



Sede Amministrativa

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari

Indirizzo: Scienze Chimiche

Ciclo XXVI

Dynamic Covalent Capture
per lo studio di interazioni non covalenti

Coordinatore: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Maria Scrimin

Dottoranda: Marta Dal Molin

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1	Interazioni non covalenti deboli	1
1.2	Ruolo delle interazioni non covalenti nei sistemi biologici	3
1.3	Interazioni non covalenti in sistemi sintetici: Chimica Supramolecolare	7
1.3.1	Molecular tweezers e clips	8
1.3.2	Capsule Molecolari	9
1.4	Misura di interazioni non covalenti	11
1.4.1	Double Mutant Cycle, aspetti teorici	11
1.4.2	Double Mutant Cycles, aspetti pratici	13
1.5	Scopo della tesi	20
1.6	Chimica Covalente Dinamica	21
1.7	Dynamic Covalent Capture	24
1.8	DCC per il design di catalizzatori	28
1.9	Bibliografia	32

2. STUDIO DI INTERAZIONI DEBOLI MEDIANTE DYNAMIC COVALENT CAPTURE

2.1	Introduzione	37
2.2	Progettazione del sistema	39
2.2	Esperimenti di scambio con idrazoni	40
2.3.1	Double Mutant Cycle con idrazoni	41
2.3.2	Esperimenti di controllo	44
2.4	Isomeria degli idrazoni	48
2.5	Esperimenti di scambio tra immine	52

2.5.1	DMC con immine	52
2.6	Esperimenti di scambio idrazoni/immine	54
2.6.1	Esperimenti di scambio H+/A	55
2.6.2	Esperimenti di scambio H/A	58
2.6.3	Esperimenti di controllo	59
2.7	Conclusioni	60
2.8	Parte sperimentale	65
2.8.1	Strumentazione	65
2.8.2	Materiali	67
2.8.3	Procedura per gli esperimenti di scambio	68
2.8.4	Sintesi e caratterizzazioni	69
2.9	Bibliografia	74
3. STUDIO DI UNA MISCELA COMPLESSA CON SPETTROSCOPIA ¹³C NMR		75
3.1	Introduzione	75
3.2	Progettazione del sistema	77
3.2.1	Sintesi degli scaffold	78
3.2.2	Sequenza NMR e ottimizzazione dei parametri	81
3.2.3	Assegnazione dei segnali	82
3.3	Esperimenti di scambio su P1 – P2	84
3.3.1	Determinazione delle condizioni	84
3.3.2	Test cinetici di formazione della libreria	86
3.4	Libreria di idrazoni	89

3.4.1	Costruzione della libreria	90
3.4.2	Analisi all'equilibrio	94
3.5	Libreria di immine	96
3.6	Confronto delle stabilità termodinamiche	98
3.6.1	Scambio a coppie	99
3.7	Conclusioni	105
3.8	Parte sperimentale	107
3.8.1	Strumentazione e materiali	107
3.8.2	Sintesi e caratterizzazioni	107
3.8.3	Procedura sperimentale utilizzata per gli esperimenti di assegnazione dei segnali	116
3.8.4	Procedura generale per gli esperimenti di scambio tra idrazidi H/H+ o ammine A/A+.	117
3.8.5	Procedura generale per gli esperimenti di scambio tra l'ammina A e l'idrazide H.	117
3.9	Bibliografia	118
4. STUDIO DELLO STATO DI TRANSIZIONE DI UNA REAZIONE MODELLO		119
4.1	Strategia	121
4.2	Idrazoni	123
4.2.1	Calcolo dell'ordine di reazione e esperimenti cinetici	129
4.2.2	Effetto dell'isomeria	134
4.3	Immine	138
4.3.1	Stabilità in metanolo	139
4.3.2	Calcolo dell'ordine di reazione ed esperimenti cinetici	142

4.4	Conclusioni	144
4.5	Parte sperimentale	149
4.5.1	Strumenti e materiali	149
4.5.2	Sintesi e caratterizzazione	149
4.5.3	Procedura generale per gli esperimenti di transesterificazione degli idrazoni	161
4.5.4	Procedura generale per gli esperimenti di transesterificazione delle ammine	161
4.5.5	Procedura generale per il calcolo dell'ordine di reazione	162
4.6	Bibliografia	163

Abbreviazioni

ACN	Acetonitrile
bPP	Polipeptide pancreatico bovino
BuLi	Butil litio
DCC	Dynamic Covalent Capture
DCE	Dicloroetano
DEPT	Distorsion Enhancement by Polarization Transfer
DIPEA	Di-isopropiletil ammina
DMC	Double Mutant Cycle
DMF	Dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DNA	Acido desossiribonucleico
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
EtOAc	Acetato di etile
Et ₂ O	Etere etilico
EtPOCl ₂	Etilfosfonil-dicloruro
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KOtBu	Terbutossido di potassio
LC/MSD	Liquid Chromatography Mass Spectrography
Mel	Ioduro di metile
MeOH	Metanolo
MOM	Metilemetossi
NaOMe	Metossido di sodio
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
OAc	Acetato
Rd	Relaxation Delay
RDS	Rate Determining Step
TBA	Tetrabutyl ammonio
tBuOH	Terbutanolo
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TLC	Thin Layer Chromatography
TSA	Transition State Analogue
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography
UV-Vis	Spettroscopia UV-Visibile



This thesis describes the development of a methodology for the detection and the quantification of weak noncovalent interactions. The field of application of this methodology ranges from bioorganic chemistry,¹ to material science² and nanotechnology.³ The interest in developing new methodology rises from the difficulty to obtain experimental data on the quantification of the energetic contributions of weak interactions to the formation of noncovalent complexes. This project was inspired by the “Double Mutant Cycle” (DMC) methodology proposed by Hunter and coworkers for the quantification of noncovalent interactions in synthetic systems.⁴ DMC relies on the installment of a thermodynamic cycle, based on the consecutive mutation of the residues involved in the interaction. The thermodynamic stability of the mutant complexes is then correlated to the energetic contribution of the noncovalent interaction.

The new approach extends on this methodology and adds Dynamic Covalent Capture (DCC) to it as a novel feature.^{5,6} DCC describes the concomitant presence of a weak noncovalent interaction and a dynamic covalent bond in the same molecule. Because the noncovalent interaction occurs intramolecularly, the system is highly sensitive to the nature and strength of these interactions. The presence of the dynamic covalent bond serves to perform thermodynamic equilibrium studies. This is highly attractive from a practical point of view, since it allows self-selection processes between opposite recognition units. A DMC cycle is installed by comparing the equilibrium constants of two equilibrium reactions. The first equilibrium is between the target system and a single mutant lacking one of the interacting components. The second equilibrium is between a mutant lacking the other recognition unit and the double mutant, lacking both.

¹H NMR experiments provide the value of ΔG° for every equilibrium: their difference provides the $\Delta\Delta G$ value of the strength of the noncovalent interaction in a straightforward manner. In the first chapter this methodology has been applied to quantify the strength of an electrostatic interaction between a phosphonate and ammonium group joined in the same molecule through a reversible hydrazone bond. A remarkable result of a systematic study on a series of imines and hydrazones was the observation that the thermodynamic stability of the system not only results from the (expected) electrostatic interaction, but also from the occurrence of a hydrogen bond between the phosphonate group and the hydrazone linker.

In the second part of the work, the approach was extended to a larger library, in order to fully exploit the opportunities of the system, in particular the ability to extract information from a dynamic system composed of multiple equilibria. These studies were aimed at quantifying the effect of neighboring spectator groups on the strength of the

intramolecular interaction.⁷ A dynamic library was composed by mixing 4 scaffold molecules with various degree of substitution on the aromatic ring, 2 hydrazides and 2 amines. The aldehyde of each scaffold was isotopically labeled, to enable the analysis of the complex mixture via ¹³C NMR spectroscopy. The major advantage of using ¹³C NMR over ¹H NMR consists in the possibility to quantify a much larger library with with a single NMR experiment. This analysis provided the relative thermodynamic stabilities of 16 compounds (8 hydrazones + 8 imines), which could be compared to determine the quantify the effect of neighboring spectator groups.

In the last part, the obtained results on the strength of the intramolecular stabilization of the phosphonate group were correlated to catalysis. In accordance with previous studies, the phosphonate group was taken as a transition state analogue (TSA) of a transesterification reaction.⁸ The aim of this project was to establish whether a quantitative correlation existed between the strength of the intramolecular interaction between phosphonate and neighboring groups observed in the previous chapters and rate acceleration of the hydrolysis of the corresponding phenyl esters due to transition state stabilization. The introduction in the structure of groups able to increase the stability of a set of hydrazones/imine, is expected to enhance the reactivity of the corresponding esters, with the formation of an intramolecular recognition with transition state. This enhancement was indeed observed, but only in case the transition state represented by the TSA was corresponded to the Rate Determining Step (RDS) of the reaction. In those conditions, we found a good correlation between eactivity and thermodynamic stability of the corresponding TSA, even quantitatively when the exchange experiments and kinetic experiments were performed under identical experimental conditions. This shows that DCC can be conveniently used to obtain information on the stabilization of a reaction transition state, which makes it a powerful tool for catalyst development.

Lo scopo di questo progetto di Tesi consiste nello sviluppo di una metodologia in grado di individuare e quantificare interazioni non covalenti in soluzione. Una metodologia in grado di fornire informazioni riguardo alla natura e all'intensità di interazioni non covalenti trova applicazioni in molti ambiti, dalla chimica bioorganica,¹ alla scienza dei materiali² alle nanotecnologie.³ L'interesse in questo tipo di studi nasce dalla difficoltà di ottenere sperimentalmente questo tipo di informazioni, indirizzando la ricerca verso lo sviluppo di approcci innovativi in grado di fornire risultati in modo semplice e immediato. Il lavoro presentato ha tratto ispirazioni dalla metodologia denominata *Double Mutant Cycle* (DMC) proposta da Hunter e collaboratori, per lo studio delle interazioni non covalenti in sistemi sintetici.⁴ Questo approccio propone la costruzione di un ciclo termodinamico basato sulla mutazione consecutiva dei residui coinvolti nell'interazione, correlando la loro stabilità termodinamica alla formazione di un'interazione non covalente. In pratica il ciclo elimina i contributi dovuti agli effetti secondari indotti dalla mutazione, permettendo di determinare in modo accurato l'interazione tra i residui in esame. L'approccio presentato in questa Tesi prevede un'implementazione di questa metodologia, introducendo l'utilizzo del *Dynamic Covalent Capture* (DCC) per la misura della stabilità termodinamica relativa di due specie.^{5,6} L'incremento di sensibilità si rileva a seguito della formazione di un legame covalente tra le due molecole interagenti, in modo tale che il riconoscimento avvenga in maniera intramolecolare. Dal punto di vista pratico, il DCC si basa sull'esistenza di un equilibrio di scambio, la cui posizione è determinata dalla presenza o meno di un'interazione tra le molecole coinvolte. Il DMC è costruito sulla base di due equilibri di scambio: nel primo le molecole si mostrano in grado di dare riconoscimento molecolare, mentre il secondo è utilizzato come riferimento. Per ognuno dei due equilibri viene valutata la costante termodinamica ΔG° relativa allo scambio, analizzando la composizione della miscela tramite ^1H NMR: la differenza tra le due costanti termodinamiche così ottenute $\Delta\Delta G$ fornisce l'intensità dell'interazione non covalente che determina lo *shift* del primo equilibrio rispetto al secondo. Questa metodologia ha permesso di riconoscere e quantificare interazioni non covalenti di diversa natura all'interno dei sistemi in esame, sia di origine elettrostatica, sia di tipo legame idrogeno. È stato eseguito uno studio sistematico dell'interazione all'interno di una serie di idrazoni e immine, valutando gli effetti della natura e della flessibilità dello *spacer*.

