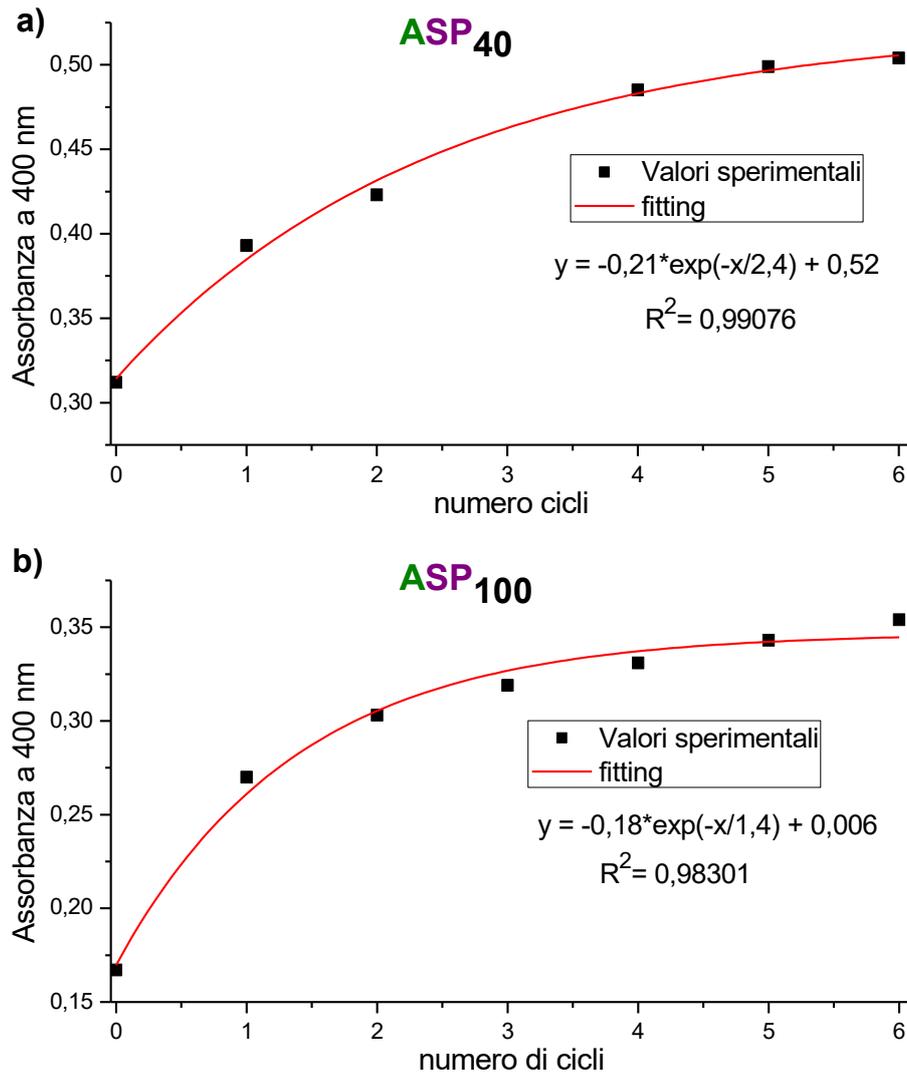


Figura 2.72 – Assorbanza a 400 nm in funzione del numero di cicli di irradiazione UV per (a) ASP₄₀ e (b) ASP₁₀₀ in THF.

Il valore di R^2 maggiore nel caso di ASP₄₀ indica una più alta correlazione col modello esponenziale rispetto ad ASP₁₀₀. Inoltre i valori di t_1 , tempo di irradiazione cumulativo per il quale l'assorbanza è pari alla metà del suo valore massimo, che sono pari rispettivamente a 2,4 e 1,4 minuti per ASP₄₀ e ASP₁₀₀, indicano una velocità di crescita più elevata per quest'ultimo. Questa differenza tra i due diversi gradi di modifica si può provare a spiegare considerando la maggiore solubilità di ASP₁₀₀ rispetto a ASP₄₀.

2.4 DISCUSSIONE DEI RISULTATI UV

Nel tentativo di spiegare la formazione e la crescita della banda situata nella regione tra 400 e 450 nm negli spettri di assorbimento UV/Vis dei campioni sottoposti ad irraggiamento con luce UV, è stata fatta una approfondita ricerca in letteratura. Tutte le pubblicazioni sull'argomento attribuiscono le bande in questa regione spettrale alla forma protonata della merocianina^{96,165,166,167,168,169} (figura 2.73).

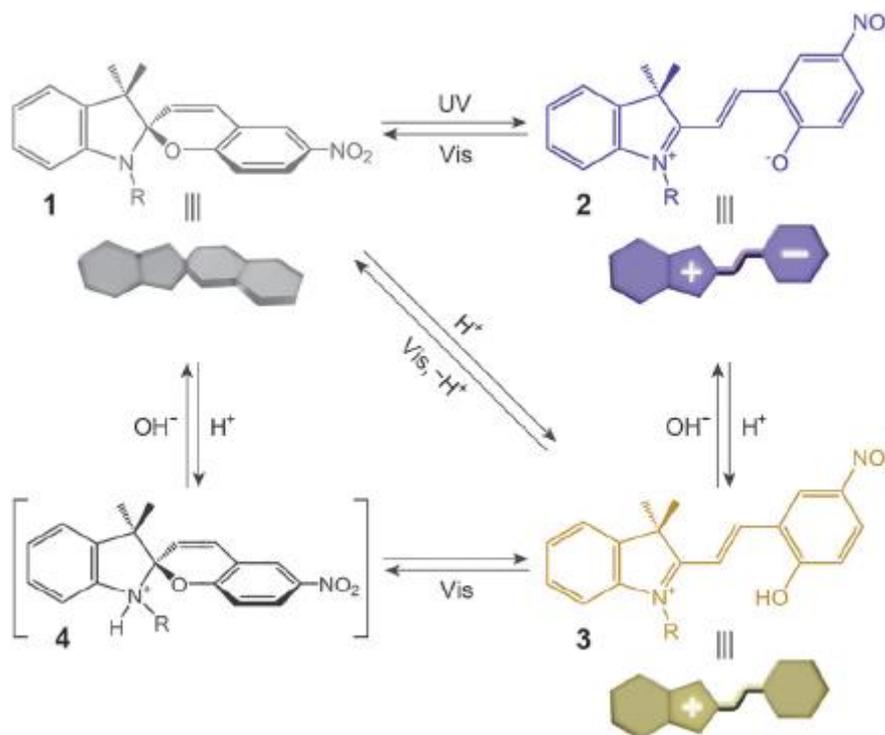


Figura 2.73 – Equilibri tra le quattro forme: spiropirano (SP) **1**, merocianina (MC) **2**, merocianina protonata (MCH⁺) **3**, spiropirano protonato (SPH⁺) **4**. Nota: la posizione di questi equilibri è fortemente influenzata dall'intorno chimico e, per molecole immobilizzate su un supporto, dalla natura della matrice¹⁶⁶.

Per verificare la validità di questa interpretazione, il campione ASP₄₀ in DMF, precedentemente sottoposto a sette cicli luce/buio, avente una colorazione gialla intensa, è stato basificato per aggiunta di 1 equivalente di KOH (20 µl di una soluzione 10:1 DMF/H₂O di KOH 0,01 M), rispetto allo spiropirano. Tale aggiunta non ha dato luogo a nessuna variazione di colore osservabile e corrispondentemente a nessun cambiamento nello spettro di assorbimento nella regione del visibile (figura 2.74). Ulteriori aggiunte di base hanno prodotto soltanto una diluizione del campione, con corrispondente diminuzione dell'intensità di assorbimento di tutto lo spettro. Tale risultato è apparentemente in contrasto con i dati di

letteratura, in cui si riporta che l'aggiunta di ioni OH^- sposta l'equilibrio dalla forma protonata della merocianina a quella zwitterionica (figura 2.73), con corrispondente cambiamento di colore.

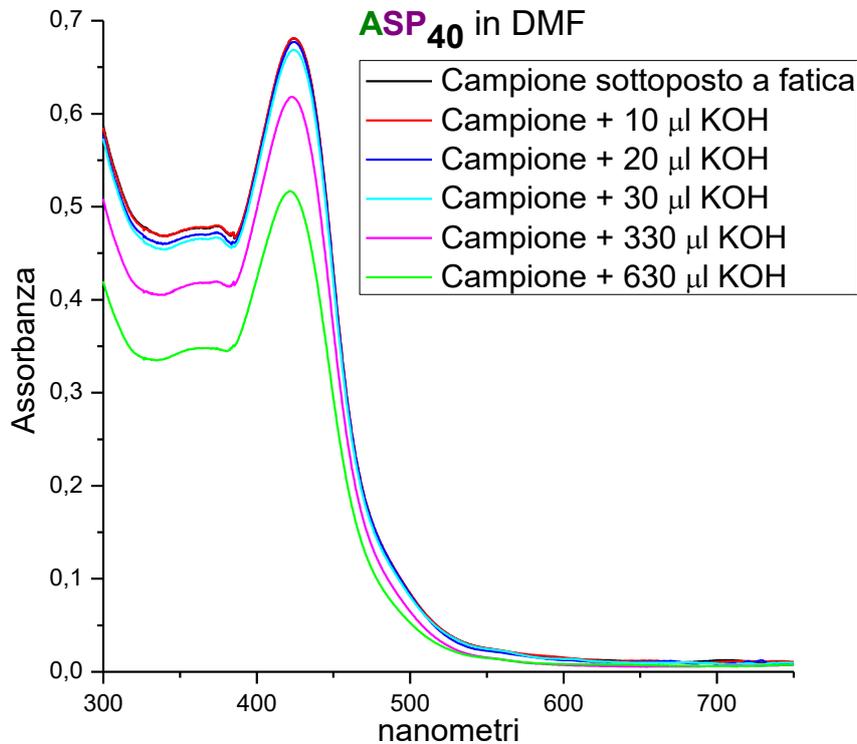


Figura 2.74 – Spettri UV/Vis di ASP_{40} in DMF sottoposto a fatica e con aggiunta progressiva di KOH 0,01M.

Successivamente, al campione ASP_{40} in DMSO sottoposto ai cicli luce/buio, sono state aggiunte aliquote successive di 20 μl di una soluzione acquosa di HCl 0,1 M (6,66 equivalenti rispetto allo spiroirano). Subito dopo la prima aggiunta la soluzione si è decolorata passando da un colore giallo intenso a incolore. Corrispondentemente, nello spettro UV/Vis è scomparsa la banda a 425 nm ed è rimasto soltanto il segnale a circa 340 nm della forma chiusa SP, che risulta aumentato in intensità. Successive aggiunte di acido non hanno prodotto ulteriori variazioni nello spettro (figura 2.75).

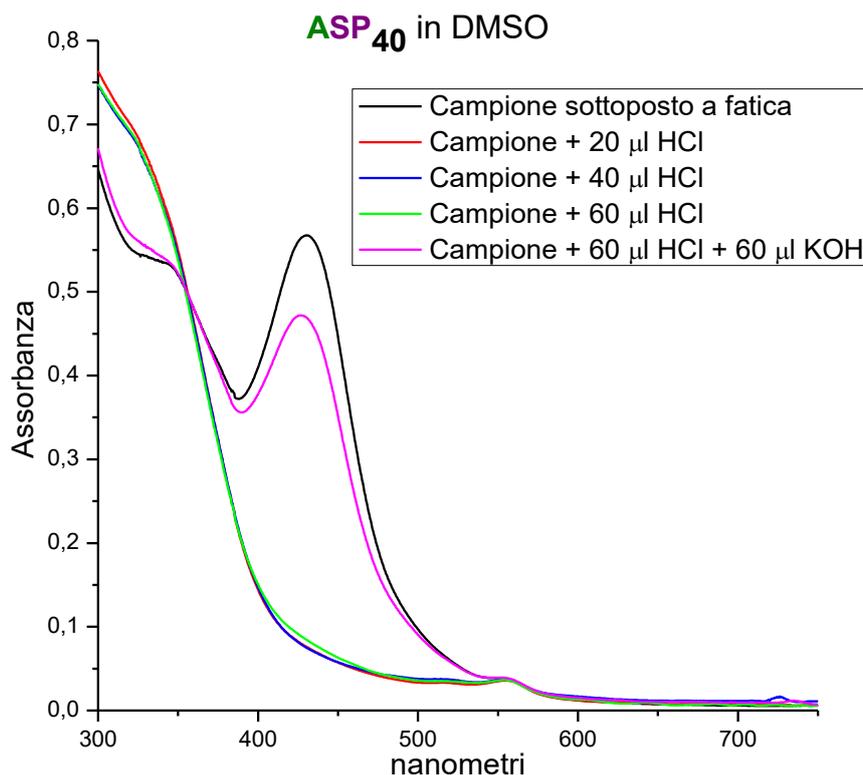


Figura 2.75 – Spettri UV/Vis di ASP_{40} in DMSO sottoposto a fatica e con aggiunta progressiva di HCl 0,1M e KOH 0,1 M.