Nella seconda parte del lavoro lo studio viene esteso a una libreria di composti più ampia, con lo scopo di individuare l'effetto di gruppi spettatori nell'evento di riconoscimento.⁷ A questo scopo è stata considerata una libreria formata da 4 *scaffold* variamente sostituiti all'anello, una coppia di idrazoni e una di ammine. Gli *scaffold*

presentano sulla posizione aldeidica un carbonio isotopicamente marcato per permettere lo studio della composizione della libreria tramite spettroscopia ^{13}C NMR. Il vantaggio introdotto dall'utilizzo della tecnica ^{13}C NMR rispetto al ^1H NMR precedentemente utilizzato consiste nella possibilità di determinare la concentrazione di una libreria di composti molto più vasta, composta da idrazoni e immine, attraverso un singolo esperimento NMR. In questo modo gli esperimenti di equilibratura si svolgono mescolando contemporaneamente tutti gli *scaffold* e una coppia di idrazidi o ammine in un unico tubo. In questo modo si ottiene la stabilità relativa di tutte le specie che viene correlata con l'intensità dell'interazione non covalente in esse presente. In questo modo è stato ottenuto uno schema di stabilità relativa di tutti i 16 composti (8 idrazoni + 8 immine) che formano il sistema.

L'ultima parte dell'elaborato presenta l'applicazione della metodologia basata sul DCC allo studio dell'interazione non covalente all'interno dello stato di transizione di una reazione modello. Studi precedenti hanno mostrato come le molecole utilizzate durante gli studi di scambio possano essere utilizzate come analoghi dello stato di transizione (TSA) della reazione di transesterificazione di un estere:⁸ in questo modo la stabilità dei composti precedentemente studiati può essere correlata numericamente con la reattività dei relativi esteri fenilici rispetto alla transesterificazione con sodio metossido in metanolo. Come l'introduzione del gruppo ammonio in catena laterale dell'idrazone/immina induce una stabilizzazione termodinamica a seguito del riconoscimento intramolecolare, così lo stesso gruppo dovrebbe determinare una maggiore reattività della specie in cui esso è presente. Gli studi evidenziano che una correlazione è evidenziabile solo nel caso in cui lo stato di transizione mimato dal TSA (l'attacco nucleofilo) costituisca anche il *Rate Determining Step* (RDS) della reazione. Utilizzando un regime sperimentale in cui questo è verificato, si dimostra una buona correlazione qualitativa tra la reattività e la stabilità termodinamica del corrispondente TSA. Infine nel caso in cui gli esperimenti cinetici e quelli di stabilità possano essere svolti nello stesso regime sperimentale, si ottiene un'ottima correlazione numerica tra la reattività dei composti in esame e la stabilità termodinamica dei corrispondenti TSA.

Questi risultati evidenziano come il DCC fornisca una metodologia unica e semplice per ottenere informazioni riguardo allo stato di transizione di una reazione, permettendo l'accesso a dati sperimentali che sarebbero difficilmente ottenibili con altre tecniche.

Bibliografia / Bibliographic reference

¹ Voet D., V. J. G., *Biochemistry*. 3 ed.; Wiley: New York, 2004; Vol. 1.

² Lehn, J. M., *Science* **2002**, 295, (5564), 2400-2403.

³ Lehn, J. M., *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*. Wiley-VCH: Weinheim, 1995.

⁴ Hunter, C. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5310-5324.

⁵ Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed* **2009**, 48, 2288-2306.

⁶ Gasparini, G.; Vitorge, B., Scrimin, P.; Jeannerat, D.; Prins, L. J.; *Chem. Commun.* **2008**, 3034-3036.

⁷ Dal Molin, M., Gasparini G., Scrimin, P., Rastrelli, F., Prins, L. J., *Chem Commun.* **2011**, 47, 12476-12478.

⁸ Gasparini, G.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed* **2008**, 47, 2475-2479.

Abstract

1. Introduzione

1.1 Interazioni non covalenti deboli

L'importanza delle interazioni non covalenti si esprime in molteplici aspetti della vita quotidiana. Esse determinano molte delle caratteristiche della materia come lo stato fisico, la temperatura di fusione ed ebollizione, la viscosità o la tensione superficiale.¹ Le interazioni tra molecole influenzano inoltre la velocità delle reazioni chimiche, sono coinvolte nei processi di separazione cromatografica e, soprattutto, giocano un ruolo fondamentale in molti processi biologici. Lo sviluppo di nuove discipline come le nanotecnologie, la chimica dei materiali o la chimica biologica richiedono la comprensione dei meccanismi che le regolano e prevedono quindi la conoscenza approfondita delle interazioni non covalenti implicate nei processi di riconoscimento molecolare.

Le interazioni non covalenti, definite anche interazioni deboli, sono classificate in base alla natura delle specie che le determinano o in base alla loro forza: in particolare si distinguono le interazioni ione-dipolo, dipolo-dipolo indotto, il legame coordinativo e il legame idrogeno.² Esse sono caratterizzate da energie minori di 10-20 kJ/mol, almeno 1 ordine di grandezza più deboli rispetto ai legami covalenti (la cui energia è tipicamente maggiore di 100 kJ/mol).

Le interazioni deboli influenzano lo svolgimento di molti processi biologici in quanto possono essere formate e distrutte dall'energia cinetica delle molecole nel sistema. La forza delle interazioni deboli è determinata dalla natura delle specie coinvolte, dalla loro distanza e dalla loro orientazione relativa. La tabella 1.1 descrive la natura delle interazioni non covalenti.

Tabella 1.1: Natura delle interazioni non covalenti

Interazione non covalente		Natura dell'interazione: a) Tipo di forza b) Energia di interazione ^a
Elettrostatica	ione-dipolo	a) Elettrostatica b) 0.2-4 kJ/mol Dipende da r^{-2} o r^{-4}
	ione-dipolo indotto	
Van der Waals	dipolo-dipolo	a) Elettrostatica b) 0.5-4 kJ/mol Dipende da r^{-3} o r^{-6}
	dipolo-dipolo indotto	
	dipolo indotto-dipolo indotto (forze di dispersione)	a) Interazione attrattiva tra cariche fluttuanti b) 0.2-2 kJ/mol Dipende da r^{-6}
Legame idrogeno Richiede l'interazione tra atomi specifici (A è l'accettore, B è il donatore) $A-H + B \rightarrow A-H:B$		Interazione accettore/donatore; elettrostatica

a) L'energia dipende dalla carica netta, dalla distanza (indicata come r) e dal mezzo.

Se considerate individualmente, l'effetto delle interazioni non covalenti risulta minimo data la loro energia e la loro natura transiente, tuttavia il loro contributo collettivo influenza significativamente le proprietà dei sistemi chimici e biologici. In particolare in questi ultimi le interazioni non covalenti giocano un ruolo fondamentale e sono coinvolte in processi quali la catalisi enzimatica, la regolazione allosterica l'espressione genica, la trasduzione di segnali chimici all'interno di processi biologici. Le alterazioni di questi meccanismi sono alla base dell'insorgenza di molte gravi patologie, pertanto la conoscenza approfondita di tali processi risulta cruciale nell'ambito della ricerca biologica, per lo sviluppo di nuovi farmaci o nel *design* di nuovi sistemi per il *drug delivery*.

Un altro ambito in cui la conoscenza del meccanismo delle interazioni non covalenti risulta fondamentale è lo studio delle velocità delle reazioni chimiche. La rete di interazioni che si crea tra le molecole di solvente, reagenti e prodotti determina infatti la velocità con cui una reazione avviene; inoltre le interazioni non covalenti che si esprimono nello stato di transizione ne determinano la stabilità relativa rispetto ai reagenti, influenzando sull'energia di attivazione delle reazioni. Uno studio dettagliato delle interazioni non covalenti all'interno dello stato di transizione di una reazione fornisce la base per la comprensione dell'effetto catalitico che si osserva nei sistemi enzimatici e risulta necessaria per la progettazione e lo sviluppo di nuovi catalizzatori che presentino le stesse caratteristiche di attività e selettività.

1.2 Ruolo delle interazioni non covalenti nei sistemi biologici

I sistemi biologici sono forse gli esempi più eclatanti del ruolo fondamentale ricoperto dalle interazioni non covalenti. Data l'enorme varietà di queste interazioni e la complessità dei sistemi in cui esse si esprimono, questo paragrafo tratterà solo alcuni casi generali di come le interazioni non covalenti possono influire sui processi biologici, limitando la descrizione a pochi esempi.³

Uno dei principali esempi dell'effetto delle interazioni non covalenti sui sistemi biologici si ritrova nella struttura spaziale delle proteine, definita da diversi gradi di organizzazione. La struttura primaria è determinata dalla sequenza amminoacidica del *backbone* peptidico, la struttura secondaria riguarda il *folding* della catena in domini definiti quali eliche o β *sheet*, la struttura terziaria determina l'organizzazione dei domini definendo la struttura tridimensionale vera e propria della proteina. Infine la struttura quaternaria è correlata con l'interazione tra diverse subunità proteiche. A parte per la struttura primaria, tutti i processi che concorrono alla determinazione della struttura proteica sono controllati da interazioni non covalenti.

I sistemi proteici sono i costituenti fondamentali delle cellule animali e vegetali e sono coinvolti in molti processi cellulari come il riconoscimento, la catalisi o il trasporto. La funzione biologica delle proteine è correlata con la loro struttura tridimensionale in soluzione: a ogni struttura corrisponde una funzione biologica ben determinata, perciò la perdita di tale struttura comporta necessariamente anche la perdita della funzione stessa della proteina. Variazioni della struttura tridimensionale proteica possono determinare alterazioni delle funzioni della proteina, causando malfunzionamenti nei processi cellulari o la morte della cellula stessa. L'esistenza di una struttura tridimensionale proteica definita è correlata con la presenza di interazioni non covalenti tra i residui amminoacidici della proteina: condizioni che impediscono la formazione di tali interazioni implicano la perdita della struttura tridimensionale e quindi della funzionalità stessa della proteina. Il processo di denaturazione è determinato proprio da quelle condizioni sperimentali che agiscono sulla formazione delle interazioni non covalenti tra residui amminoacidici, come la variazione di temperatura, pH, natura del solvente o cambiamenti della forza ionica.

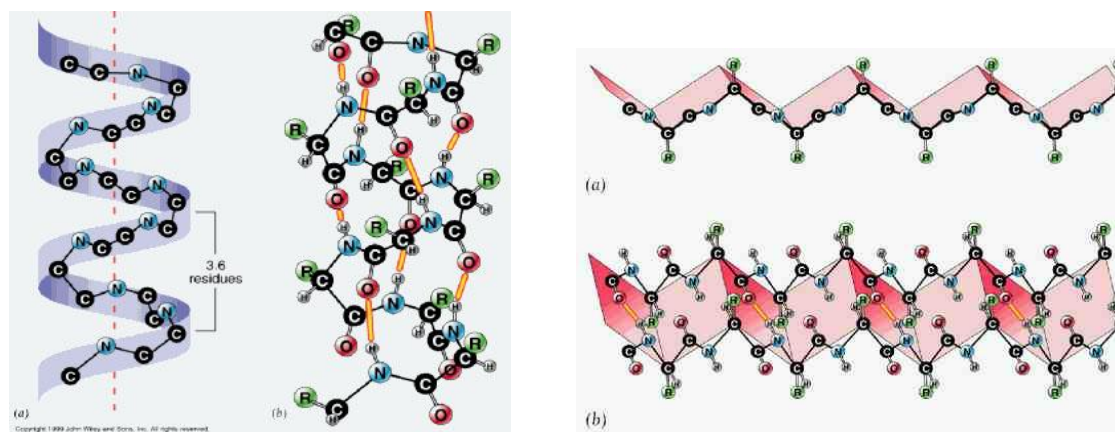


Figura 1.1 : Strutture secondarie nelle proteine. Elica α (a sinistra) e foglietto β (a destra).