La successiva neutralizzazione dell'acido con una quantità equivalente di KOH (soluzione 10:1 DMSO/H₂O di KOH 0,1 M) ha restaurato il colore iniziale della soluzione e ha prodotto la ricomparsa della banda a 425 nm nello spettro UV/Vis. L'intensità di quest'ultima banda è risultata inferiore a quella di partenza, mentre l'intensità di quella a 340 nm è tornata al suo valore iniziale.

Il comportamento fin qui descritto sembra in netta contrapposizione con quello riportato in letteratura, secondo cui l'equilibrio $MC \leftrightarrow MCH^+$ in presenza di acido dovrebbe essere spostato verso la forma protonata della merocianina (figura 2.73).

L'eventuale formazione della merocianina protonata potrebbe essere una conseguenza della presenza di tracce di umidità residue derivanti dal polimero e/o dal solvente. Inoltre, non si può escludere che la merocianina possa strappare un protone dai gruppi idrossilici del polisaccaride. Se queste ipotesi possono giustificare la formazione della merocianina protonata, tuttavia non forniscono spiegazioni sul perché al buio essa non ritorni alla forma SP e neppure perché l'aggiunta della base non sposti l'equilibrio verso la forma zwitterionica (figura 2.73). Per comprendere le cause di questo comportamento, è utile fare riferimento a due diversi lavori di letteratura in cui si riporta l'inversione di stabilità della forma MC (o

MCH⁺) rispetto alla SP in ambienti particolarmente polari^{96,166}. In particolare è stato riportato che lo spiroirano legato all'acido poli-L-glutammico è stabile in forma merocianinica quando sciolto in esafluoroisopropanolo (HFIP) e la forma SP ottenuta per irraggiamento con luce visibile è metastabile⁹⁶. In modo simile, la forma MCH⁺ è più stabile di quella SP quando la molecola è confinata all'interno dei nanopori di zeoliti, contenenti gruppi idrossilici sulla superficie¹⁶⁶. E' noto, infatti, che la stabilità delle diverse forme dello spiroirano dipende dalle interazioni tra molecola e matrice ed è sufficiente che quest'ultima presenti un leggero carattere di acido di Brønsted per spostare l'equilibrio verso la forma protonata.

Per analogia con i due casi sopra menzionati, si può ipotizzare che la forma MCH⁺ risulti stabilizzata nelle specifiche condizioni adottate in questo lavoro di tesi, in cui essa è legata ad un substrato polisaccaridico, ricco di gruppi –OH.

A differenza dei lavori menzionati, nel nostro caso le forme MC e MCH⁺ non si formano spontaneamente, ma per irraggiamento con lampada UV. Tuttavia, una volta formate esse appaiono stabili. Questa differenza si può spiegare considerando la complessità dei sistemi polimerici e i loro possibili diversi stati organizzativi, che dipendono anche dalla storia preparativa. In particolare, i nostri sistemi sono stati ottenuti in forma solida per coagulazione in etanolo, un non-solvente del polisaccaride con capacità solvatante per i gruppi SP. Questa procedura potrebbe aver indotto una segregazione della catena macromolecolare polisaccaridica in domini separati rispetto alle funzionalità spiroiramiche in catena laterale, forzando i polisaccaridi modificati in una conformazione che potrebbe essere molto diversa da quella del polisaccaride non modificato, o anche da quella termodinamicamente più stabile del polisaccaride modificato. Le prove di solubilità hanno mostrato che i sistemi studiati, anche nei casi più favorevoli, non si sciolgono facilmente ed è necessario fornire calore per ottenere soluzioni che non diano scattering di luce visibile. Anche in questi casi, tuttavia, non si può escludere che il polisaccaride funzionalizzato sia presente in nanodomini colloidali aventi dimensioni inferiori a $\lambda/2$ (dove λ è la lunghezza d'onda della radiazione visibile). In questa organizzazione diversi gruppi spiroirano potrebbero trovarsi in intorni differenti e quindi mostrare comportamento diverso quando irraggiati: i gruppi collocati in prossimità della catena polisaccaridica darebbero MCH⁺, mentre quelli circondati prevalentemente da altri gruppi spiroirano si trasformerebbero principalmente in MC. La progressiva formazione di merocianina protonata, dotata di una carica netta positiva, produce un cambio conformazionale del polisaccaride da *random coil* a bacchetta, a causa della repulsione coulombiana tra cariche dello stesso segno. La risultante riorganizzazione della catena polimerica produrrebbe anche una redistribuzione spaziale dei gruppi ad esso legati, che si

troverebbero progressivamente più lontani gli uni dagli altri. Di conseguenza ad ogni step di irraggiamento si riduce la quantità di molecole MC formate, mentre MCH^+ si accumulerebbe di step in step .

L'ultima questione in sospeso riguarda l'effetto dell'aggiunta di ioni H^+ , che sperimentalmente è in contasto con quanto riportato in letteratura. In particolare, con l'aggiunta di acido ci si aspettava di osservare un aumento dell'assorbanza in corrispondenza della banda a 425 nm negli spettri di assorbimento UV/Vis; al contrario, quella che si osserva è addirittura la scomparsa di tale banda e un aumento di quella a 340 nm. Per spiegare questo comportamento anomalo si può ipotizzare che le molecole nella forma SP ancora presenti dopo i cicli luce buio siano prevalentemente in zone poco accessibili agli ioni H^+ . Al contrario nelle zone più polari, accessibili ai protoni, i gruppi fotoresponsivi si troverebbero prevalentemente in forma MCH^+ . Il sito basico di questa specie che può subire protonazione non è l'ossigeno fenolico ma l'azoto della parte indolinica, e la protonazione del doppio legame tra l'azoto indolinico e il carbonio della ex spiro-giunzione ne causa la scissione, generando un carbocatione particolarmente instabile che reagisce con l'ossigeno fenolico con conseguente chiusura dell'anello e formazione dello spiropirano protonato in forma chiusa, SPH^+ (4 in figura 2.73). Quest'ultima, pur essendo una specie transiente nelle condizioni non confinate tipiche di una specie molecolare in soluzione, potrebbe essere stabilizzata nel caso di confinamento con ridotta mobilità ed intorno polare. Inoltre, facendo riferimento alla figura 2.73, si osserva che gli equilibri in gioco e la loro dipendenza dall'ambiente acido o basico sono in accordo con quanto appena ipotizzato. Infatti, l'equilibrio tra SP e SPH^+ in presenza di ioni H^+ è spostato verso quest'ultimo, per cui con l'aggiunta di acido al nostro sistema non si raggiunge la trasformazione ad SP ma ci si ferma ad SPH^+ . Con la successiva neutralizzazione dell'acido, l'equilibrio si sposta nuovamente verso la merocianina protonata; tuttavia è possibile che una parte delle molecole in forma SPH^+ ritorni verso l'isomero SP attraverso l'equilibrio $SP \leftrightarrow SPH^+$, grazie alla presenza degli ioni OH^- (figura 2.73). Questa ipotesi spiegherebbe anche il non completo ritorno ai valori di intensità iniziale della banda a 425 nm e un leggero aumento di quella a 340 nm (figura 2.75) a seguito del ciclo acidificazione-basificazione.

3 CONCLUSIONI

Un campione di amilosio da patate commerciale e un'amilopectina da mais con grado di ramificazione di 1 ogni 13 unità ripetenti sono stati funzionalizzati con gruppi azidici seguendo una procedura già riportata in letteratura. I prodotti di reazione, caratterizzati attraverso spettroscopia FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$, sono risultati modificati quantitativamente e regio-selettivamente in posizione C6, in accordo con i dati di letteratura. Tali prodotti sono poi stati modificati per reazione di cicloaddizione [2+3] dipolare catalizzata da Cu(I) con uno spiropirano dotato di una funzionalità alchonica (SPCC) e/o con propargil alcool (PA). In particolare, i polisaccaridi azidati sono stati modificati quantitativamente con SPCC o PA (rapporto molare 100/100 tra derivati alchionici e unità glucopiranosiche) e con una miscela 40/60 di SPCC e PA. Il propargil alcool, scelto quale specie capace di ripristinare il gruppo idrossilico originariamente presente sul polisaccaride, è stato alimentato insieme allo spiropirano, per evitare reazioni indesiderate dovute alla presenza di gruppi azide non reagiti nel prodotto finale. Due ulteriori derivati modificati completamente con propargil alcool sono stati preparati inoltre come riferimento. Nel caso delle reazioni con solo SPCC, condotte in leggero eccesso del cromoforo alchionico nell'alimentazione, quando l'alchino non è stato più rilevabile dallo spettro IR la banda azidica era tuttavia ancora visibile, portando a ipotizzare che la funzionalizzazione di tutte le unità monomeriche del polisaccaride sia ostacolata da problemi di ingombro sterico. Anche in questo caso, come in quello del campione 40/60, le unità azidiche residue sono state convertite in gruppi idrossilici per reazione con un eccesso di PA.

I sei derivati dalla reazione di click, tre a base di amilosio (ASP_{100} , ASP_{40} , APA_{100}) e tre di amilopectina ($APSP_{100}$, $APSP_{40}$ e $APPA_{100}$), sono stati purificati per doppia coagulazione in etanolo, ed infine per esaustiva dialisi prima contro una soluzione acquosa di EDTA e poi contro acqua ultrapura.

Nonostante la complessa procedura di purificazione, l'analisi EPR ha mostrato la presenza di residui di rame(II) in tutti i campioni eccetto nell'amilosio modificato con PA, ad indicare l'esistenza di interazioni forti tra il catione metallico ed i polisaccaridi modificati. Gli spettri EPR dei derivati con lo spiropirano hanno rivelato la presenza di un radicale organico la cui intensità aumenta per irraggiamento UV. Seppure siano necessari ulteriori approfondimenti per meglio comprendere l'origine e la natura di tale specie, sulla base dei dati a disposizione è possibile ipotizzare che esso sia localizzato sull'azoto indolinico del cromoforo e derivi da una reazione ossido-riduttiva catalizzata dal rame(II) residuo.

I test di solubilità hanno mostrato per i derivati dell'amilosio una solubilità in DMSO e DMF decrescente nell'ordine: $APA_{100} > ASP_{40} > ASP_{100}$, ossia all'aumentare della quantità di spiropirano innestato sul polisaccaride. Nel caso dei derivati dell'amilopectina solo il polimero funzionalizzato al 100% con propargil alcool ($APPA_{100}$) è risultato solubile nei due solventi, mentre quelli con lo spiropirano non si sciolgono né in acqua né nei comuni solventi organici. Le ragioni della diversa solubilità dei derivati dell'amilosio e dell'amilopectina potrebbero essere dovute ad un diverso peso molecolare dei polisaccaridi di partenza, maggiore per l'amilopectina, come testimoniato dalla più lenta cinetica di dissoluzione in acqua e in DMSO di quest'ultima.

Tutti i derivati solubili in DMSO sono stati caratterizzati mediante 1H -NMR e ^{13}C -NMR. Quest'ultima analisi è stata condotta in soluzione per i due derivati con solo PA (più solubili), e allo stato solido per i due derivati con SPCC, dotati di solubilità insufficiente per questa analisi in soluzione. I risultati ottenuti hanno permesso di confermare le strutture attese per tutti i prodotti analizzati e di escludere la presenza di quantità significative di SPCC non legato.

I due derivati dell'amilosio con diverso quantitativo di cromoforo legato (ASP_{40} e ASP_{100}) sono stati scelti per condurre lo studio mediante spettroscopia UV/Vis in quattro diversi solventi: acqua, THF, DMSO e DMF. I prodotti scelti hanno mostrato una scarsa solubilità nei primi due, buona negli altri. Un risultato insolito riguarda la solubilità in THF di ASP_{100} che risulta più solubile di ASP_{40} , ad indicare il ruolo fondamentale delle funzionalità spiropiraniche nel determinare la solubilità dei polimeri innestati.

A seguito dell'irraggiamento in THF, lo scattering di luce aumenta per entrambi, seppure in maniera maggiore per ASP_{100} , facendo supporre l'insorgenza di effetti aggregativi tra le particelle disperse, probabilmente dovuti alla variazione di carica superficiale (potenziale zeta) per effetto della formazione di merocianina zwitterionica e/o protonata.

Gli spettri UV/Vis di ASP_{40} e ASP_{100} nei quattro solventi di analisi si differenziano, sia prima che dopo irraggiamento con luce UV, per la posizione delle bande caratteristiche. In particolare, prima dell'esposizione alla radiazione ultravioletta la differenza più significativa è la presenza di una banda con massimo a circa 420-430 nm in DMF e in DMSO, che è stata attribuita all'assorbimento della merocianina in forma protonata. Dopo irraggiamento in tutti i solventi compare una banda con massimo nella regione compresa tra 555 e 570 nm, caratteristica della merocianina prevalentemente in forma zwitterionica. La posizione esatta del massimo varia in funzione sia del solvente che del grado di funzionalizzazione. Le differenze dovute al solvente sono attribuite ad un diverso rapporto tra le due forme di

risonanza di MC (zwitterionica e chinonica). Le differenze tra ASP_{40} e ASP_{100} sono, invece, state attribuite alla formazione di aggregati di tipo H in DMSO e J in DMF.

L'intensità della banda della merocianina in DMSO e in DMF decade, con un tempo di dimezzamento di 5-6 minuti, al valore iniziale che aveva prima dell'irraggiamento nel caso di ASP_{40} , e ad un valore di poco superiore per ASP_{100} . In acqua, dopo un giorno al buio, l'intensità di tale banda appare appena percettibilmente diminuita, ad indicarne una maggiore stabilità di quella in DMSO e DMF. Tale differenza può essere attribuita alla ridotta mobilità del polimero in H_2O , nella quale si trova in particelle solide disperse. Come già accennato in precedenza, in THF l'irraggiamento con luce UV, oltre alla comparsa della banda della merocianina, provoca un aumento della luce diffusa a causa dell'aggregazione tra le particelle in dispersione. Tale fenomeno pare essere irreversibile anche tenendo il campione al buio per 24 ore, mentre nelle stesse condizioni MC retro-isomerizza ad SP, con corrispondente ritorno della sua banda al valore iniziale. La differenza di comportamento rispetto all'acqua, nella quale i polimeri non sono solubili analogamente come in THF, potrebbe essere dovuto alla diversa capacità dei due solventi di diffondere nei domini del coil macromolecolare più ricchi di cromoforo (che costituiscono una frazione maggiore del totale) per il THF. A causa dell'effetto plastificante di quest'ultimo, il sistema avrebbe quindi una mobilità sufficiente a permettere la reversibilità del processo di isomerizzazione; al contrario, in acqua esso si comporterebbe come allo stato solido.

Sottoponendo i campioni a cicli ripetuti di luce/buio, ASP_{40} mostra effetti di fatica in tutti i solventi investigati. Al contrario il campione funzionalizzato al 100% con spiropirano (ASP_{100}) sembra essere meno suscettibile a questi effetti, particolarmente in H_2O e in DMSO; mentre in THF mostra un decadimento anche più elevato di quello di ASP_{40} .

Oltre alla diminuzione dell'intensità della banda della merocianina nei cicli successivi di irraggiamento, tutti i campioni mostrano la comparsa o l'aumento di intensità della banda a minore lunghezza d'onda di assorbimento attribuita alla merocianina protonata, la quale non decade termicamente durante le fasi di buio. Per spiegare tale fenomeno si è ipotizzato che l'isomerizzazione dello spiropirano sia accompagnata da una riorganizzazione strutturale del polisaccaride funzionalizzato, in cui i gruppi cromofori vengono via via a trovarsi in intorni in cui la specie MCH^+ è stabilizzata dalla presenza del polisaccaride.

Uno sviluppo interessante di questo lavoro di tesi potrebbe riguardare lo studio con laser di lunghezza d'onda che cada all'interno delle bande di assorbimento delle varie specie, per verificare, per esempio, se la forma protonata della merocianina possa isomerizzare per irraggiamento laser. Inoltre potrebbe essere interessante verificare la possibilità di ottenere dei

film dalle soluzioni dei prodotti fotoattivi e studiarne il comportamento ottico/responsivo allo stato solido.

La buona resistenza alla fatica mostrata da ASP_{100} , particolarmente in acqua, in cui il comportamento appare assimilabile a quello allo stato solido, rende questo derivato promettente per applicazioni in *smart coating*. Per analogia con il comportamento riportato in letteratura per chitosano funzionalizzato con lo stesso spiropirano si può, per esempio, pensare che esso possa essere usato in rivestimenti in cui il colore viola formato per esposizione a luce UV possa essere cancellato per irraggiamento con un laser verde. In tal modo si potrebbero realizzare anche tessuti personalizzabili.

Inoltre, i polisaccaridi funzionalizzati con spiropirano potrebbero trovare applicazione in sistemi anticontraffazione e nella sensoristica.

4 PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI IMPIEGATI

4.1.1 Solventi

N,N-dimetilformammide (DMF) (Carlo Erba): è stata mantenuta in agitazione su MgSO_4 (Sigma-Aldrich, purezza $\geq 99,5\%$) anidro per una notte e successivamente distillata su MgSO_4 a 61°C , alla pressione di 25 mmHg, e conservato in atmosfera inerte su setacci molecolari (4 Å).

Dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma-Aldrich): è stato mantenuto in agitazione su MgSO_4 anidro per una notte e successivamente distillato su MgSO_4 a 65°C , alla pressione di 7,5 mmHg, e conservato in atmosfera inerte su setacci molecolari (4 Å).

Tetraidrofurano (THF) (Sigma-Aldrich): è stato mantenuto in agitazione su KOH (Sigma-Aldrich, purezza 85–100.5%) per una notte e successivamente distillato su una lega sodio/potassio in rapporto 1:3 in peso, alla temperatura di 67°C , in atmosferica di azoto e conservato su setacci molecolari (4 Å).

Metanolo: il prodotto commerciale (Sigma-Aldrich, purezza $\geq 99,8\%$) è stato utilizzato senza ulteriore purificazione.

Etanolo: il prodotto commerciale (Fluka, purezza $\geq 99,8\%$) è stato utilizzato senza ulteriore purificazione.

Cloroformio: il prodotto commerciale (Sigma-Aldrich, purezza 99.0–99.4%) è stato utilizzato senza ulteriore purificazione.

Dimetilsolfossido deuterato (DMSO-d_6): fornito da Aldrich (99,96% atomi di deuterio).

4.1.2 Reagenti

Amilosio da patata (tipo III): prodotto commerciale (Sigma) usato senza ulteriore purificazione.

Amilopectina da mais: prodotto commerciale (Sigma) usato senza ulteriore purificazione.

Sodio azide (NaN_3): prodotto commerciale (Aldrich, purezza 99%) usato senza ulteriore purificazione.

Trifenilfosfina ($P(C_6H_5)_3$): prodotto commerciale (Sigma-Aldrich, purezza 95%) usato senza ulteriore purificazione.

Tetrabromometano (CBr_4): prodotto commerciale (Aldrich, purezza 99%) usato senza ulteriore purificazione.

Cloruro di rame(I) ($CuCl$): prodotto commerciale (Aldrich, purezza 97%) usato senza ulteriore purificazione.

N,N,N',N'',N'''-pentametildietilentriammina (PMDETA): prodotto commerciale (Aldrich, purezza 98%) usato senza ulteriore purificazione.

Propargil alcool: prodotto commerciale (Aldrich, purezza 99%) usato senza ulteriore purificazione.

Ascorbato di sodio: prodotto commerciale (Sigma, purezza 98%) usato senza ulteriore purificazione.

Acido etilendiamminotetraacetico sale bisodico biidrato ($EDTA-Na_2$): prodotto commerciale (Sigma, purezza 98.5–101.5 %) usato senza ulteriore purificazione.

1',3'-diidro-3',3'-dimetil-1'-propargil-6-nitrospiro[2H-1-benzopiran-2,2'-(2H)-indolo] (SPCC): prodotto precedentemente sintetizzato in laboratorio⁶⁴.

4.2 STRUMENTI E METODI DI ANALISI

4.2.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

I termogrammi TGA sono stati acquisiti tramite uno strumento termogravimetrico SII TG/DTA 7200 EXSTAR, Seiko, nell'intervallo di temperature tra 30 °C e 800 °C ad una velocità di 10 °C/min, o tra 30°C e 200°C a 5°C/min. In entrambi i casi le analisi sono state condotte sotto un flusso di azoto di 200 mL/min. 5-10 mg di ciascun campione sono stati analizzati in capsule di ceramica. I termogrammi ottenuti sono stati analizzati riportando: la percentuale in peso di residuo finale al termine dell'analisi e le temperature di onset e di flesso per ciascuno step di perdita di peso. Queste due temperature sono così definite: la prima come la temperatura di inizio processo (degradazione o evaporazione) e viene determinata dall'intercetta delle due rette tangenti alla curva nel punto di cambio di pendenza (flesso); la seconda è la temperatura di massima velocità del processo responsabile della perdita in peso del campione, corrispondente al massimo della derivata prima della curva.

Il primo step di perdita di peso è stato attribuito all'evaporazione dell'acqua e la perdita in peso a 160°C è stata assunta come quantità di umidità presente nel campione.

4.2.2 Spettroscopia FT-IR

Gli spettri FT-IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Jasco FT/IR-6200. Lo strumento è interfacciato ad un PC con software "Spectrum Manager Version 2" per l'acquisizione dei dati.

Gli spettri dei campioni in polvere sono stati acquisiti mescolando il campione con KBr (Sigma-Aldrich, purezza grado FT-IR $\geq 99\%$) in polvere in rapporto circa 1:9, e preparando così una pasticca per compressione con pasticcatore.

I campioni allo stato liquido, sono stati analizzati depositando circa 10 μ l di campione fra due lamine di KBr.

Gli spettri FT-IR in modalità ATR sono stati registrati con uno spettrofotometro Pelkin Elmer FT-IR Spectrum 100 equipaggiato con un accessorio per le misure ATR con cristallo di diamante. Lo strumento è interfacciato ad un PC con software "Spectrum 100" per l'acquisizione dei dati.

Tutti gli spettri sono stati elaborati sottraendo la linea di base e operando uno smoothing sullo spettro in assorbanza per ridurre il "rumore".

4.2.3 Spettrometria ^1H -NMR e ^{13}C -NMR

Le analisi NMR in soluzione sono state effettuate mediante uno spettrometro Varian Inova 600 o con Bruker Avance DRX 400, operanti rispettivamente a 600 MHz e 401,36 MHz per il nucleo ^1H , su soluzioni in dimetilsolfossido deuterato o DMSO- d_6 /D $_2$ O in rapporto 75:1. La scala di chemical shift dei nuclei ^1H è stata riferita al TMS (0 ppm) come standard esterno.

Per le analisi ^{13}C -NMR è stato utilizzato lo spettrometro Varian Inova 600 operante alla frequenza di 150 MHz.

Tutti gli spettri sono stati acquisiti a temperatura ambiente. Le analisi sono state effettuate su soluzioni a concentrazione di 10 mg/mL, o 20 mg/mL nel caso di campioni più solubili, in tubini da 5 mm di diametro.

Gli spettri ^{13}C -NMR a stato solido sono stati registrati su uno spettrometro Varian InfinityPlus 400 operante a frequenze di Larmor dei nuclei ^1H e ^{13}C rispettivamente di 400,35 MHz e 100,67 MHz, utilizzando un probe per rotori con diametro interno di 3,2 mm, con impulsi a

90° dei nuclei ^1H e ^{13}C di 2,5 μs . Tutti gli spettri sono stati registrati ruotando i campioni all'angolo magico (Magic Angle Spinning) a una frequenza di 15 kHz e utilizzando disaccoppiamento ad alta potenza dei nuclei ^1H . Gli spettri ^{13}C ottenuti con la sequenza di Cross Polarization (CP) sono stati registrati utilizzando, dopo opportune calibrazioni, un contact time di 300 μs , un recycle delay tra due scansioni successive di 2 secondi e accumulando 5000 scansioni per ASP_{100} e 22000 per ASP_{40} . Gli spettri ottenuti mediante eccitazione diretta (DE) dei nuclei ^{13}C sono stati registrati utilizzando un recycle delay tra due scansioni successive di 5 secondi e accumulando 5000 scansioni per ASP_{100} e 22000 per ASP_{40} . La scala di chemical shift dei nuclei ^{13}C è stata riferita al TMS (0 ppm) come standard esterno. Tutti gli spettri sono stati acquisiti a temperatura ambiente.