La natura delle interazioni non covalenti coinvolte nella formazione di strutture proteiche tridimensionali è variabile. I motivi tipici della struttura secondaria, costituiti essenzialmente da foglietti β e eliche α (Figura 1.1) sono determinati dalla formazione di legami idrogeno che coinvolgono i residui del *backbone* peptidico. L'interazione si stabilisce tra protone N-H del legame ammidico di un amminoacido (donatore del legame idrogeno) e l'ossigeno C=O (accettore di legami idrogeno) del gruppo carbonilico di un amminoacido diverso. Strutture secondarie come le eliche o i foglietti si ritrovano all'interno della maggior parte delle proteine naturali. Esse sono caratterizzate da strutture ben definite, che compaiono in presenza di determinate sequenze amminoacidiche. Queste strutture sono stabili in condizioni fisiologiche e costituiscono dei domini ben definiti all'interno delle proteine: l'effetto dei legami idrogeno che coinvolgono il *backbone* peptidico ha carattere additivo, di modo che una serie di interazioni non covalenti deboli è in grado di determinare l'esistenza di una struttura stabile in soluzione. La presenza di questi motivi strutturali contribuisce a determinare le caratteristiche chimico-fisiche della proteina, come nel caso dei foglietti β la cui compattezza strutturale conferisce alle proteine caratteristiche di particolare resistenza. Lo studio della formazione di queste strutture, e quindi della comprensione del *network* di interazioni non covalenti che le determinano, è cruciale in molti ambiti e costituisce un filone di ricerca di grande impatto. Un esempio è costituito dall'interesse rivolto allo studio della formazione di foglietti β : essi costituiscono la struttura principale delle fibrille amiloidi, catene proteiche ad alto peso molecolare, la cui deposizione all'interno della cellula è stata correlata con l'insorgenza di alcune patologie degenerative come il morbo di Alzheimer.

Livelli più alti di organizzazione strutturale proteica si trovano nella struttura terziaria o quaternaria: la prima si riferisce alla struttura tridimensionale completa della proteina nella condizione fisiologica, mentre la seconda riguarda l'associazione di due o più subunità macromolecolari. Mentre le strutture secondarie vengono determinate da interazioni che coinvolgono il *backbone* peptidico, nel caso delle strutture superiori sono le interazioni non covalenti esistenti tra le catene laterali degli amminoacidi a giocare il ruolo predominante nella determinazione della struttura. Si tratta di interazioni in genere più deboli del legame idrogeno, normalmente interazioni di Van der Waals o idrofobiche, anche se la presenza di legami covalenti disolfuro può determinare un ruolo importante. Mediamente la forza delle interazioni che determinano la formazione delle strutture di organizzazione più complesse è minore di quella relativa ai legami idrogeno, pertanto la natura di queste strutture è più flessibile: legami non covalenti possono essere formati o distrutti con un minore apporto energetico. In tal modo la struttura è in grado di adattarsi a seguito di eventi di *binding* con molecole, cambiamento delle condizioni del sistema, interazione con recettori. Tale flessibilità strutturale è una caratteristica fondamentale dei sistemi proteici che si dimostrano in tal modo in grado di svolgere funzioni diverse mediate da regolazioni allosteriche.

Vale la pena di sottolineare come gli eventi di *folding* proteico, responsabili della formazione di strutture tridimensionali superiori, siano guidati dall'esistenza una rete complessa di interazioni non covalenti che danno origine a effetti cooperativi, il cui effetto globale risulta maggiore della somma dei singoli contributi. Il *folding* proteico è un processo gerarchico in cui alcuni motivi strutturali si formano per primi e guidano il resto della catena polipeptidica ad assumere la conformazione nativa. Il processo non avviene

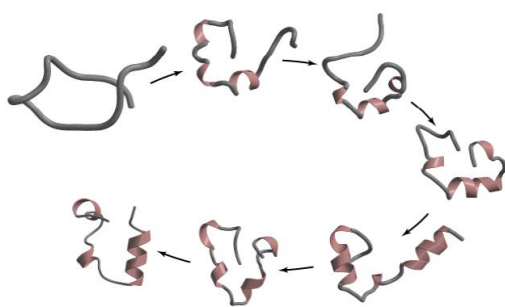


Figura 1.2: Schema di *folding* proteico.

per esplorazione casuale di tutte le conformazioni possibili, ma è determinato da un percorso piuttosto preciso e diretto che prevede il passaggio attraverso conformazioni a energia via via più basse, fino ad arrivare a quella caratterizzata dall'energia minore, che costituisce la forma nativa. L'effetto cooperativo della rete di interazioni non covalenti permette il raggiungimento dello stato nativo attraverso una via diretta, determinando la formazione della conformazione energeticamente più stabile in tempi molto brevi.

Un ulteriore esempio evidente degli effetti delle interazioni non covalenti in sistemi biologici è costituito dagli enzimi, in cui le interazioni non covalenti all'interno del sito attivo sono responsabili dell'attività catalitica e della selettività che caratterizza questi sistemi. La natura delle interazioni non covalenti all'interno dei sistemi enzimatici è estremamente varia: si tratta di interazioni molto specifiche tra il substrato e pochi residui amminoacidici presenti nel sito attivo. L'effetto delle interazioni non covalenti si esprime sia nell'evento di *binding* con il substrato sia nell'effetto catalitico vero e proprio: questa combinazione determina attività e selettività straordinarie, tipiche di questi sistemi e difficilmente raggiungibili in analoghi sintetici. I sistemi enzimatici catalizzano un numero enorme di reazioni all'interno dell'ambiente cellulare, la cui natura è estremamente variabile e comprende ad esempio la formazione e la scissione di legami peptidici, reazioni di fosforilazione, trasporto di ioni e di altre molecole, trasduzione di segnale e regolazione di processi cellulari.

L'altissima specificità dei sistemi enzimatici è la causa diretta dell'esistenza di una rete di interazioni non covalenti tra il substrato e il sito attivo dell'enzima: dato che l'intensità è fortemente influenzata dalla distanza e dall'orientazione relativa dei gruppi coinvolti nell'interazione non covalente, cambiamenti strutturali nell'enzima possono generare eventi di *binding* estremamente selettivi. In questo senso, il processo di *binding* con il substrato è un processo dinamico, che comprende non solo l'associazione enzima-substrato, ma anche una serie di movimenti della catena proteica, mediati da interazioni



Figura 1.3: Schema generale di catalisi enzimatica.

non covalenti, che favorisce il riconoscimento molecolare col substrato (modello *induced-fit*). Nel contempo l'attività enzimatica, espressa nell'evento di catalisi, è frutto di una serie di interazioni non covalenti che coinvolgono il sito attivo e il substrato nello stato di transizione. La stabilizzazione

indotta da queste interazioni abbassa l'energia dello stato di transizione, diminuendo di conseguenza l'energia di attivazione della reazione stessa.

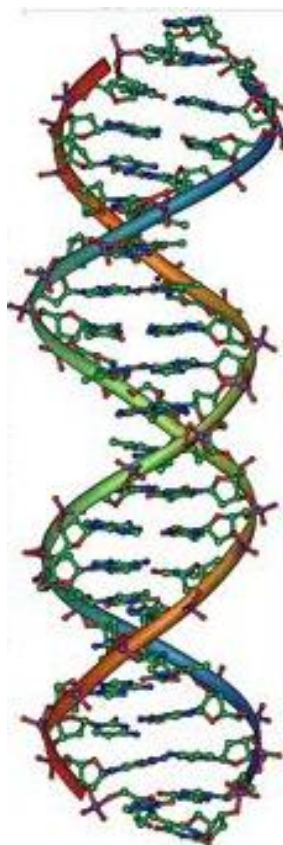


Figura 1.4. Struttura a doppia elica del DNA.

L'ultimo esempio che chiarisce l'importanza delle interazioni non covalenti nelle funzioni biologiche è rappresentato dalla trasduzione genetica ad opera del DNA. In questo tipo di sistema le informazioni genetiche sono affidate alla disposizione in sequenza di quattro basi azotate all'interno dell'elica che codificano tutte le informazioni necessarie per la sintesi di proteine utili alla cellula. La possibilità di trascrivere le informazioni e di duplicare il materiale genetico è affidato all'esistenza di due filamenti complementari organizzati in una struttura a doppia elica, la cui formazione è originata da interazioni non covalenti di tipo legame idrogeno che si esprimono tra le quattro nucleobasi presenti sulle unità monometriche di acido desossiribonucleico. L'appaiamento preferenziale adenina-timina e citosina-guanina è determinato da legami idrogeno esistenti tra i residui purinici o pirimidinici che si trovano in posizioni relative ottimali per favorire tali interazioni. La precisione con cui avviene la duplicazione del materiale genetico, e quindi la possibilità che si verifichino errori nella trascrizione, dipende dalla formazione di legami idrogeno tra le basi azotate.

Anche l'organizzazione spaziale della doppia elica è cruciale negli eventi di duplicazione, trascrizione e traduzione: una vasta gamma di interazioni non covalenti, oltre al legame idrogeno delle basi azotate, contribuiscono alla stabilità di questa struttura. Queste comprendono interazioni dipolo-dipolo, idrofobiche e di π *stacking*, in grado di determinare la formazione della doppia elica, di eventuali superavvolgimenti e della sua organizzazione in strutture superiori come i cromosomi.

1.3 Interazioni non covalenti in sistemi sintetici: Chimica Supramolecolare

Le complesse architetture che caratterizzano i sistemi naturali descritti nel paragrafo precedente hanno ispirato la ricerca verso la sintesi di strutture caratterizzate da un grado di complessità sempre più elevato.⁴ Lo studio di sistemi biologici ha permesso di chiarire il ruolo fondamentale delle interazioni non covalenti nella determinazione della

struttura, e quindi della funzione, di questi tipi di sistemi: da questa consapevolezza si è sviluppata la disciplina denominata Chimica Supramolecolare che riguarda lo studio di complessi di sistemi molecolari o subunità assemblati attraverso legami non covalenti.

In particolare la chimica supramolecolare tratta dell'associazione di componenti molecolari attraverso la formazione di interazioni non covalenti specifiche.^{5,6} Gli esempi più numerosi riguardanti le applicazioni della chimica supramolecolare riguardano lo studio del riconoscimento molecolare e lo sviluppo della chimica *host-guest*, ma l'ambito di studio di questa disciplina si è enormemente allargato durante gli ultimi 30 anni, a partire dai primi studi di Cram, Pedersen e Lehn che hanno valso loro il Premio Nobel per la Chimica nel 1987.

Oggi le applicazioni della chimica supramolecolare spaziano dal campo bioorganico, alle nanotecnologie, alla chimica dei materiali. La ricerca in questo ambito ha portato negli anni alla scoperta di nuove strutture sintetiche come rotaxani e catenani,⁷ sistemi per il trasporto di ioni,⁸ sensori,⁹ molecole auto-replicanti¹⁰ con applicazioni possibili in numerosi ambiti.

La natura delle interazioni non covalenti che vengono utilizzate per il *design* di queste architetture varia dalle interazioni elettrostatiche ai legami coordinativi, alle interazioni dipolo-dipolo. In particolare l'utilizzo del legame idrogeno ha riscosso molto interesse in studi basati sul riconoscimento molecolare: questo tipo di interazione, di fondamentale importanza anche in sistemi biologici, possiede particolari caratteristiche di direzionalità, stabilità e versatilità che la rende adatta a essere utilizzata per il *design* di architetture molecolari complesse.

In letteratura gli esempi di strutture supramolecolari complesse sono molto numerosi, una loro trattazione esaustiva esula degli scopi di questo elaborato. Si riportano solo alcuni esempi selezionati con lo scopo di sottolineare la versatilità di questa metodologia e le potenzialità di applicazione in ambiti diversi.

1.3.1 *Molecular tweezers* e *clips*

Uno degli ambiti che ha attratto maggiormente l'attenzione nell'ambito della chimica supramolecolare è il *design* di sistemi *host-guest* in grado di riconoscere ioni o molecole neutre. In particolare lo studio di *molecular tweezers* e *clips* (pinze e fermagli molecolari)¹¹ riguarda il *design* di sistemi molecolari che mostrano la capacità di controllare il movimento a livello molecolare a seguito di uno stimolo derivato da un riconoscimento.