4.2.4 EPR (Risonanza Paramagnetica Elettronica)

Gli spettri EPR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro EPR Varian E112 equipaggiato con un Gaussmetro NMR Bruker ER035M ed un frequenzimetro XL Microwave 3120 per una precisa determinazione del valore di g. Lo spettrometro è interfacciato ad un computer IPC 610/P566C industrial grade Advantech tramite un sistema di acquisizione dati in grado di acquisire 500.000 campionamenti al secondo con somme in memoria che danno la media del segnale in tempo reale. I programmi utilizzati gestiscono la strumentazione e permettono la simulazione degli spettri EPR, dandone i parametri di interazione iperfini una volta inseriti i parametri ottenuti dall'analisi degli spettri.

Lo spettrometro, schematizzato in figura 4.1, è composto da una sorgente di microonde Klystron: un oscillatore elettronico che produce radiazioni nella regione delle microonde.

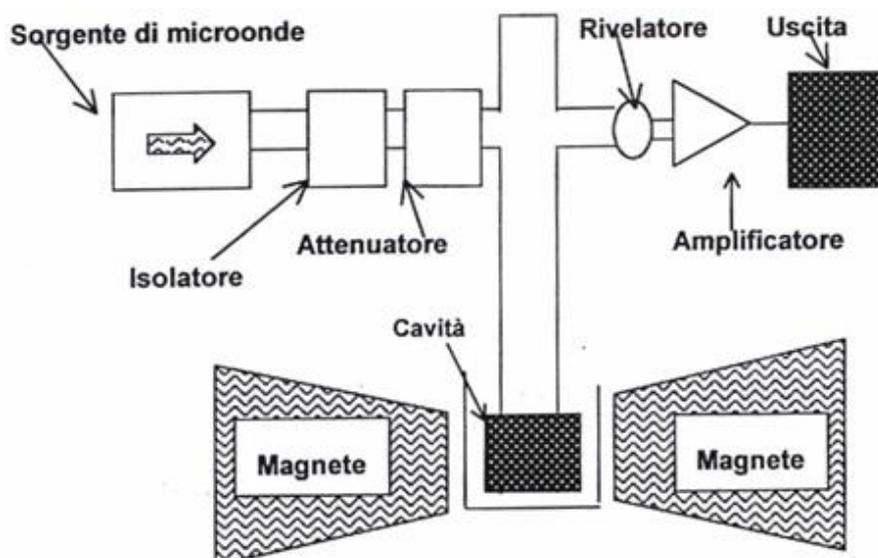


Figura 4.1 – Schema dello spettrometro EPR.

La radiazione emessa dal Klystron viene convogliata, tramite apposite guide d'onda in rame, nella cavità risonante dove è inserito il campione. L'elettromagnete crea un campo magnetico che viene fatto variare nel tempo, mentre la frequenza delle microonde rimane costante. Quando viene soddisfatta la condizione di risonanza, il campione assorbe energia, che viene rivelata come un aumento di potenza riflessa che, amplificata e registrata, produce lo spettro di assorbimento al variare del campo magnetico. Per evitare che lo spettro subisca deformazioni, allo spettrometro è collegato un attenuatore che consente di variare la potenza, in modo da evitare la saturazione del campione.

Per le misure sono stati utilizzati dei tubini per EPR in quarzo dal diametro di 3 mm.

I tubini sono stati pesati per misurarne la tara, e poi riempiti con il campione facendo attenzione a riempire il tubino solo per i primi 1-1,5 cm di altezza, volume utile per l'analisi; dopodiché sono stati ripesati e il peso del campione determinato per differenza.

Le quantità di campione utilizzate per le misure sono riportate in tabella 4.1

Tabella 4.1 – *Quantità di campione utilizzato per le misure EPR.*

Campione	Quantità (mg)
ASP ₁₀₀	12,1
APSP ₁₀₀	10,2
ASP ₄₀	9,7
APSP ₄₀	8,6
APA ₁₀₀	8,8
APPA ₁₀₀	16,6

4.2.5 Spettrofotometria UV/Vis

Gli spettri di assorbimento UV/Vis sono stati registrati tra 300 e 750 nm a temperatura ambiente mediante lo spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 25 collegato ad un PC con il software UV WinLab per l'acquisizione dei dati.

Per le analisi delle soluzioni sono state utilizzate cellette in quarzo da 1 cm di cammino ottico. Il background è stato registrato con due cellette riempite di solvente puro, mentre i campioni sono stati analizzati a confronto con il solvente puro.

4.2.6 Proprietà fotocromiche

Le soluzioni per le analisi UV/Vis sono state preparate partendo da una soluzione madre di 10 mg/mL in DMSO, solvente in cui l'amilosio modificato è risultato più solubile. Questa soluzione madre è stata ottenuta mantenendo in agitazione a 70 °C il polimero nel solvente per 24 ore. Successivamente da essa si sono ottenute, per diluizione nei diversi solventi (DMF, DMSO, H₂O e THF), soluzioni a concentrazione di 0,1 mg/mL per l'ASP₄₀ e di 0,06 mg/mL per l'ASP₁₀₀. Quest'ultima concentrazione è stata calcolata considerando di voler idealmente avere lo stesso numero di moli di spiropirano contenute nella soluzione del campione di amilosio al 40%, in modo da ottenere un valore di assorbanza pressoché uguale per i campioni a diverso grado di funzionalizzazione.

Calcoli:

Si calcolano le moli di spiropirano contenute in 1 mL di soluzione a concentrazione di 0,1 mg/mL per il campione ASP₄₀:

$PM_{\text{medio}} = \text{frazione di spiropirano nel polimero} * (PM_{\text{unità azidata}} + PM_{\text{SPCC}}) + \text{frazione di propargil alcool} * (PM_{\text{unità azidata}} + PM_{\text{propargil alcool}})$

$$PM_{\text{medio}} = 0,4 * (187,15 + 346) + 0,6 * (187,15 + 56,06) = 359,19$$

$$\text{moli di SPCC in 1 mL di soluzione} = (0,0001 / 359,19) * 0,4 = 1,11 * 10^{-7} \text{ moli}$$

Adesso si calcolano le moli di SPCC contenute in 1 mg di ASP₁₀₀:

$PM_{\text{medio}} = \text{frazione di spiropirano nel polimero} * (PM_{\text{unità azidata}} + PM_{\text{SPCC}}) + \text{frazione di propargil alcool} * (PM_{\text{unità azidata}} + PM_{\text{propargil alcool}})$

$$PM_{\text{medio}} = 0,9725 * (187,15 + 346) + 0,0275 * (187,15 + 56,06) = 523,25$$

$$\text{moli di SPCC in 0,1 mg di campione} = (0,0001 / 523,25) * 0,9725 = 1,86 * 10^{-7} \text{ moli}$$

Le moli di spiropirano in 1 mL di soluzione del campione ASP₄₀ dovranno essere uguali alle moli di SPCC in 1 mL di soluzione del campione ASP₁₀₀. Quindi:

$$0,1 \text{ mg} : 1,86 * 10^{-7} \text{ moli} = X \text{ mg} : 1,11 * 10^{-7} \text{ moli}$$

$$X = 0,0597 \text{ mg di campione ASP}_{100} \text{ in 1 mL di soluzione}$$

In conclusione, quindi, si preparano soluzioni di ASP₁₀₀ a concentrazione di 0,06 mg/mL.

4.2.6.1 Irraggiamento UV

Per l'irraggiamento delle soluzioni è stata utilizzata una lampada UV SPIRAL T3 BLACK-BLUE da 25 Watt di potenza. Le cuvette contenenti il campione sono state poste ad una distanza di 1 cm dalla lampada e le soluzioni mantenute in agitazione, tramite agitatore

magnetico, per tutto il tempo dell'esposizione alla radiazione UV. Il tempo ottimale di irraggiamento per ciascun campione è stato determinato sperimentalmente irraggiando i campioni per tempi crescenti e acquisendo lo spettro ogni volta, finché l'assorbanza della banda a 550-560 nm non raggiungeva un valore massimo.

4.2.6.2 Cinetiche di retro-isomerizzazione

Le cinetiche di fotoisomerizzazione sono state eseguite irraggiando a lunghezza d'onda fissa, in corrispondenza del massimo di assorbimento della merocianina, acquisendo un dato di assorbanza ogni 5 secondi, per una durata complessiva dell'analisi di 150 minuti.

4.2.6.3 Cicli luce/buio

Per i cicli luce/buio si è proceduto nella maniera seguente: è stato acquisito lo spettro di assorbimento UV/Vis del campione lasciato al buio, dopodiché esso è stato irraggiato con una lampada UV per un tempo ottimale determinato sperimentalmente e immediatamente riacquisito lo spettro. A questo punto il campione è stato quindi lasciato al buio per consentire il ritorno allo stato in cui si trovava prima dell'irraggiamento. Le operazioni descritte sono state ripetute il giorno successivo con le stesse modalità, per un totale di 7 cicli di irraggiamento/buio per ciascun campione.

4.2.7 Prove di solubilità

Le prove di solubilità nei quattro solventi DMSO, DMF, H₂O e THF, sono state eseguite mediante spettrofotometria UV/Vis di soluzioni a concentrazione di 0,1 mg/mL, preparate sia direttamente nel solvente di analisi sia per diluizione da una soluzione madre in DMSO a concentrazione 10 mg/mL.

Le soluzioni sono state analizzate a diversi intervalli di tempo dalla loro preparazione, lasciandole al buio e in agitazione alla temperatura di 70 °C (60 °C nel caso del THF), tra un'analisi e l'altra.

4.3 CARATTERIZZAZIONE DEI REAGENTI

4.3.1 Amilosio

Polisaccaride lineare composto da catene di D-glucosio concatenate α -(1 \rightarrow 4).

Peso molecolare dell'unità glicosidica = 162 u.m.a.

La caratterizzazione IR e l'analisi termogravimetrica dell'amilosio hanno fornito:

ATR-IR cm^{-1} : 3295 (v, O-H); 2929 (v, CH₂); 1639 (δ , acqua); 1336 (δ , CH₂); 1150 e 1077 (v, C-O anello glicosidico); 998; 930; 860; 763.

TGA: Tabella 4.2

Tabella 4.2 – Analisi TGA dell'amilosio.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
8,2	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	21,9
	251,2	278,2	

4.3.2 Amilopectina

Polisaccaride composto da catene di D-glucosio concatenate α -(1 \rightarrow 4) con ramificazioni α -(1 \rightarrow 6) ogni circa 20-30 residui glicosidici.

Peso molecolare dell'unità glicosidica = 162 u.m.a.

La caratterizzazione IR e l'analisi termogravimetrica dell'amilopectina hanno fornito:

ATR-IR cm^{-1} : 3279 (v, O-H); 2929 (v, CH₂); 1639 (δ , acqua); 1336 (δ , CH₂); 1150 e 1077 (v, C-O anello glicosidico); 998; 930; 860; 763.

TGA: Tabella 4.3

Tabella 4.3 – Analisi TGA dell'amilopectina.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
10,5	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	7,4
	300,4	313,2	

4.3.3 Propargil alcool

FT-IR cm^{-1} (figura 4.2): 3292 (v, $\equiv\text{C-H}$); 2927 (v, CH_3); 2872 (v, CH_2); 2119 (v, $\text{C}\equiv\text{C}$); 1702; 1420 (δ , CH_2); 1230; 1028 (v, C-O); 916; 671; 552.

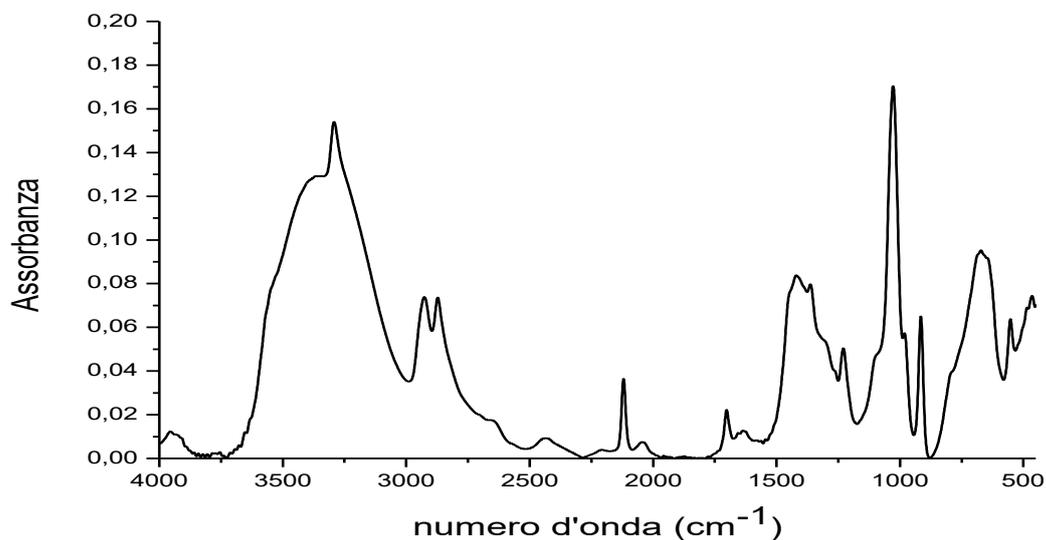


Figura 4.2 – Spettro FT-IR del propargil alcool su lamina di KBr.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1) δ ppm: 2,95 (s, 1H); 2,97 (s, 1H); 4,61 (t, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ 75:1) δ ppm: 48,81; 74,84; 84,04.

4.3.4 1',3'-diidro-3',3'-dimetil-1'-propargil-6-nitrospiro[2H-1-benzopirano-2,2'-(2H)-indolo] (SPCC)

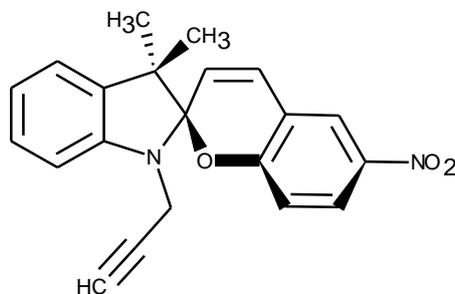


Figura 4.3 – Struttura di SPCC.

Il prodotto si presenta come una polvere rosa/viola la cui analisi spettroscopica ha fornito:

FT-IR cm^{-1} (figura 4.4): 3282 (ν , $\equiv\text{C-H}$); 3051 (ν , Ar-H); 2965 (ν , CH_3); 2927 (ν , CH_3); 2868 (ν , CH_2); 2116 (ν , $\text{C}\equiv\text{C}$); 1610 (ν , $\text{C}=\text{C}$); 1518 (ν , N-O); 1481 (δ , C-H alifatico); 730 (δ , C-H aromatico).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS, figura 4.5) δ ppm: 8.02 (dd, $^3\text{J}(\text{H}_4, \text{H}_3) = 9.88$ Hz, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_4, \text{H}_5) = 2.62$ Hz; H_4); 8.01 (d, $^3\text{J}(\text{H}_5, \text{H}_4) = 2.62$ Hz, 1H; H_5); 7.24 (dd, $^3\text{J}(\text{H}_{11}, \text{H}_{12}) = 7.86$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_{11}, \text{H}_{10}) = 7.45$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_{11}, \text{H}_9) = 1.21$ Hz, 1H; H_{11}); 7.12 (dd, $^3\text{J}(\text{H}_9, \text{H}_{10}) = 7.25$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_9, \text{H}_{11}) = 1.21$ Hz, 1H; H_9); 6.97 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_7, \text{H}_6) = 10.36$ Hz; H_7); 6.94 (dt, $^3\text{J}(\text{H}_{10}, \text{H}_{11}) = 7.46$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_{10}, \text{H}_9) = 7.25$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_{10}, \text{H}_{12}) < 1$ Hz, 1H; H_{10}); 6.65 (d, $^3\text{J}(\text{H}_3, \text{H}_4) = 9.88$ Hz, 1H; H_3); 5.89 (d, $^3\text{J}(\text{H}_6, \text{H}_7) = 10.36$ Hz, 1H; H_6); 4.06 (dd, $^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_2') = 18.0$, $^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_1) = 2.64$ Hz, 1H; H_2); 3.85 (dd, $^3\text{J}(\text{H}_2', \text{H}_2) = 18.0$, $^3\text{J}(\text{H}_2', \text{H}_1) = 2.44$ Hz, 1H; H_2'); 2.10 (dd, $^3\text{J}(\text{H}_1, \text{H}_2) = 2.64$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_1, \text{H}_2') = 2.44$ Hz, 1H; H_1); 1.31 (s, 3H; H_8); 1.20 (s, 3H; H_8').

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS, figura 4.6) δ ppm: 159,5; 145,9; 141,3; 136,2; 129,1; 128,0; 126,2; 123,0; 122,0; 121,2; 120,7; 118,5; 116,0; 108,3; 106,1; 79,9; 71,8; 52,8; 32,8; 26,2; 20,1.

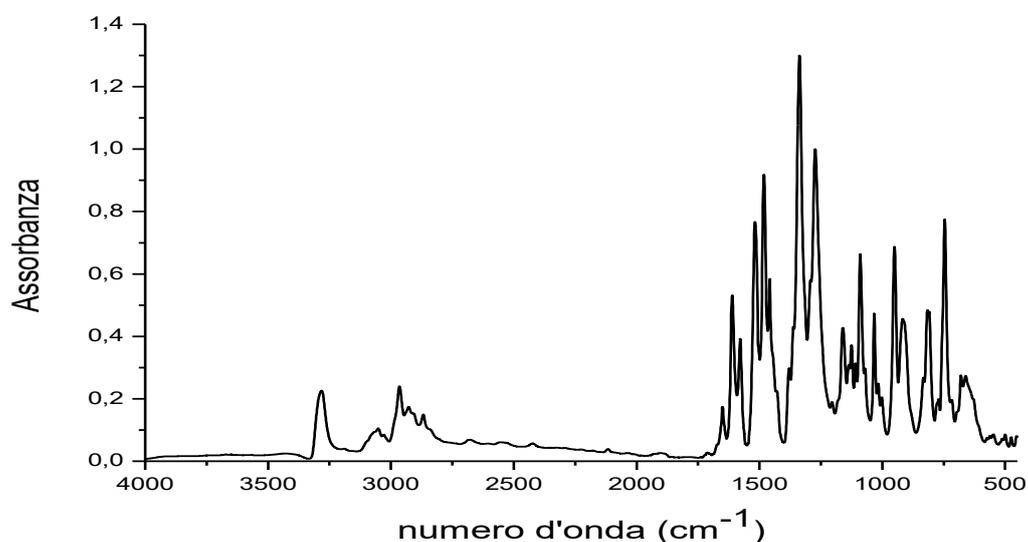


Figura 4.4 – Spettro FT-IR di SPCC su pasticca di KBr.

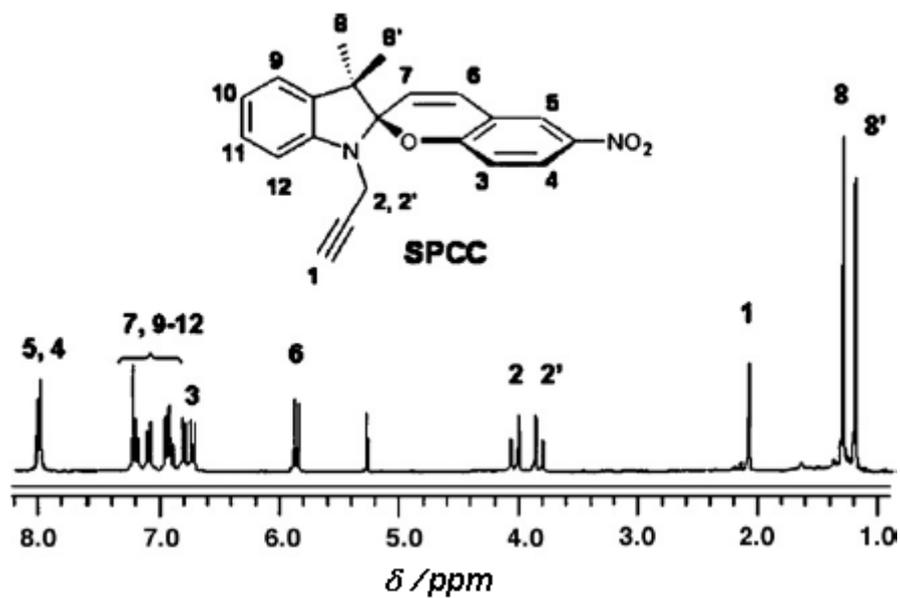


Figura 4.5 – Spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C, 20mM) di SPCC.

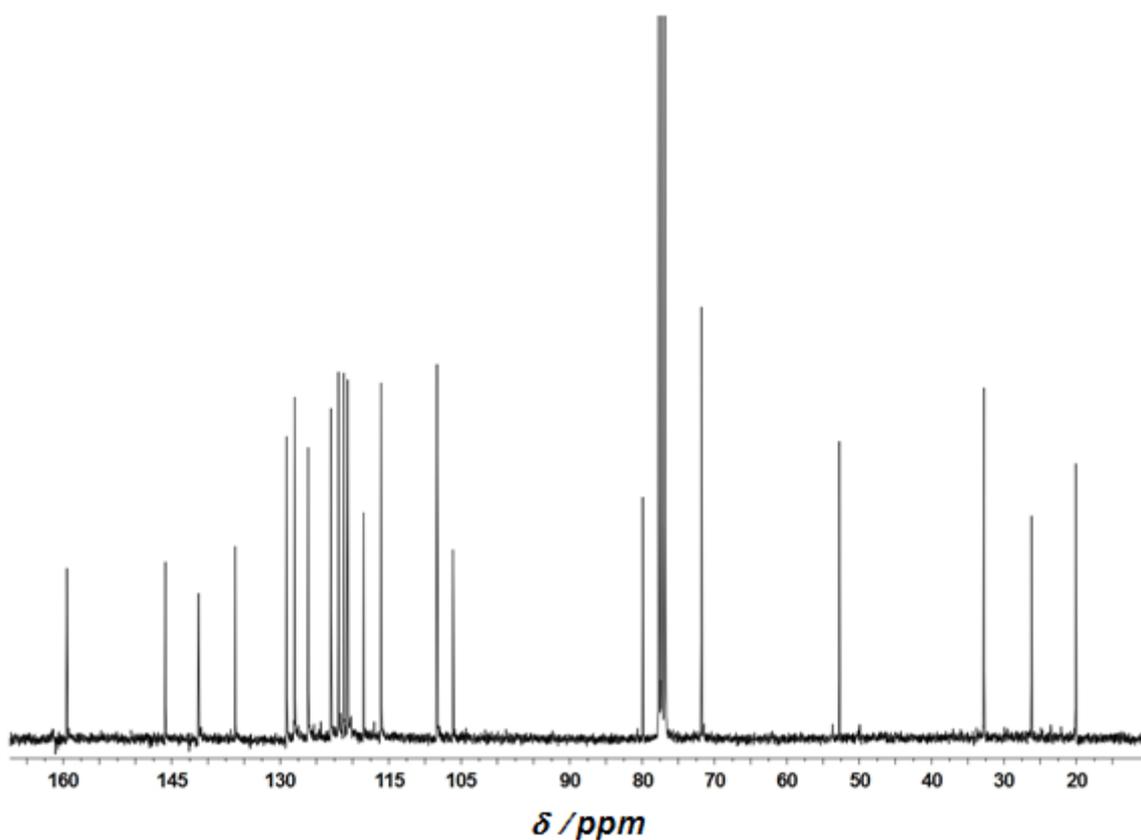


Figura 4.6 – Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C, 20mM) di SPCC.

4.4 AZIDAZIONE DELL'AMILOSIO

L'amilosio è stato lasciato per una notte sottovuoto alla pompa meccanica a 50°C e conservato in un luogo asciutto fino al suo utilizzo.