Questi sistemi sono caratterizzati dalla presenza di una cavità aperta in grado di legare *guest* attraverso un'ampia serie di interazioni non covalenti inclusi legame idrogeno, interazioni coordinative con metalli, interazioni idrofobiche e di Van der Waals, effetti elettrostatici o interazioni π - π . Il *design* di questi sistemi prevede la presenza di due braccetti in grado di legare un determinato *guest* connessi tra loro attraverso una piattaforma che serve da *spacer* (Figura 1.5).¹²

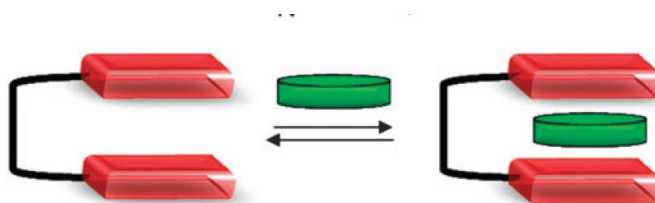


Figura 1.5: a) Schema del *molecular tweezer* e il suo principio di funzionamento nel riconoscimento supramolecolare.

La rigidità dei braccetti influenza il *binding* del substrato, distinguendo il *molecular clip* (più rigido) dal *molecular tweezers* (più flessibile). Modificando la natura e le dimensioni delle braccia e dello *spacer* utilizzati nel *design* del sistema è possibile modulare l'interazione con il *guest* raggiungendo alti livelli di selettività nel riconoscimento. Lo sviluppo di questi sistemi è di grande interesse nella chimica *host-guest*, nel riconoscimento molecolare, ma anche nella catalisi supramolecolare e per lo sviluppo di architetture complesse che mimano i sistemi naturali. La ricerca in questo senso si sta dirigendo verso lo sviluppo di sistemi solubili in acqua, dove il *binding* è determinato da interazioni idrofobiche con lo scopo di sintetizzare sistemi bioattivi che possano legare nucleobasi,¹³ inibitori di enzimi¹⁴ o potenziali candidati farmacologici.¹⁵

1.3.2 Capsule Molecolari

Un altro ambito di ricerca della chimica *host-guest* riguarda lo sviluppo e la sintesi di capsule molecolari di cui fanno parte carcerandi, emicarcerandi e criptandi. Questi sistemi sono in grado di incapsulare molecole in modo reversibile o irreversibile: l'inclusione di specie chimiche all'interno di un sistema che presenta forma e volume definiti modifica le loro proprietà chimiche, determinando cambiamenti nella loro stabilità, solubilità o reattività.

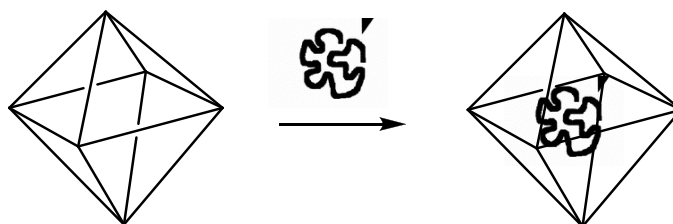


Figura 1.6: Incapsulamento di *guest* in una capsula molecolare

La natura di questi sistemi è estremamente variabile: è possibile modulare la rigidità, il volume e la forma delle capsule in modo da poter includere molecole di varia natura come ioni o piccole molecole. Spesso il riconoscimento si dimostra molto selettivo in quanto mediato da una rete di interazioni non covalenti di diversa natura come interazioni metallo-legante,¹⁶ legame idrogeno,¹⁷ interazioni elettrostatiche¹⁸ o interazioni idrofobiche.¹⁹

L'interesse principale di questi sistemi risiede nello studio delle proprietà delle molecole presenti all'interno del complesso: l'inclusione nell'ambiente ristretto della cavità può forzare il *guest* ad assumere conformazioni a energia elevata determinando importanti cambiamenti nella sua reattività.²⁰

Spesso la capsula può determinare l'inclusione di più specie chimiche le quali, possono eventualmente interagire tra loro. L'avvicinamento spaziale all'interno di un sistema confinato come quello della capsula determina un aumento della velocità della reazione, permettendo l'utilizzo di questi sistemi come catalizzatori. Studi recenti propongono l'utilizzo di sistemi che modificano la regioselettività della reazioni che avvengono all'interno della capsula imponendo ai reagenti particolari costrizioni geometriche non ottenibili in soluzione.²¹

Negli ultimi anni le scoperte effettuate nell'ambito della chimica supramolecolare hanno permesso il *design* di strutture con funzionalità simili a quelle dei sistemi biologici. Le scoperte in questo ambito hanno aperto la strada verso lo studio delle nanotecnologie con importanti risvolti in ambito chimico e medico con lo sviluppo di materiali innovativi o sistemi per il *drug delivery*. Non c'è dubbio che molto lavoro deve essere ancora compiuto per comprendere appieno tutti gli eventi che determinano la funzionalità dei complessi supramolecolari e che guidano la loro formazione. In particolar modo la razionalizzazione della complessa rete di interazioni non covalenti presente in questi sistemi rappresenta un grande passo avanti nello studio degli stessi. Per questo motivo la presenza di uno strumento in grado di quantificare interazioni non covalenti in modo

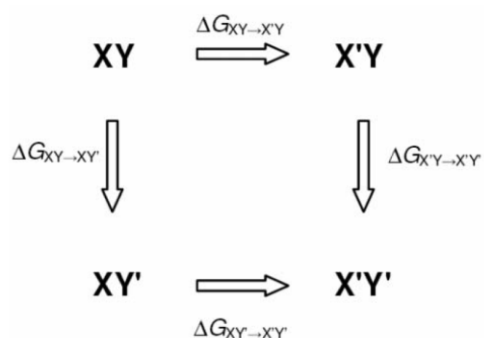
semplice e rapido può rappresentare un'importante fonte di informazioni utili allo sviluppo di architetture molecolari sempre più complesse.

1.4 Misura di interazioni non covalenti

Dagli esempi presentati nei precedenti paragrafi risulta chiara l'importanza delle interazioni non covalenti sia nella chimica biologica sia in applicazioni di chimica supramolecolare. E' evidente come l'utilizzo di questi approcci preveda necessariamente una conoscenza approfondita delle interazioni non covalenti che costituiscono la *driving force* del sistema: occorre stabilire sia la natura di tali interazioni che la loro intensità all'interno del sistema in esame. La natura stessa delle interazioni non covalenti fa sì che risulti molto difficile ottenere sperimentalmente valori accurati della loro energia: ne consegue che lo sviluppo di una metodologia semplice in grado di determinare quantitativamente la forza di un'interazione non covalente in soluzione sia di enorme interesse in questo tipo di studi.

Tralasciando volutamente la trattazione completa delle metodologie utilizzate per la determinazione della forza delle interazioni non covalenti, il presente paragrafo si concentrerà sulla metodologia denominata "Double Mutant Cycle" (DMC).²²

1.4.1 Double Mutant Cycle, aspetti teorici



$$\begin{aligned}\Delta\Delta G &= \Delta G_{XY \rightarrow X'Y} - \Delta G_{X'Y \rightarrow X'Y'} \\ &= \Delta G_{XY \rightarrow XY'} - \Delta G_{X'Y \rightarrow X'Y'}\end{aligned}$$

Figura 1.7: Rappresentazione schematica del *double mutant cycle* proposto da Fersht.

Nel 1984 viene proposto per la prima volta da Fersht l'utilizzo di un ciclo termodinamico generale con lo scopo di evidenziare effetti cooperativi delle interazioni non covalenti nel *binding* di un substrato a un enzima.²³ Se la variazione di energia libera a seguito della mutazione di un residuo **X** differisce da quella ottenuta a seguito della mutazione di un residuo **Y** sullo stesso peptide, allora esiste una interazione tra i due residui **X** e **Y** prima della mutazione (figura 1.7). In tal modo la differenza di energia libera a seguito di due

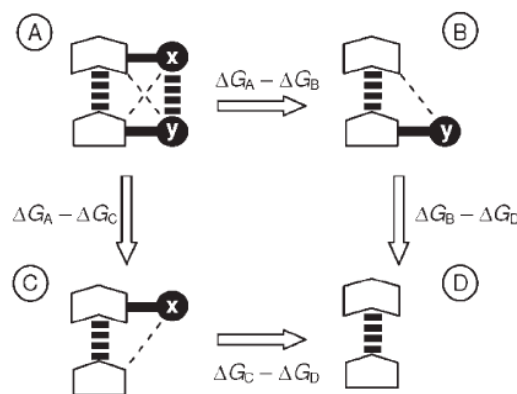


Figura 1.8: Rappresentazione generale di un DMC per lo studio dell'interazione tra i residui **x** e **y**. Le linee tratteggiate spesse rappresentano l'interazione non covalente maggiore nel complesso supramolecolare, le linee tratteggiate sottili rappresentano gli effetti secondari che vengono cancellati all'interno del ciclo.

mutazioni parallele fornisce la misura dell'interazione esistente tra i residui **X** e **Y**. Questo approccio denominato “*Double Mutant Cycle*” è stato in seguito utilizzato per la misura di interazioni non covalenti tra residui amminoacidici nelle proteine.^{24,25}

Un approccio interessante proposto da Hunter e collaboratori consiste nell'applicazione di questa metodologia allo studio di interazioni non covalenti in complessi sintetici, con lo scopo di quantificare tali interazioni e di ottenere informazioni riguardo alla loro natura.²⁶ In questo caso, analogamente a quanto

avviene all'interno di sistemi biologici complessi, una singola mutazione non permette di determinare in modo accurato l'interazione tra i residui in esame in quanto la mutazione stessa causa la modifica del *network* di interazioni multiple all'interno del complesso. L'utilizzo del DMC risolve questo problema, in quanto gli effetti secondari della mutazione si elidono all'interno del ciclo termodinamico. L'applicazione di questa metodologia prevede che il sistema soddisfi alcune condizioni:

- i) le perturbazioni secondarie indotte dalle mutazioni devono essere funzioni additive delle mutazioni stesse, in altre parole occorre escludere effetti di cooperatività tra le interazioni non covalenti secondarie presenti nel sistema. Questo è di solito verificato in sistemi semplici in cui il grado di libertà conformazionale è limitato;
- ii) i residui mutati non devono interagire tra di loro: ciò assicura che il riferimento rispetto a cui le interazioni vengono misurate sia effettivamente nullo;
- iii) idealmente non ci devono essere differenze conformazionali tra i membri del ciclo termodinamico, tuttavia se entrambe le mutazioni implicano lo stesso cambiamento di conformazione, il suo contributo risulterà cancellato all'interno del ciclo.

La figura 1.8 mostra una rappresentazione schematica del DMC usato per quantificare l'interazione non covalente tra i residui **x** e **y** all'interno del complesso **A**. Tale interazione è determinata attuando la mutazione di entrambi questi residui. Come già detto, una singola mutazione non permette di ottenere un valore accettabile in quanto

essa modifica anche l'interazione tra i residui e il complesso stesso. Il complesso *Double Mutant D* quantifica questi effetti secondari che possono pertanto essere considerati nel calcolo dell'interazione effettiva dei due residui **x** e **y** all'interno del complesso di interesse **A**. Questo approccio permette la quantificazione di interazioni sia attrattive che repulsive anche molto piccole (<1 kJ/mol).

In questo modo è stato possibile quantificare una varietà molto ampia di interazioni non covalenti all'interno di complessi organici sintetici: il prossimo paragrafo riporta alcuni esempi relativi a questo tipo di applicazioni.

1.4.2 Double Mutant Cycles, aspetti pratici

Il primo esempio è rappresentato dal lavoro di Aoyama²⁷ in cui viene preso in esame il complesso **A** rappresentato in figura 1.9.

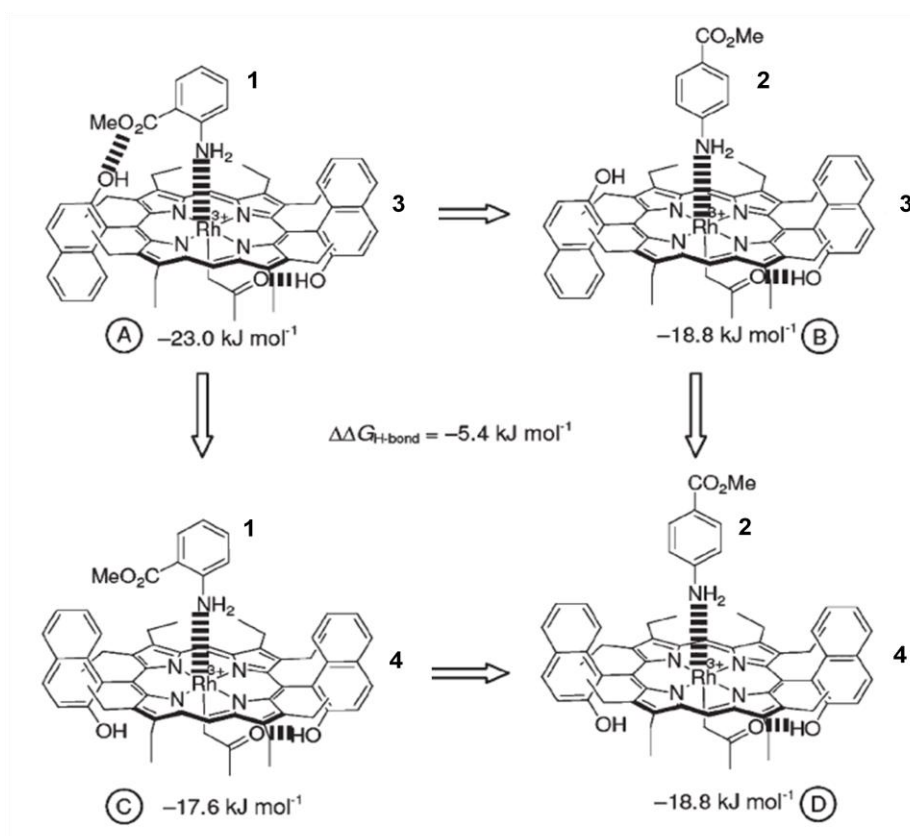


Figura 1.9: Schema del DMC utilizzato per la determinazione dell'interazione non covalente tra il gruppo acido di ammino fenilacetato **1** e il gruppo ossidrilico nel sistema porfirinico **4**.

In questo caso il complesso bi-funzionale metallo porfirinico **4** interagisce con l'orto aminofenilacetato **1** attraverso una serie di legami non covalenti che coinvolgono l'interazione dell'azoto amminico dell'anilina con il centro metallico di Rh^{3+} e un legame

idrogeno tra il residuo estereo di **1** e la funzione ossidrilica presente sulla porfirina. Il DMC è costruito con lo scopo di misurare la forza del legame idrogeno all'interno di questo complesso, pertanto vengono considerati i complessi mutanti **B** e **C** in cui tale interazione è assente: infatti il composto para amminofenilacetato **2** non riesce a interagire tramite legame idrogeno con il complesso porfirinico data la sua posizione relativa e lo stesso avviene nel complesso **C** in cui il residuo fenolico nella porfirina **4** non interagisce con il gruppo estereo del composto **2**. Il complesso *Double Mutant* **D** manca di entrambe queste interazioni e fornisce il valore dell'interazione ammina-metallo nei complessi mutanti, in altre parole esso quantifica gli effetti secondari delle mutazioni sulle interazioni nei complessi **B** e **C**. Le costanti di *binding* e le energie libere di complessazione sono state ottenute da titolazioni spettrofotometriche, mentre l'analisi termodinamica è stata affaturata riferendosi allo schema di figura 1.8. L'analisi è stata effettuata su una serie di composti simili e fornisce per l'orto amminofenil acetato **1** un valore del legame idrogeno pari a 5.4 kJ/mol. Lo stesso sistema porfirinico rigido e ben definito è stato utilizzato per lo studio di altre interazioni non covalenti²⁸ come il legame idrogeno o lo *stacking* aromatico. Questi esempi mostrano la versatilità di questo tipo di approccio per lo studio di una grande varietà di interazioni non covalenti di diversa natura, che risultano particolarmente complesse da studiare sperimentalmente con strategie diverse dal DMC. Questa metodologia introduce inoltre la possibilità di effettuare un'analisi di tutte le interazioni presenti in un sistema complesso come quello riportato in figura 1.9 in cui sono presenti molteplici interazioni non covalenti, costruendo di volta in volta il DMC relativo all'interazione in esame.

Molti studi presenti in letteratura riportano l'utilizzo dei DMC applicato a complessi di tipo *molecular zipper*, rappresentati in figura 1.10^{29,30}. Questi sistemi presentano la possibilità di formare dei complessi non covalenti intermolecolari stabilizzati da legami idrogeno che coinvolgono residui ammidici appartenenti a molecole diverse. Sistemi che presentano questo tipo di *pattern* si prestano molto bene per lo studio di interazioni non covalenti in quanto i residui terminali ammidici coinvolti nell'interazione possono essere facilmente mutati e le costanti di *binding* si ottengono da titolazioni ¹H NMR. Lo studio del legame idrogeno tra residui ammidici risulta di particolare interesse biologico, dato il ruolo che queste interazioni rivestono nei processi di *folding* proteico.

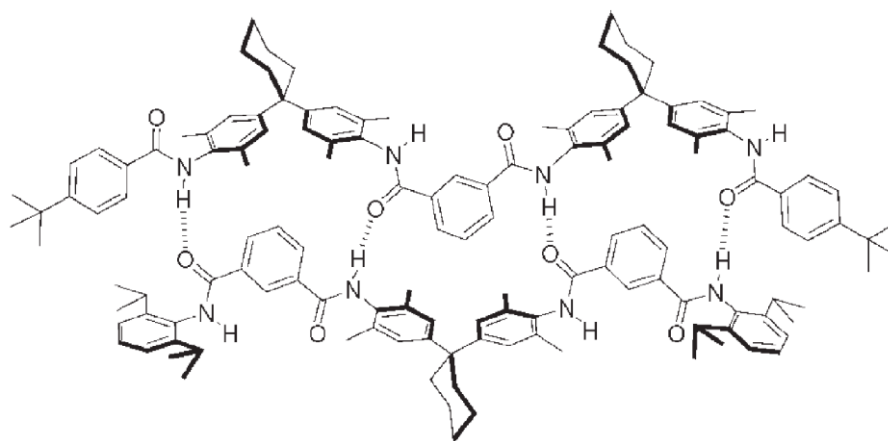


Figura 1.10: struttura di un complesso *molecular zipper*

Un esempio dell'utilizzo di questi complessi è presentato nel lavoro di Hunter e collaboratori^{31,32} in cui un complesso di tipo *molecular zipper* viene utilizzato per la misura dell'interazione *edge to face* tra i gruppi terminali legati all'amide delle molecole **5** e **7** nel complesso **A** (Figura 1.10). Nei complessi **B** e **C** i residui fenilici responsabili dell'interazione sono stati rimossi e sostituiti rispettivamente da un gruppo terbutilico (**6**) e da una catena n-esilica (**8**): questi gruppi eliminano l'interazione in esame nei complessi **B**, **C** e **D** e assicurano la solubilità di tutte le specie in CDCl_3 , solvente in cui sono state svolte le titolazioni ^1H NMR.

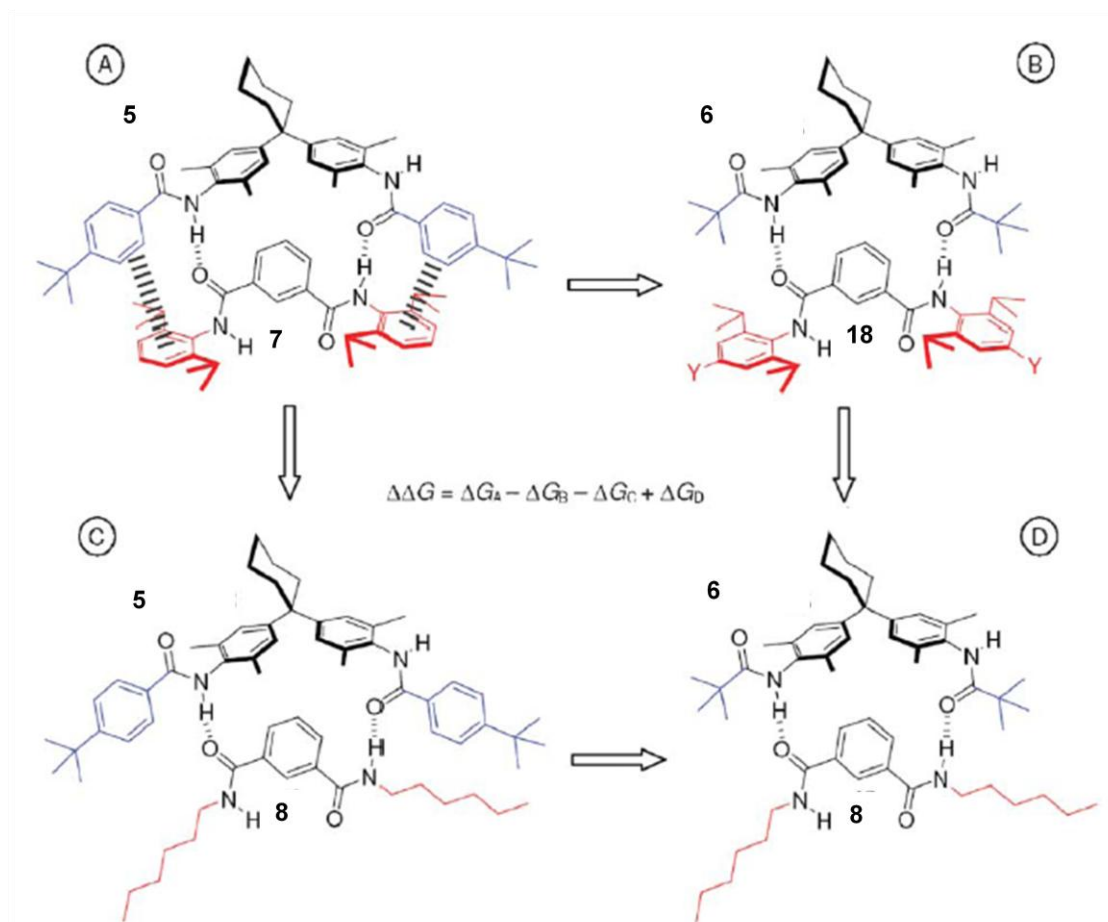


Figura 1.11: Schema del DMC costruito con l'utilizzo di *molecular zipper*.

In questi sistemi le interazioni non covalenti vengono stimate sulla base di semplici titolazioni ^1H NMR, tuttavia occorre prestare attenzione interpretazione dei risultati, in modo da considerare tutti i contributi del sistema all'interazione. L'effetto del solvente è di fondamentale importanza nell'interazione tra due residui: a ogni mezzo è associata infatti una costante dielettrica che influisce sulla forza dell'interazione, pertanto la stessa avrà valori diversi in solventi con caratteristiche differenti. L'effetto del solvente però necessita di essere considerato anche nel computo termodinamico del DMC utilizzato: il suo contributo all'energia libera di ogni complesso si esprime infatti come energia libera di solvatazione.

Nel ciclo di figura 1.11 la mutazione del gruppo fenilico di **5** a gruppo terbutilico in **6** determina un cambiamento dell'energia di solvatazione in quanto il gruppo fenilico e terbutilico saranno solvatati in modo differente: questo può essere considerato come un effetto secondario dovuto alla mutazione che non agisce direttamente sull'interazione in esame, ma sull'ambiente che la determina. Tale effetto secondario è parzialmente cancellato nel ciclo a seguito dell'utilizzo della catena n-esilica nei complessi (**5 • 8**) e (**6 •**

8): le molecole di CDCl_3 di solvatazione vengono scalzate dalla coda alchilica che interagisce debolmente con i gruppi terminali in entrambi i complessi. In questo modo l'effetto della desolvatazione viene considerato e l'interazione del complesso **A** viene riferita in effetti a una miscela pseudo-solvente esano- CDCl_3 . Un altro aspetto da tenere in considerazione è la possibile esistenza di diverse conformazioni all'interno dei complessi *zipper* (figura 1.12): a ognuna di esse è associato un diverso valore dell'interazione intermolecolare che dipende dalla posizione spaziale relativa di tutti i gruppi.