La reazione è condotta con riferimento alla procedura riportata da J. Shey¹⁵⁶ e collaboratori: 2,000 g di amilosio (12,3 mmol), sottoposti ad un processo di deareazione mediante tre cicli vuoto-azoto in un pallone a tre colli munito di agitatore magnetico, sono dispersi per 24 ore in 61,5 mL di DMF, a 50°C immergendo il pallone in un bagno ad olio e tenendolo in agitazione. Alla dispersione di amilosio sono aggiunti 7,995 g (123 mmol) di NaN₃, mantenendo costante il flusso di azoto durante l'aggiunta, ed il sistema è scaldato a 100°C per un'ora. Dopo aver lasciato raffreddare la miscela a temperatura ambiente, si è posto il pallone di reazione in un bagno di ghiaccio e sono stati aggiunti sotto flusso di azoto 6,445 g (24,6 mmol) di PPh₃. In parallelo a queste operazioni sono stati disciolti, in uno schlenk, 8,157 g (24,6 mmol) di CBr₄ in 4,5 mL di DMF, previa deareazione mediante tre cicli vuoto-azoto. La soluzione di CBr₄ è gocciolata nel sistema contenente l'amilosio in flusso di azoto. All'avvenuta colorazione di giallo il sistema è tolto dal bagno di ghiaccio e la reazione è condotta per 18 ore a temperatura ambiente in leggera sovrappressione di azoto. La reazione è spenta per aggiunta di 6 mL di metanolo, dopodiché la miscela di reazione è precipitata goccia a goccia in 660 mL di etanolo. Il precipitato è recuperato per filtrazione e lavato con una soluzione etanolo/acqua 7:3 v/v. Dopo il lavaggio il prodotto è ridisciolti in 40 mL di DMSO e riprecipitato in 400 mL di etanolo, filtrato e lavato con etanolo ed etere dietilico. Infine il solido è asciugato prima alla pompa ad acqua e poi alla pompa meccanica per 72 ore. La resa in amilosio azidato, definita dall'equazione (4.1), è risultata dell'82%.

$$Resa (\%) = \frac{g \text{ di amilosio azidato ottenuti}}{g \text{ di amilosio azidato teorici}} * 100 \quad (4.1)$$

La quantità teorica di amilosio azidato è definita come la massima quantità di polisaccaride azidato ottenibile dalla reazione, considerando un grado di sostituzione (DS) pari a 1. Per grado di sostituzione si intende il numero di unità idrossiliche modificate per unità glucosidica del polisaccaride.

Il peso dell'amilosio e dell'amilosio azidato ottenuto sono riferiti al campione secco, cioè avendo sottratto la percentuale di umidità presente, determinata tramite analisi TGA.

La caratterizzazione IR e l'analisi termogravimetrica dell'amilosio azidato hanno fornito:

ATR-IR cm^{-1} : 3335 (v, O–H); 2924 (v, CH_2); 2100 (v, N_3); 1639 (δ , acqua); 1351 (δ , CH_2); 1285; 1150 e 1077 (v, C–O anello glucosidico); 1006; 931; 843; 760.

TGA: Tabella 4.4

Tabella 4.4 – Analisi TGA dell'amilosio azidato.

Umidità (%)	Step 1		Step 2		Residuo (%)
	T_{onset} (°C)	$T_{\text{inflection}}$ (°C)	T_{onset} (°C)	$T_{\text{inflection}}$ (°C)	
4,3	210,7	234,0	276,6	291,0	24,4

4.5 AZIDAZIONE DELL'AMILOPECTINA

La reazione di azidazione dell'amilopeptina è stata condotta secondo una procedura analoga alla precedente, utilizzando le seguenti quantità: 2,000 g di amilopeptina (12,3 mmol), 66 mL di DMF, 7,995 g (123 mmol) di NaN_3 , 6,445 g (24,6 mmol) di PPh_3 , 8,157 g (24,6 mmol) di CBr_4 . Le operazioni di purificazione sono analoghe a quelle utilizzate per l'amilosio anche nelle quantità di solvente utilizzate.

La resa in prodotto azidato, calcolata secondo l'equazione (4.1), definita precedentemente, è stata pari all'80,0%.

La caratterizzazione IR e l'analisi termogravimetrica dell'amilopeptina azidata hanno fornito:

ATR-IR cm^{-1} : 3335 (v, O–H); 2924 (v, CH_2); 2100 (v, N_3); 1639 (δ , acqua); 1351 (δ , CH_2); 1285; 1150 e 1077 (v, C–O anello glucosidico); 1006; 931; 843; 760.

TGA: Tabella 4.5

Tabella 4.5 – Analisi TGA dell'amilopeptina azidata.

Umidità (%)	Step 1		Step 2		Residuo (%)
	T_{onset} (°C)	$T_{\text{inflection}}$ (°C)	T_{onset} (°C)	$T_{\text{inflection}}$ (°C)	
8,3	229,4	241,3	266,3	273,1	25,3

4.6 MODIFICA DELL'AMILOSIO CON SPIROPIRANO E/O PROPARGIL ALCOOL

4.6.1 100% SPCC (ASP₁₀₀)

La reazione è condotta osservando la procedura descritta da M. Bertoldo, S. Nazzi, G. Zampano e F. Ciardelli⁶⁴.

La miscela di alimentazione è scelta considerando di modificare tutte le unità glucosidiche del polimero. In un pallone a tre colli munito di agitatore magnetico sono stati introdotti 0,4024 g (2,15 mmol) di amilosio azidato, sottoposti a tre cicli vuoto-azoto e sciolti in 10 mL di DMSO distillato per una notte a temperatura ambiente, mantenendo il sistema in agitazione e in atmosfera di azoto. Alla soluzione sono aggiunti, sotto flusso di azoto, 0,7404 g (2,14 mmol) di SPCC e parallelamente sono dispersi in uno schlenk 0,1063 g (1,074 mmol) di CuCl e 0,1854 g (1,07 mmol) di pentametildietilentriammina (PMDETA), previa deareazione, in 3 mL di DMSO. Dopo 15 minuti si sono unite le due soluzioni, mantenendo costante un flusso di azoto, quindi sono aggiunti 200 µL di una soluzione acquosa 3 M di ascorbato di sodio. Il sistema è portato a 40°C immergendolo in un bagno ad olio, e lasciato reagire per 24 ore in atmosfera inerte.

Il decorso della reazione è seguito mediante indagini cromatografiche TLC, utilizzando cloroformio come eluente. Dalle osservazioni TLC è visibile come la macchia rossa presente nella lastrina relativa al tempo iniziale ($R_f = 0,88$), ottenuta seminando una goccia della miscela di reazione diluita in 3 gocce di cloroformio, riconducibile alla molecola di spiropirano, scompare nella lastrina seminata dopo 24 ore di reazione, con il sistema che rimane al punto di semina mostrando un colore viola molto intenso, ad indicazione del completamento della reazione.

Il sistema è stato precipitato goccia a goccia in 130 mL di etanolo, recuperato per filtrazione e quindi ridisciolti in 45 mL di DMSO. Dopodiché è riprecipitato in etanolo (450 mL), recuperato per filtrazione, disperso in 200 mL di acqua deionizzata e dializzato (MWCO 1 kDa) per 2 giorni contro una soluzione 0,2 M di EDTA e per 7 giorni contro acqua deionizzata, infine liofilizzato.

La resa, valutata a seguito della liofilizzazione, è stata dell'80,0%, calcolata secondo l'equazione (4.2).

$$\text{Resa (\%)} = \frac{g \text{ di } ASP_{100}}{g \text{ di amilosio azidato alimentati} + g \text{ di SPCC alimentati}} * 100 \quad (4.2)$$

Il peso di ASP_{100} ottenuto e dell'amilosio azidato alimentato sono riferiti al campione secco, cioè avendo sottratto la percentuale di umidità presente, determinata tramite analisi termogravimetrica.

FT-IR cm^{-1} : 3423 (ν , O–H); 2927 (ν , CH_3); 1608 (ν , C=C); 1516 (ν , N–O); 1483 (δ , C–H alifatico); 1459 (δ , CH_2); 1338 (δ , CH_2); 1266; 1155 e 1090 (ν , C–O anello glucosidico); 1035; 949; 915; 810; 748 (δ , C–H aromatico).

TGA: Tabella 4.6

Tabella 4.6 – Analisi TGA di ASP_{100} .

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
3,9	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{\text{inflection}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	42,0
	259,8	284,4	

4.6.2 40% SPCC e 60% Propargil Alcool (ASP_{40})

La reazione di click è stata condotta secondo una procedura analoga a quella descritta nel paragrafo precedente, avendo però come obiettivo un polimero che avesse un grado di funzionalizzazione in spiropirano del 40% rispetto alle unità glucosidiche; per la modifica del restante 60% di unità azidate abbiamo scelto il propargil alcool in modo da ripristinare la funzionalità idrossilica sulla catena ed evitare eventuali successivi processi degradativi della funzionalità azidica.

Le quantità utilizzate sono state le seguenti: 0,391 g (2,089 mmol) di amilosio azidato, 0,281 g (0,812 mmol) di SPCC, 71 μL (1,218 mmol) di propargil alcool, 0,101 g (1,015 mmol) di CuCl , 0,177 g (1,019 mmol) di PMDETA, 13 mL di DMSO distillato e 400 μL di soluzione 3 M di ascorbato di sodio.

La resa in prodotto recuperato, calcolata secondo l'equazione (4.3), è risultata dell'83,1%.

$$\text{Resa (\%)} = \frac{g \text{ di } ASP_{40}}{g \text{ di amilosio azidato} + g \text{ di SPCC} + g \text{ di Propargil Alcol}} * 100 \quad (4.3)$$

Il peso di ASP₄₀ ottenuto e dell'amilosio azidato alimentato sono riferiti al campione secco, cioè avendo sottratto la percentuale di umidità presente, determinata tramite analisi termogravimetrica.

FT-IR cm⁻¹: 3390 (v, O–H); 2922 (v, CH₃); 1612 (v, C=C); 1516 (v, N–O); 1483 (δ, C–H alifatico); 1459 (δ, CH₂); 1405; 1338 (δ, CH₂); 1271; 1227; 1153 e 1079 (v, C–O anello glucosidico); 1041; 950; 920; 751 (δ, C–H aromatico).

TGA: Tabella 4.7

Tabella 4.7 – Analisi TGA di ASP₄₀.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	
6,5	240,8	267,8	31,3

4.6.3 100% Propargil Alcool (APA₁₀₀)

La reazione di click è stata condotta secondo una procedura analoga alle precedenti, utilizzando le seguenti quantità: 0,340 g (1,817 mmol) di amilosio azidato, 127 µL (2,184 mmol) di propargil alcool, 0,090 g (0,909 mmol) di CuCl, 0,158 g (0,91 mmol) di PMDETA, 25 mL di DMSO distillato e 400 µL di soluzione 3 M di ascorbato di sodio.

La resa in prodotto recuperato, calcolata a seguito della liofilizzazione è stata del 66,6%, in base all'equazione (4.4).

$$Resa (\%) = \frac{g \text{ di } APA_{100}}{g \text{ di amilosio azidato} + g \text{ di Propargil Alcol}} * 100 \quad (4.4)$$

Il peso di APA₁₀₀ ottenuto e dell'amilosio azidato alimentato sono riferiti al campione secco, cioè avendo sottratto la percentuale di umidità presente, determinata tramite analisi termogravimetrica.

FT-IR cm⁻¹: 3435 (v, O–H); 2926 (v, CH₃); 1634 (v, C=C); 1409; 1232; 1155; 1143; 791; 763.

TGA: Tabella 4.8

Tabella 4.8 – Analisi TGA di APA₁₀₀.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	
5,1	243,8	278,6	28,8

4.7 MODIFICA DELL'AMILOPECTINA CON SPIROPIRANO E/O PROPARGIL ALCOOL

4.7.1 100% SPCC (APSP₁₀₀)

La reazione di click è stata condotta secondo una procedura analoga alle precedenti, utilizzando le seguenti quantità: 0,402 g (2,15 mmol) di amilopectina azidata, 18 mL di DMSO distillato, 0,740 g (2,139 mmol) di SPCC, 0,106 g (1,07 mmol) di CuCl, 0,186 g (1,072 mmol) di PMDETA, 200 µL di una soluzione 3 M di ascorbato di sodio.

Le operazioni di purificazione sono identiche a quelle utilizzate per l'amilosio anche nelle quantità di solvente utilizzate.

La resa, valutata a seguito della liofilizzazione, e calcolata mediante l'equazione (4.2), è stata del 70,9%.

FT-IR cm⁻¹: 3423 (v, O-H); 2927 (v, CH₃); 1608 (v, C=C); 1516 (v, N-O); 1483 (δ, C-H alifatico); 1459 (δ, CH₂); 1338 (δ, CH₂); 1266; 1155 e 1090 (v, C-O anello glucosidico); 1035; 949; 915; 808; 748 (δ, C-H aromatico).