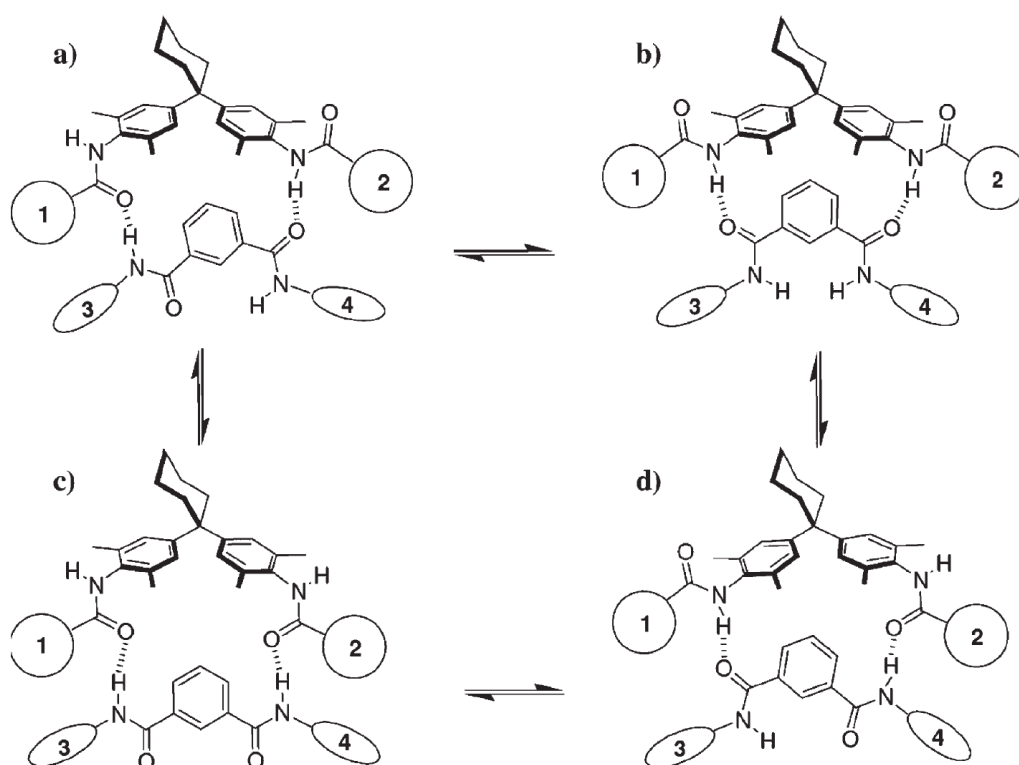


Figura 1.12: Equilibri conformazionali nei complessi *molecular zipper*

Occorre tenere presente che il valore che si ottiene dall'analisi termodinamica proposta nel DMC fornisce l'energia di interazione media pesata di tutte le conformazioni accessibili. Alla luce di queste considerazioni, l'approccio del DMC si presenta come una metodologia robusta per il calcolo delle interazioni non covalenti in soluzione, in grado di tenere conto di tutti i contributi che concorrono a determinare il valore dell'interazione stessa.

Benché i risultati ottenuti con questa metodologia non possano essere direttamente trasferiti dal sistema di studio ad altri tipi di complessi diversi, essa risulta comunque molto utile nello studio nella natura delle interazioni non covalenti. È possibile infatti

eseguire uno studio sistematico dell'interazione non covalente tra due residui al variare delle proprietà chimico-fisiche degli stessi³³ (presenza di gruppi attrattori-donatori, variazione nella polarità, effetti introdotti dall'ingombro sterico) ottenendo importanti informazioni sul meccanismo di interazione e sulla possibile esistenza di effetti cooperativi.³⁴ Il principale vantaggio dell'utilizzo di *molecular zipper* in studi basati su DMC consiste nella facilità in cui i gruppi terminali possono essere mutati: questo ha permesso la loro applicazione nella misura di un ampio spettro di interazioni non covalenti come interazioni catione-anello aromatico,^{35,36} alogeno-anello aromatico,³⁷ anello aromatico-carboidrati,³⁸ interazioni di *stacking* aromatico.³⁹

L'approccio basato sul DMC può essere applicato anche allo studio di sistemi alternativi ai *molecular zipper*: in letteratura è presente lo studio di interazioni non covalenti in sistemi che presentano due diverse conformazioni di *folding*, come piccoli peptidi. Si riporta lo studio di Blasie e Berg⁴⁰ in cui viene misurata l'interazione elettrostatica in un dominio β *sheet* all'interno di un peptide di 26 residui.

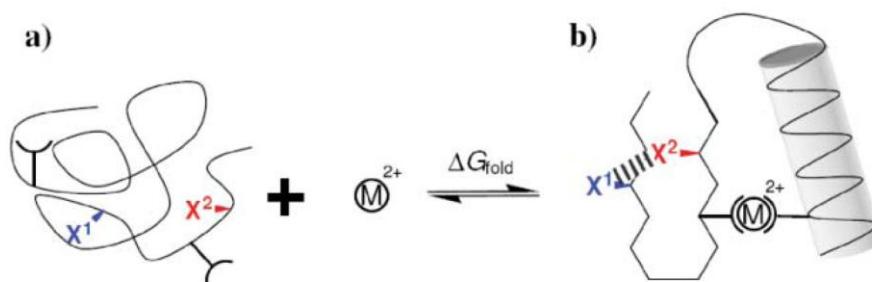


Figura 1.13: Rappresentazione schematica dell'equilibrio di *folding* nel peptide utilizzato da Blasie e Berg. Nello stato di *folding* b) i residui X^1 e X^2 si trovano vicini.

Tale peptide presenta un sito in grado di chelare ioni metallici: in presenza di Zn(II) o Co(II) il peptide adotta una particolare struttura terziaria in cui i residui X^1 e X^2 vengono avvicinati in modo da permettere la formazione di un'interazione non covalente (figura 1.13). In questo modo la mutazione dei residui coinvolti nell'interazione influisce anche sull'evento di *binding* del peptide con lo ione metallico: ne consegue che la misura dell'equilibrio di *folding* in presenza di Zn(II) può essere utilizzata in un DMC per ottenere informazioni sull'interazione tra i residui X^1 e X^2 .

La metodologia può essere estesa a molti sistemi che presentano stati di *folding* definiti, tuttavia l'interpretazione dei risultati ottenuti nei sistemi peptidici risulta spesso di difficile interpretazione a causa del loro elevato grado di flessibilità che influenza in modo importante le interazioni non covalenti in esame. Il valore di energia libera che si ottiene in questi casi è composto da due contributi: il primo riguarda l'interazione non covalente

fra i residui amminoacidici in esame, il secondo deriva dall'energia di desolvatazione. Questi contributi sono intrinsecamente connessi tra loro e pertanto risulta difficile valutarli separatamente.

Un ulteriore esempio dell'utilizzo di DMC per lo studio di interazioni non covalenti riguarda i sistemi denominati “*molecular torsion balances*” sviluppati da Oki e Wilcox^{41, 42, 43, 44} e utilizzati estensivamente anche da altri gruppi in questi tipi di studi.^{45, 46, 47} Questi sistemi possono presentarsi in due stati conformazionali distinti, la cui interconversione è abbastanza lenta da originare due segnali distinti all' NMR (figura 1.14): l'integrazione dei segnali NMR relativi ai due stati fornisce la misura diretta dell'energia di *folding* la quale può essere utilizzata per costruire un DMC.

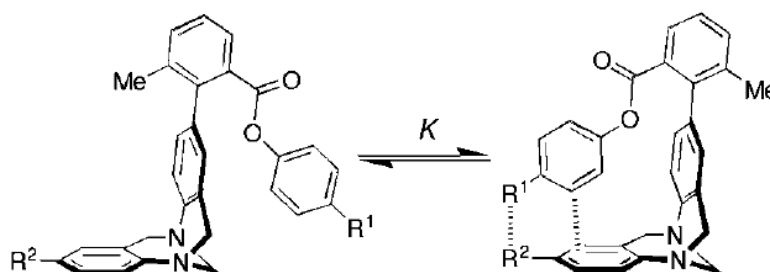


Figura 1.14: *Molecular torsion balances* progettate da Wilcox per gli studi dell'interazione *edge to face*.

Un'interessante applicazione di un DMC basata su questi sistemi è fornito da un lavoro di Diederich e collaboratori.⁴⁷ Il sistema è stato utilizzato per lo studio di interazioni deboli non covalenti tra un fluoruro organico e un'ammide (figura 1.15). L'equilibrio di rotazione nel complesso **A** è controllato sia dall'interazione di interesse sia dall'interazione *edge-to-face* tra di due gruppi aromatici che portano tali sostituenti. Al fine di distinguere l'effetto dei diversi contributi, gli autori propongono uno studio sistematico dell'interazione fluoruro-ammide in tre diversi solventi non polari ottenendo valori compresi tra 0.8 kJ/mol e 1.5 kJ/mol. L'analisi mostra che esiste una correlazione tra la forza dell'interazione *edge-to-face* dei due anelli aromatici misurata in C₆D₆ e le proprietà elettroniche dei sostituenti presenti sugli anelli.

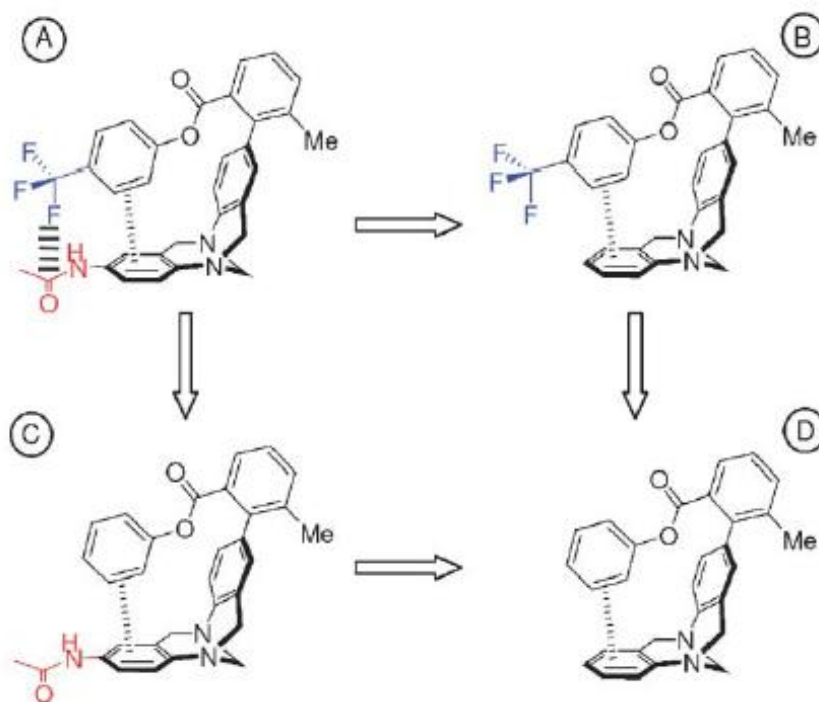


Figura 1.15: DMC di Diederich per la determinazione dell'interazione fluoruro organo-amide.

1.5 Scopo della tesi

Gli esempi presentati nel precedente paragrafo fanno emergere chiaramente l'enorme potenzialità dell'approccio introdotto dal DMC per la misura di interazioni non covalenti in soluzione. Benchè questo costituisca un metodo robusto e semplice per la misura di queste grandezze, la determinazione dei parametri termodinamici necessari alla costruzione dei cicli prevede l'utilizzo di sistemi molecolari molto complessi. Non solo la sintesi dei sistemi basati sui *molecular zipper* o sulle *molecular torsion balances* presenta notevoli difficoltà, ma anche l'ottenimento sperimentale delle grandezze necessarie al calcolo dei parametri termodinamici risulta tutt'altro che semplice.

Lo scopo del mio progetto di Dottorato ha riguardato lo sviluppo di una nuova metodologia per lo studio delle interazioni non covalenti tra gruppi chimici in soluzione che permettesse di ottenere le informazioni necessarie alla costruzione dei cicli in modo semplice e con un ridotto numero di esperimenti. L'attenzione è stata rivolta all'utilizzo di una metodologia che fa uso della chimica covalente dinamica, che costituisce il *background* degli studi svolti nel gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio Dottorato. I

principi proposti nel DMC vengono implementati con l'utilizzo di una metodologia denominata *Dynamic Covalent Capture* (DCC) che è già stata utilizzata in studi precedenti svolti nel gruppo riguardanti il riconoscimento molecolare.

Questa metodologia è stata dapprima proposta per lo studio dell'interazione non covalente tra gruppi chimici in soluzione, successivamente lo studio è stato ampliato alle interazioni non covalenti nello stato di transizione di una reazione modello. Studi di questo tipo rivestono una grande importanza per lo sviluppo di sistemi catalitici, pertanto una metodologia che permetta di ottenere queste informazioni in modo semplice risulta di grande interesse. L'utilizzo della chimica covalente dinamica e in particolare del DCC ha costituito la base degli studi svolti precedentemente all'interno del gruppo di ricerca e ha fornito ottimi risultati nello studio degli eventi di riconoscimento molecolare determinati dalla presenza di interazioni non covalenti anche molto piccole.

Gli ultimi paragrafi di questo capitolo tratteranno i principi di base della chimica covalente dinamica e del DCC, presentando la sua applicazione nella ricerca di sistemi catalitici e discutendo i risultati che hanno portato allo sviluppo del progetto presentato in questo elaborato.

1.6 Chimica Covalente Dinamica

La nascita della chimica covalente dinamica è seguita all'enorme sviluppo avuto dalla chimica supramolecolare negli ultimi anni. In particolare essa si è imposta come metodologia per la sintesi e lo studio delle complesse architetture tipiche della chimica supramolecolare, in quanto gli strumenti forniti dalla tradizionale sintesi organica non si sono rivelati sufficienti a raggiungere i livelli di complessità che caratterizzano questi sistemi.⁴⁸ L'impossibilità di ottenere sistemi supramolecolari attraverso la tradizionale sintesi organica ha portato a riconsiderare il concetto di chimica organica sintetica, e ha stimolato un forte interesse nello studio di legami covalenti che possono essere formati in modo reversibile.

A differenza di quanto avviene nella tradizionale sintesi organica, in cui le reazioni sono svolte sotto controllo cinetico, la Chimica Covalente Dinamica si basa su reazioni reversibili che avvengono sotto controllo termodinamico tra diversi *building block*.⁴⁹ (figura 1.16). Questo implica che la distribuzione dei prodotti ottenuti dalla reazione tra i vari *building block* che compongono il sistema è determinata dalla stabilità

termodinamica relativa dei prodotti formati. Lo svolgimento delle reazioni sotto controllo termodinamico consente al sistema di evitare la produzione delle specie termodinamicamente sfavorite, orientando la sintesi verso la formazione dei prodotti a più bassa energia.^{50,51}

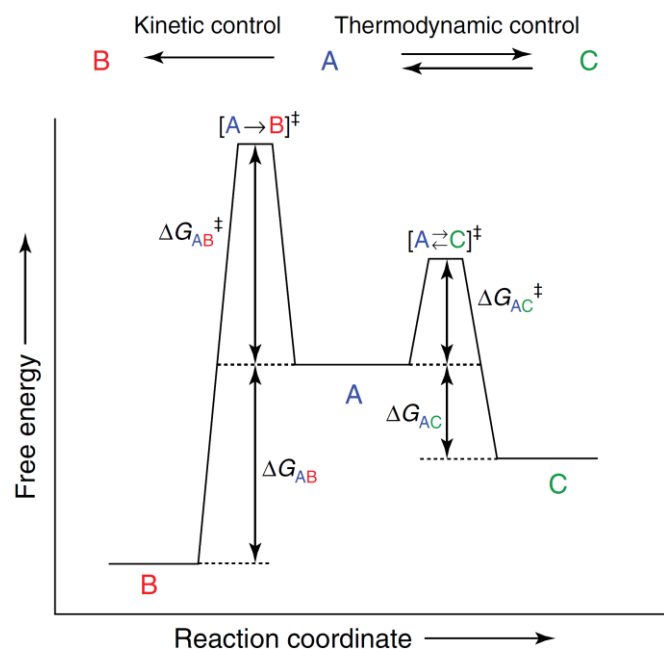


Figura 1.16: Profili di energia libera per reazioni organiche sotto controllo cinetico o termodinamico. In reazioni sotto controllo cinetico è la stabilità dello stato di transizione (ΔG_{AB}^\ddagger) che determina la distribuzione dei prodotti. Per le reazioni sotto controllo termodinamico, la distribuzione dei prodotti è determinata dalla loro stabilità termodinamica (ΔG_{AC}).

La *driving force* che orienta il sistema è costituita dalla presenza di interazioni non covalenti presenti nel prodotto che lo stabilizzano rispetto agli altri componenti. La progettazione dei *bulding block* per la sintesi del prodotto desiderato implica l'utilizzo di tutto lo spettro di interazioni deboli non covalenti che caratterizzano anche i sistemi biologici quali legami idrogeno,⁵² forze di Van der Waals,⁵³ interazioni elettrostatiche,⁵⁴ interazioni idrofobiche.⁵⁵

La Chimica Covalente Dinamica unisce i vantaggi dell'utilizzo di interazioni non covalenti per la sintesi sotto controllo termodinamico con la robustezza fornita dalla formazione di un legame covalente, permettendo la sintesi di complessi stabili che possono essere isolati e caratterizzati.

L'approccio fornito dalla Chimica Covalente Dinamica implica l'utilizzo di una reazione reversibile covalente per la formazione dei prodotti, non tutte le reazioni reversibili però possono essere utilizzate: nella scelta occorre tenere presente alcuni accorgimenti.

i) il raggiungimento dell'equilibrio del sistema deve avvenire in una scala di tempi accettabile: a tal proposito si sono spesso utilizzati catalizzatori o particolari condizioni sperimentali (controllo del pH, solvente, temperatura) per accelerare l'equilibratura.

ii) risulta conveniente l'utilizzo di metodologie in grado di "bloccare" lo scambio nel sistema agendo sull'equilibrio: questo è possibile con la modifica irreversibile del prodotto una volta avvenuta l'equilibratura. In questo ambito l'utilizzo di un catalizzatore per indurre il raggiungimento dell'equilibrio potrebbe rappresentare un vantaggio in quanto l'equilibratura che può essere controllata disattivando il catalizzatore.

iii) le condizioni in cui avviene l'equilibratura devono essere compatibili con l'evento di riconoscimento molecolare: il controllo termodinamico è fornito dalla formazione di una serie di interazioni non covalenti deboli le quali, agendo sull'equilibrio, determinano la formazione preferenziale del prodotto maggiormente stabilizzato. Le condizioni in cui avvengono lo scambio e l'equilibratura devono necessariamente salvaguardare l'esistenza di tale processo, limitando le reazioni utilizzabili a quelle che prevedono condizioni blande.

Una vasta serie di reazioni covalenti reversibili è stata proposta a questo scopo, che includono reazioni di scambio di C=N, scambio di acile, scambio di disolfuro, metatesi olefinica o Diels-Alder;⁵⁶ tuttavia quelle che hanno avuto un maggiore utilizzo sono lo scambio di disolfuro e le reazioni di scambio imminico.

Lo scambio di disolfuro (Figura 1.17a). prevede l'attacco nucleofilo di un anione tiolato a un disolfuro con l'espulsione di un secondo disolfuro.⁵⁷ Il motivo del suo largo utilizzo deriva dal fatto che lo scambio avviene anche in condizioni fisiologiche (ambiente acquoso, pH neutro) e può essere facilmente bloccato da un abbassamento del pH che causa la protonazione dei tiolati a tioli.⁵⁸ Lo scambio imminico prevede l'utilizzo di basi di Schiff⁵⁹ derivate dalla condensazione di un'ammina con un'aldeide/chetone.⁶⁰ (Figura 1.17b). Lo scambio in questo caso è catalizzato dalla presenza di acidi in concentrazione catalitica, per evitare la protonazione delle ammine e il blocco dell'equilibrio. In acqua le immine posseggono una bassa stabilità termodinamica, pertanto in queste condizioni l'utilizzo di più stabili idrazoni o ossime risulta favorito.

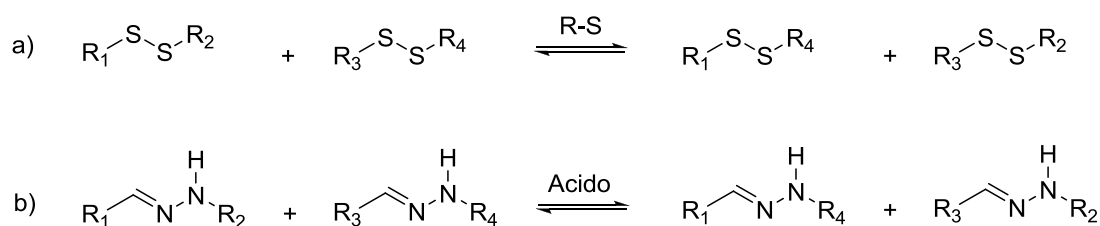


Figura 1.17: Schema di reazione per le reazioni di a) scambio di disolfuro b) scambio di idrazone.

Infine si trovano in letteratura esempi di utilizzo dei legami ammidici per l'utilizzo in sistemi dinamici: questo ambito è di grande interesse in quanto apre la strada alla possibilità di utilizzare librerie peptidiche includendo una vasta diversità strutturale. In questi casi lo scambio è catalizzato dall'utilizzo di enzimi in condizioni non fisiologiche, utilizzando solventi organici⁶¹ o liquidi ionici.⁶²

L'utilizzo di un approccio basato sulla Chimica Covalente Dinamica ha permesso la sintesi di strutture molecolari molto complesse la cui sintesi sarebbe risultata impossibile attraverso metodologie tradizionali. La letteratura che riguarda la sintesi e le applicazioni introdotte da questi sistemi è molto estesa e una descrizione completa di tutti gli esempi di applicazione della Chimica Covalente Dinamica non è inclusa negli scopi di questo elaborato. Importanti esempi sono costituiti dalla sintesi di strutture concatenate quali catenani e rotaxani,^{63,64} sistemi *host-guest* basati sull'utilizzo di cavitandi, criptandi o carcerandi,⁶⁵ capsule molecolari,⁶⁶ sistemi micellari.

Questi numerosi esempi testimoniano come questa disciplina abbia contribuito alla progettazione di sistemi sintetici con proprietà peculiari, con importanti applicazioni in ambito medico biologico per il *drug delivery*, nelle nanotecnologie, nella chimica dei materiali, nel *design* di nuovi recettori, sensori, o di sistemi per il trasporto di molecole attraverso membrane biologiche.

1.7 Dynamic Covalent Capture

Il grande interesse suscitato dalla nascita delle metodologie dinamiche ha ispirato la ricerca verso lo sviluppo di nuove strategie in grado di favorire la formazione di complessi stabili caratterizzati dalla presenza di riconoscimenti molecolari.

Il principale svantaggio nell'utilizzo di interazioni non covalenti per orientare la sintesi reversibile emerge nel momento in cui vengono coinvolte interazioni molto deboli: in

questo caso la stabilità termodinamica relativa di reagenti e prodotti risulta molto simile, pertanto l'equilibrio di formazione del legame covalente tra i *building block* che compongono il sistema favorirà di poco la formazione del prodotto desiderato rispetto ai *building block* non legati. Questo risulta in una bassa resa della reazione reversibile che determina la formazione del prodotto.