TGA: Tabella 4.9

Tabella 4.9 – Analisi TGA di APSP₁₀₀.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
4,5	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	35,6
	252,6	287,9	

4.7.2 40% SPCC e 60% Propargil Alcool (APSP₄₀)

La reazione di click è stata condotta secondo una procedura analoga alle precedenti, utilizzando le seguenti quantità: 0,401 g (2,14 mmol) di amilopectina azidata, 0,287 g (0,814 mmol) di SPCC, 71 µL (1,218 mmol) di propargil alcool, 0,101 g (1,019 mmol) di CuCl, 0,176 g (1,015 mmol) di PMDETA, 18 mL di DMSO distillato e 400 µL di soluzione 3 M di ascorbato di sodio.

La resa in prodotto recuperato, valutata a seguito della liofilizzazione, e calcolata usando l'equazione (4.3), è stata del 72,2%.

FT-IR cm^{-1} : 3390 (v, O–H); 2922 (v, CH_3); 1612 (v, C=C); 1516 (v, N–O); 1483 (δ , C–H alifatico); 1459 (δ , CH_2); 1405; 1338 (δ , CH_2); 1271; 1229; 1153 e 1079 (v, C–O anello glucosidico); 1041; 950; 920; 752 (δ , C–H aromatico).

TGA: Tabella 4.10

Tabella 4.10 – Analisi TGA di APSP₄₀.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
7,1	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	26,4
	263,7	296,4	

4.7.3 100% Propargil Alcool (APPA₁₀₀)

La reazione di click è stata condotta secondo una procedura analoga alle precedenti, utilizzando le seguenti quantità: 0,341 g (1,821 mmol) di amilopectina azidata, 127 μL (2,184 mmol) di propargil alcool, 0,090 g (0,91 mmol) di CuCl, 0,158 g (0,91 mmol) di PMDETA, 25 mL di DMSO distillato e 400 μL di soluzione 3 M di ascorbato di sodio.

La resa in prodotto recuperato, calcolata a seguito della liofilizzazione, utilizzando l'equazione (4.4), è stata del 76,6%.

FT-IR cm^{-1} : 3435 (v, O–H); 2926 (v, CH_3); 1634 (v, C=C); 1409; 1232; 1155; 1143; 920; 791; 763.

TGA: Tabella 4.11

Tabella 4.11 – Analisi TGA di APPA₁₀₀.

Umidità (%)	Step 1		Residuo (%)
6,6	T _{onset} (°C)	T _{inflection} (°C)	28,6
	271,9	292,3	

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Hecker, W. Schumann, U. Völker, *Mol. Microbiol.*, **1996**, *19*, 417-428.
- [2] M. Stevens, S. Merilaita, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **2009**, *364*, 423-427.
- [3] J. Aizenberg, A. Tkachenko, S. Weiner, L. Addadi, G. Hendler, *Nature*, **2001**, *412*, 819-822.
- [4] M. Fialkowski, K. J. M. Bishop, R. Klajn, S. K. Smoukov, C. J. Campbell, B. A. Grzybowski, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 2482-2496.
- [5] A. Grinthal, J. Aizenberg, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 7072-7085.
- [6] M.-M. Russew, S. Hecht, *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 3348-3360.
- [7] R. Klajn, J. F. Stoddart, B. A. Grzybowski, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2203-2237.
- [8] S. Das, P. Ranjan, P. S. Maiti, G. Singh, G. Leitius, R. Klajn, *Adv. Mater.*, **2013**, *25*, 422-426.
- [9] M. Irie, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1685-1716.
- [10] R. Klajn, K. J. M. Bishop, B. A. Grzybowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, *104*, 10305-10309.
- [11] R. Klajn, K. P. Browne, S. Soh, B. A. Grzybowski, *Small*, **2010**, *6*, 1385-1387.
- [12] G. H. Brown, *Techniques of chemistry Vol. 3, Photochromism*, Wiley-Interscience, **1971**, 853.
- [13] Y. Chen, C. M. Wang, M. G. Fan, B. L. Yao, N. Menke, *Opt. Mater.*, **2004**, *26*, 75-77.
- [14] B. Heinz, S. Malkmus, S. Laimgruber, S. Dietrich, C. Schulz, K. Rueck-Braun, M. Braun, W. Zinth, P. Gilch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8577-8584.
- [15] H. Du, S. Gao, L. Yang, *Intern. J. of Org. Chem.*, **2012**, *2*, 387-390.
- [16] M.-H. Kim, M. Saleem, J.-S. Seo, C.-S. Choi, K. H. Lee, *Spectrochim. Acta A*, **2015**, *136*, 1291-1297.
- [17] V. I. Minkin, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 2751-2776.
- [18] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1741-1753.
- [19] L. Florea, D. Diamond, F. Benito-Lopez, *Macromol. Mater. Eng.*, **2012**, *297*, 1148-1159.
- [20] R. Rosario, D. Gust, M. Hayes, J. Springer, A. A. Garcia, *Langmuir*, **2003**, *19*, 8801-8806.
- [21] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1809-1825.
- [22] J. Henzl, M. Mehlhorn, H. Gawronski, K. H. Rieder, K. Morgenstern, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, *45*, 603-606.
- [23] W. Fuss, C. Kosmidis, W. E. Schmid, S. A. Trushin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4178-4182.
- [24] J. Zhang, J. K. Whitesell, M. A. Fox, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 2323-2331.
- [25] Y.-C. Jeong, D. G. Park, I. S. Lee, S. I. Yang, K.-H. Ahn, *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 97-103.
- [26] G. Baillet, G. Giusti, R. Guglielmetti, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1993**, *70*, 157-161.
- [27] G. Baillet, M. Campredon, R. Guglielmetti, G. Giusti, C. Aubert, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1994**, *83*, 147-151.

-
- [28] Y. Sheng, J. Leszczynski, A. A. Garcia, R. Rosario, D. Gust, J. Springer, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 16233-16243.
- [29] G. Zhai, S. Shao, S. Wu, Y. Lei, Y. Dou, *Int. J. Photoenergy*, **2014**, *2014*, 1-9.
- [30] H. Gorner, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, *3*, 416-423.
- [31] S. A. Krysanov, M. V. Alfimov, *Chem. Phys. Lett.*, **1982**, *91*, 77-80.
- [32] Z. Y. Tian, W. W. Wu, W. Wan, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 16092-16100.
- [33] J. T. C. Wojtyk, A. Wasey, P. M. Kazmaier, S. Hoz, E. Buncel, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 9046-9055.
- [34] X. Q. Song, J. W. Zhou, Y. T. Li, Y. W. Tang, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1995**, *92*, 99-103.
- [35] Rumaisanordin, Sitiaishahhasbullah, A. M. Lazim, *J. Adv. Sci. Res.*, **2014**, *5*, 01-06.
- [36] J. W. Zhou, Y. T. Li, Y. W. Tang, F. Q. Zhao, X. Q. Song and E. C. Li, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1995**, *90*, 117-123.
- [37] L. Florea, A. Hennart, D. Diamond, F. Benito-Lopez, *Sens. Actuators B*, **2012**, *175*, 92-99.
- [38] L. Florea, A. McKeon, D. Diamond, F. Benito-Lopez, *Langmuir*, **2013**, *29*, 2790-2797.
- [39] Q. Shen, Y. Cao, S. Liu, M. L. Steigerwald, X. Guo, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 10807-10812.
- [40] M. Levitus, G. Glasser, D. Neher, P. F. Aramendia, *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, *277*, 118-124.
- [41] M. Bletz, U. Pfeifer-Fukumura, U. Kolb, W. Baumann, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *106*, 2232-2236.
- [42] J. Chen, F. Zeng, S. Z. Wu, *ChemPhysChem*, **2010**, *11*, 1036-1043.
- [43] J. T. C. Wojtyk, A. Wasey, N. N. Xiao, P. M. Kazmaier, S. Hoz, C. Yu, R. P. Lemieux, E. Buncel, *J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 2511-2516.
- [44] R. Rosario, D. Gust, M. Hayes, F. Jahnke, J. Springer, A. A. Garcia, *Langmuir*, **2002**, *18*, 8062-8069.
- [45] K. Wagner, R. Byrne, M. Zanoni, S. Gambhir, L. Dennany, R. Breukers, M. Higgins, P. Wagner, D. Diamond, G. G. Wallace, D. L. Officer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 5453-5462.
- [46] C. Lenoble, R. S. Becker, *J. Phys. Chem.*, **1986**, *90*, 62-65.
- [47] D. A. Davis, A. Hamilton, J. Yang, L. D. Cremer, D. Van Gough, S. L. Potisek, M. T. Ong, P. V. Braun, T. J. Martinez, S. R. White, J. S. Moore, N. R. Sottos, *Nature*, **2009**, *459*, 68-72.
- [48] C. P. McCoy, L. Donnelly, D. S. Jones, S. P. Gorman, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 657-661.
- [49] T. Seki, K. Ichimura, E. Ando, *Langmuir*, **1988**, *4*, 1068-1069.
- [50] H. Tachibana, Y. Yamanaka, H. Sakai, M. Abe, M. Matsumoto, *J. Lumin.*, **2000**, 87-89, 800-802.
- [51] E. Goldburt, F. Shvartsman, S. Fishman, V. Krongauz, *Macromol.*, **1984**, *17*, 1225-1230.
- [52] H. Tomioka, T. Itoh, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 532-533.
- [53] Y. Wu, C. L. Zhang, X. Z. Qu, Z. P. Liu, Z. Z. Yang, *Langmuir*, **2010**, *26*, 9442-9448.
- [54] T. Seki, K. Ichimura, *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 3769-3775.

-
- [55] H. Eckhardt, A. Bose, V. A. Krongauz, *Polymer*, **1987**, 28, 1959-1964.
- [56] I. Oehme, S. Prattes, O. S. Wolfbeis, G. J. Mohr, *Talanta*, **1998**, 47, 595-604.
- [57] M. Q. Zhu, G. F. Zhang, C. Li, M. P. Aldred, E. Chang, R. A. Drezek, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 365-372.
- [58] Y.-H. Chan, M. E. Gallina, X. Zhang, I. C. Wu, Y. Jin, W. Sun, D. T. Chiu, *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 9431-9438.
- [59] M. Irie, T. Iwayanagi, Y. Taniguchi, *Macromolecules*, **1985**, 18, 2418-2422.
- [60] G. Baillet, G. Giusti, R. Guglielmetti, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1993**, 70, 157-161.
- [61] C. Q. Huang, Y. Wang, C. Y. Hong, C. Y. Pan, *Macromol. Rapid Commun.*, **2011**, 32, 1174-1179.
- [62] M. Irie, A. Menju, K. Hayashi, *Macromolecules*, **1979**, 12, 1176-1180.
- [63] R. Adelman, P. Mela, M. O. Gallyamov, H. Keul, M. Moller, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2009**, 47, 1274-1283.
- [64] M. Bertoldo, S. Nazzi, G. Zampano, F. Ciardelli, *Carbohydr. Polym.*, **2011**, 85, 401-407.
- [65] J. Labsky, J. Kalal, F. Mikes, *Polym. Photochem.*, **1982**, 2, 289-295.
- [66] D. S. Achilleos, M. Vamvakaki, *Macromolecules*, **2010**, 43, 7073-7081.
- [67] Y. Imai, K. Adachi, K. Naka, Y. Chujo, *Polym. Bull.*, **2000**, 44, 9-15.
- [68] L. Florea, A. McKeon, D. Diamond, F. Benito-Lopez, *Langmuir*, **2013**, 29, 2790-2797.
- [69] L. Florea, A. Hennart, D. Diamond, F. Benito-Lopez, *Sensors Actuat. B-Chem.*, **2012**, 175, 92-99.
- [70] J. Yan, L.-X. Zhao, C. Li, Z. Hu, G.-F. Zhang, Z.-Q. Chen, T. Chen, Z.-L. Huang, J. Zhu, M.-Q. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 2436-2439.
- [71] M.-Q. Zhu, G.-F. Zhang, Z. Hu, M. P. Aldred, C. Li, W.-L. Gong, T. Chen, Z.-L. Huang, S. Liu, *Macromolecules*, **2014**, 47, 1543-1552.
- [72] B. Liao, W. Wang, P. Long, X. Deng, B. He, Q. Liu, S. Yi, *Carbon*, **2015**, 91, 30-37.
- [73] W. Wan, M.-Q. Zhu, Z. Tian, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 4312-4315.
- [74] M.-Q. Zhu, L. Zhu, J. J. Han, W. Wu, J. K. Hurst, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4303-4309.
- [75] T. Wu, G. Zou, J. Hu, S. Liu, *Chem. Mater.* **2009**, 21, 3788-3798.
- [76] C. Li, Y. Zhang, J. Hu, J. Cheng, S. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 5120-5124.
- [77] T. Hirakura, Y. Nomura, Y. Aoyama, K. Akiyoshi, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1804-1809.
- [78] Z. Tian, A. D. Q. Li, *Accounts of Chemical Research*, **2013**, 46, 269-279.
- [79] J. Chen, W. Zhong, Y. Tang, Z. Wu, Y. Li, P. Yi, J. Jiang, *Macromolecules*, **2015**, 48, 3500-3508.
- [80] G. Wen, J. Yan, Y. Zhou, D. Zhang, L. Mao, D. Zhu, *Chem. Commun.*, **2006**, 3016-3018.
- [81] T. Suzuki, Y. Hirahara, K. Bunya, H. Shinozaki, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 2773-2779.
- [82] T. Suzuki, T. Kato, H. Shinozaki, *Chem. Commun.*, **2004**, 2036-2037.

-
- [83] S. Chen, H. Liu, H. Cui, J. Hu, H. Cai, *Des. Monomers Polym.*, **2015**, *18*, 574-582.
- [84] H. Cui, H. Liu, S. Chen, R. Wang, *Dyes Pigments*, **2015**, *115*, 50-57.
- [85] R. J. Byrne, S. E. Stitzel, D. Diamond, *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 1332-1337.
- [86] K. H. Fries, G. R. Sheppard, J. A. Bilbrey, J. Locklin, *Polym. Chem.*, **2014**, *5*, 2094-2102.
- [87] K. H. Fries, J. D. Driskell, S. Samanta, J. Locklin, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 3306-3314.
- [88] K. H. Fries, S. Samanta, S. Orski, J. Locklin, *Chem. Commun.*, **2008**, 6288-6290.
- [89] A. Radu, R. Byrne, N. Alhashimy, M. Fusaro, S. Scarmagnani, D. Diamond, *J. Photoch. Photobio. A*, **2009**, *206*, 109-115.
- [90] R. Rosario, D. Gust, M. Hayes, F. Jahnke, J. Springer, A. A. Garcia, *Langmuir*, **2002**, *18*, 8062-8069.
- [91] S. Samanta, J. Locklin, *Langmuir*, **2008**, *24*, 9558-9565.
- [92] Y.-N. Zhou, J.-J. Li, Q. Zhang, Z.-H. Luo, *Langmuir*, **2014**, *30*, 12236-12242.
- [93] S. Sugiura, K. Sumaru, K. Ohi, K. Hiroki, T. Takagi, T. Kanamori, *Sensors Actuat. A-Phys.*, **2007**, *140*, 176-184.
- [94] S. Sugiura, A. Szilágyi, K. Sumaru, K. Hattori, T. Takagi, G. Filipcsei, M. Zrinyi, T. Kanamori, *Lab Chip*, **2009**, *9*, 196-198.
- [95] K. Sumaru, K. Ohi, T. Takagi, T. Kanamori, T. Shinbo, *Langmuir*, **2006**, *22*, 4353-4356.
- [96] F. Ciardelli, D. Fabbri, O. Pieroni, A. Fissi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3470-3472.
- [97] A. Fissi, O. Pieroni, F. Ciardelli, D. Fabbri, G. Ruggeri, K. Umezawa, *Biopolymers*, **1993**, *33*, 1505-1517.
- [98] O. Pieroni, A. Fissi, A. Viegi, D. Fabbri, F. Ciardelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 2734-2736.
- [99] T. M. Cooper, M. O. Stone, L. V. Natarajan, R. L. Crane, *Photochem. Photobiol.*, **1995**, *62*, 258-262.
- [100] K. Namba, S. Suzuki, *Chem. Lett.*, **1975**, 947-950.
- [101] M. Aizawa, K. Namba, S. Suzuki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1977**, *180*, 41-48.
- [102] M. Aizawa, K. Namba, S. Suzuki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1977**, *182*, 305-310.
- [103] I. Karube, Y. Ishimori, S. Suzuki, T. Sato, *Biotechnol. Bioeng.*, **1978**, *20*, 1775-1783.
- [104] I. Karube, S. Suzuki, Y. Nakamoto, M. Nishida, *J. Mol. Catal.*, **1979**, *6*, 51-56.
- [105] H. Wondraczek, A. Kotiaho, P. Fardim, T. Heinze, *Carbohydr. Polym.*, **2011**, *83*, 1048-1061.
- [106] J. Edahiro, K. Sumaru, T. Takagi, T. Shinbo, T. Kanamori, *Langmuir*, **2006**, *22*, 5224-5226.
- [107] K. Arai, Y. Shitara, T. Ohyama, *J. Mater. Chem.*, **1996**, *6*, 11-14.
- [108] M.-H. Lee, X. Li, E. Kim, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **2000**, *350*, 51-54.
- [109] W. Tian, J. Tian, *Langmuir*, **2014**, *30*, 3223-3227.
- [110] European Polysaccharide Network Of Excellence. (<http://www.epnoe.eu>).
- [111] R. E. Kirk, F. Othmer, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley and Sons, **1997**, quarta edizione.

-
- [112] R. H. Marchessault, *Chem. Tech.*, **1984**, 542-552.
- [113] B. Casu, *Macromolecole: Scienza e Tecnologia Volume II, Sezione VI: Biopolimeri*, Edizioni Nuova Cultura, **2009**, prima edizione.
- [114] D. A. Brant, *Carbohydr. Polym.*, **1982**, 2, 232-237.
- [115] Belgacem M. N., Gandini A., Eds., *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier: Amsterdam, **2008**.
- [116] I. C. M. Dea, *Pure & Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1315-1322.
- [117] G. Crini, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, 30, 38-70.
- [118] J. K. Baird, P. A. Sandford, I. W. Cottrell, *Nat. Biotechnol.*, **1983**, 1, 778-783.
- [119] M. Rinaudo *Polym. Int.* **2008**, 57, 397-430.
- [120] L. Yang, L.-M. Zhang, *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 76, 349-361.
- [121] L. Zhang, J. Lin, S. Lin, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 351-357.
- [122] M. M. Green, G. Blankenhorn, H. Hart, *J. Chem. Educ.*, **1975**, 52, 729-730.
- [123] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 40, 11, **2001**, 2004-2021.
- [124] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.
- [125] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.
- [126] W. G. Lewis, F.G. Malagon, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 9152-9153.
- [127] P. L. Golas, N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **2006**, 39, 6451-6457.
- [128] Y. Angell, K. Burgess, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 3649-3651.
- [129] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y. H. Lim, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 12696-12704.
- [130] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 14570-14576.
- [131] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 9879-9883.
- [132] J. Geng, J. Lindqvist, G. Mantovani, D. M. Haddleton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 4180-4183.
- [133] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 1302-1315.
- [134] T. Hasegawa, M. Umeda, M. Numata, T. Fujisawa, S. Haraguchi, K. Sakurai, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **2006**, 35, 82-83.
- [135] T. Hasegawa, M. Umeda, M. Numata, C. Li, A. H. Bae, T. Fujisawa, S. Haraguchi, K. Sakurab, S. Shinkai, *Carbohydr. Res.*, **2006**, 341, 35-40.
- [136] T. Liebert, C. Hänsch, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.*, **2006**, 27, 208-213.
- [137] M. Pohl, J. Schaller, F. Meister, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, 29, 142-148.
- [138] R. Kabiri, H. Namazi, *J. Nanopart. Res.*, **2014**, 16, 1-13.

-
- [139] M. Tizzotti, M.-P. Labeau, T. Hamaide, E. Drockenmuller, A. Charlot, E. Fleury, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2010**, *48*, 2733-2742.
- [140] C. Di Meo L. Panza, F. Campo, D. Capitani, L. Mannina, A. Banzato, M. Rondina, A. Rosato, V. Crescenzi, *Macromol. Biosci.*, **2008**, *8*, 670-681.
- [141] X. Hu, D. Li, F. Zhou, C. Gao, *Acta Biomater.*, **2011**, *7*, 1618-1626.
- [142] G. Zampano, M. Bertoldo, F. Ciardelli, *Reactive & functional Polymers*, **2010**, *70*, 272-281.
- [143] A. Sarwar, H. Katas, S. N. Samsudin, N. M. Zin, *PLoS ONE*, **2015**, *10*, 1-22.
- [144] M. Montiel-Herrera, A. Gandini, F. M. Goycoolea, N. E. Jacobsen, J. Lizardi-Mendoza, M. T. Recillas-Mota, W. M. Argüelles-Monal, *Iran. Polym. J.*, **2015**, *24*, 349-357.
- [145] P. Tirino, R. Laurino, G. Maglio, M. Malinconico, G. Gomez d'Ayala, P. Laurienzo, *Carbohydr. Polym.*, **2014**, *112*, 736-745.
- [146] B. G. De-Geest, W. Van Camp, F. E. Du-Prez, S. C. D. Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Chem. Commun.*, **2008**, 190-192.
- [147] M. Laville J. Babin, I. Londono, M. Legros, C. Nouvel, A. Durand, R. Vanderesse, M. Leonard, J.-L. Six, *Carbohydr. Polym.*, **2013**, *93*, 537-546.
- [148] P. F. Tankam, R. Müller, P. Mischnick, H. Hopf, *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 2049-2060.
- [149] C. Xiao, D. Lu, S. Xu, L. Huang, *Starch/Stärke*, **2011**, *63*, 209-216.
- [150] A. Uliniuc, M. Popa, E. Drockenmuller, F. Boisson, D. Leonard, T. Hamaide, *Carbohydr. Polym.*, **2013**, *96*, 259-269.
- [151] K. Mai, J. Lin, B. Zhuang, X. Li, L.-M. Zhang, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *79*, 209-216.
- [152] J.-D. Pang, B.-X.-Zhuang, K. Mai, R.-F. Chen, J. Wang, L.-M. Zhang, *Mater. Sci. Eng.*, **2015**, *49*, 485-492.
- [153] S. Borsacchi, L. Calucci, M. Geppi, F. La Terra, C. Pinzino, M. Bertoldo, *Carbohydr. Polym.*, **2014**, *112*, 245-254.
- [154] A. Basu, K. R. Kunduru, E. Abteu, A. J. Domb, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 1396-1412.
- [155] H. Falk, M. Stanek, *Monatshefte für Chemie*, **1997**, *128*, 777-784.
- [156] *Starch: Chemistry and Technology*, ed. J. BeMiller, R., **2009**, terza edizione.
- [157] S. K. Rath, R. P. Singh, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, *70*, 1795-1810.
- [158] D. Stawski, *Food Chem.*, **2008**, *110*, 777-781.
- [159] Y.-N. Zhang, J.-Y. Cui, S.-A. Xu, *Starch/Stärke*, **2015**, *67*, 1-9.
- [160] J. Shey, K. M. Holtman, R. Y. Wong, K. S. Gregorski, A. P. Klamczynski, W. J. Orts, G. M. Glenn, S. H. Imam, *Carbohydr. Polym.*, **2006**, *65*, 529-534.
- [161] D. K. Wang, F. Rasoul, D. J. T. Hill, G. R. Hanson, C. J. Noble, A. K. Whittaker, *Soft Matter*, **2012**, *8*, 435-445.
- [162] C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.*, **2008**, *25*, 2216-2230.
- [163] E. Lallana, E. Fernandez-Megia, R. Riguera, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 5748-5750.
- [164] M. Natali, S. Giordani, *Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 1162-1171.

- [165] R. Klajn, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 148-184.
- [166] C. Schomburg, M. Wark, Y. Rohlfing, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, *J. Mater. Chem.*, **2001**, *11*, 2014-2021.
- [167] T. Satoh, K. Sumaru, T. Takagi, K. Takai T. Kanamori, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 7322-7329.
- [168] S. Nakatsuji, Y. Ogawa, S. Takeuchi, H. Akutsu, J. Yamada, A. Naito, K. Sudo, N. Yasuoka, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1969-1975.
- [169] I. Casades, M. Álvaro, H. García, M. N. Pillai, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 219-223.