La strategia introdotta dal *Dynamic Covalent Capture* (DCC) introduce la possibilità di favorire il riconoscimento molecolare tra le unità del sistema attraverso la formazione di un legame covalente tra i gruppi interagenti, permettendo al sistema di risultare sensibile anche alla presenza di interazioni non covalenti molto deboli.

Questa strategia è largamente impiegata in Natura: molti processi biologici infatti implicano la presenza di un riconoscimento molecolare tra due o più unità, con la possibilità di svolgere correzioni di errori, alterare la reattività di substrati o aumentare la stabilità di determinate strutture. Esempi dell'utilizzo di questa strategia includono la sintesi peptidica da parte dei ribosomi,⁶⁷ la catalisi enzimatica,⁶⁸ e il processo di *folding* proteico.⁶⁹ Gli esempi dell'utilizzo del DCC in ambito biologico sono molto numerosi e hanno ispirato la ricerca verso l'utilizzo della stessa strategia anche in sistemi sintetici.

In questa metodologia un evento di riconoscimento molecolare tra due molecole accompagna la formazione di un legame covalente tra le specie interagenti.⁷⁰ In questo modo la formazione di un complesso non covalente favorisce la formazione del legame covalente rispetto alla reazione bimolecolare di riferimento (Figura 1.18).

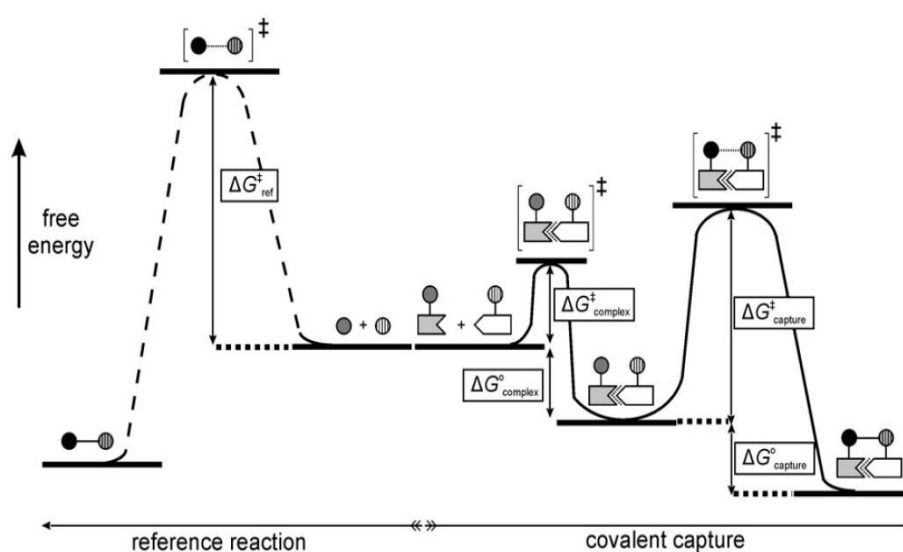


Figura 1.18: Diagramma di energia libera per una reazione in presenza di *covalent capture* (a destra) rispetto alla reazione di formazione di un legame covalente bimolecolare (a sinistra).

L'effetto è simile a quello che si osserva nella formazione di un legame covalente passando da un sistema intermolecolare a un sistema intramolecolare. In altre parole, la formazione del complesso non covalente costituisce la *driving force* per la formazione del legame covalente, di modo che la reazione si svolga in modo pseudo-intramolecolare.

Si distinguono inoltre il *covalent capture* irreversibile o reversibile, a seconda della natura della reazione covalente utilizzata nel processo di *capture* (Figura 1.19). L'approccio utilizzato durante il mio lavoro ha riguardato unicamente l'utilizzo del *covalent capture* reversibile, applicando questa strategia all'interno di un sistema dinamico, in cui diverse specie in grado di dare riconoscimento molecolare sono in competizione tra loro. In tal modo ci si riferisce a questo approccio come *Dynamic Covalent Capture* (DCC).

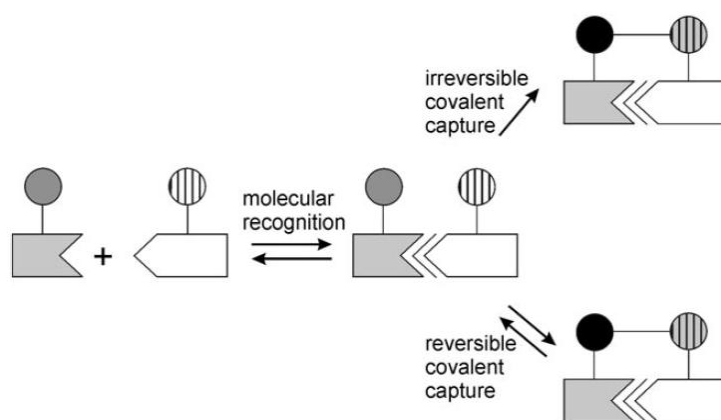


Figura 1.19 : Covalent Capture con formazione di un legame reversibile o irreversibile.

La presenza di un legame reversibile implica che l'intero processo sia sotto controllo termodinamico: in tal modo la distribuzione dei prodotti è determinata unicamente dalla loro stabilità termodinamica relativa. E' possibile sfruttare questo approccio in due diversi regimi sperimentali. Nel primo caso, la formazione del legame covalente è sfruttata con lo scopo di spostare l'equilibrio verso la produzione del complesso non covalente; questo avviene quando $\Delta G^\circ_{\text{complex}}$ è troppo piccolo per poter determinare una quantità rilevabile di complesso non covalente: la formazione di un legame covalente reversibile sposta l'equilibrio in favore della produzione del complesso non covalente pseudo-intramolecolare. Nel secondo caso, il *covalent capture* è utilizzato con lo scopo di valutare le differenze di stabilità tra complessi non covalenti diversi: assumendo che le reazioni covalenti siano tutte isoenergetiche, la distribuzione dei prodotti rifletterà le diverse stabilità termodinamiche dei complessi non covalenti. Il vantaggio del *covalent capture* in questo caso risiede nella possibilità di identificare differenze di energia tra i

complessi non covalenti anche molto piccole, valutabili direttamente dalla distribuzione dei prodotti covalenti ottenuti. Questo è il regime in cui sono stati svolti tutti gli esperimenti presentati all'interno di questo elaborato.

Il concetto di *covalent capture* reversibile è stato utilizzato in molte applicazioni che prevedono l'utilizzo di metodologie dinamiche combinatorie. Un interessante esempio è costituito dalla strategia di *drug discovery* denominata *Tethering*, sviluppata da Erlanson e collaboratori e utilizzata anche in ambito commerciale alla Sunesis Pharmaceuticals.⁷¹

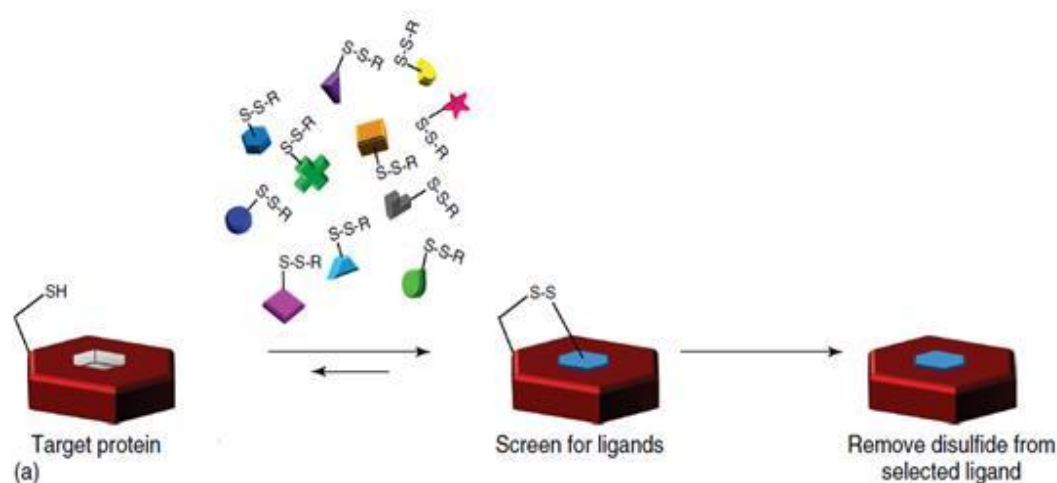


Figura 1.20: Concetto di *Tethering*.

In questo lavoro la reazione covalente reversibile utilizzata è lo scambio disolfuro tra un residuo di cisteina localizzato vicino al sito attivo della proteina e una libreria di potenziali substrati, tutti contenenti un legame disolfuro (Figura 1.20). L'interazione di *binding* tra i membri della libreria e il sito attivo della proteina stabilizza la formazione del legame disolfuro e orienta il sistema verso la produzione della proteina modificata. La distribuzione della libreria all'equilibrio indica quale dei ligandi presenta l'affinità maggiore verso il legame con la proteina: è importante notare come sia l'interazione non covalente tra il substrato e la proteina che determina la distribuzione della libreria all'equilibrio. Il vantaggio di questa tecnica consiste proprio nella possibilità di identificare queste interazioni deboli e utilizzarle per aumentare la sensibilità di *screening*.

Nel 2004 Gellman e collaboratori presentano un'interessante applicazione del DCC applicato allo studio della stabilizzazione delle strutture terziarie nei polipeptidi.⁷²

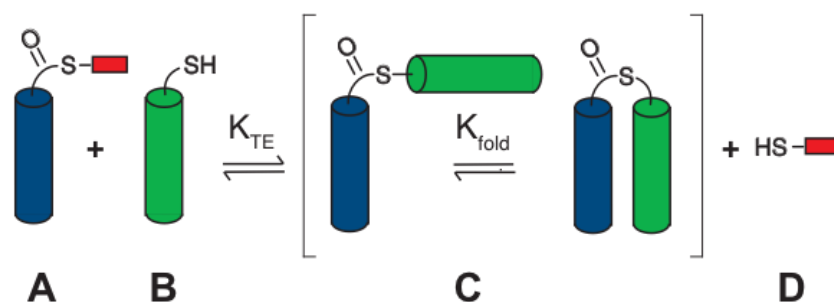


Figura 1.21: Rappresentazione schematica della strategia *Backbone Thioester Exchange*.

In questo approccio denominato *Backbone Thioester Exchange*, gli autori presentano lo studio del polipeptide pancreatico bovino (bPP), un peptide con una struttura tridimensionale ben definita, in cui la parte N-terminale, ripiegata ad α elica, interagisce non covalentemente con la parte C terminale. Il legame ammidico che separa le due regioni, non direttamente coinvolto nell'evento di *binding*, viene sostituito da un legame tioestereo che viene sfruttato per la formazione di una libreria dinamica basata sullo scambio di tioestere (Figura 1.21). Assumendo che il tiolo di riferimento non abbia interazioni con la regione N-terminale e che i legami tioesterei che si formano siano isoenergetici (stesso $\Delta G^\circ_{\text{capture}}$), lo spostamento dell'equilibrio di scambio misurato da K_{TE} è attribuibile all'interazione non covalente tra le due strutture definita da K_{fold} ($\Delta G^\circ_{\text{complex}}$). Questo approccio permette uno studio sistematico degli effetti derivanti dalla modifica di uno o più amminoacidi della catena polipeptidica sulla struttura terziaria.

1.8 DCC per il *design* di catalizzatori

La ricerca di nuovi catalizzatori con l'utilizzo dell'approccio DCC è stata l'oggetto di studio del gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio Dottorato.⁷³ Lo studio ha riguardato la ricerca di unità catalitiche tramite un approccio combinatorio basato sul DCC utilizzando come modello la reazione di transesterificazione di un estere fenilico, il cui meccanismo è rappresentato in figura 1.22.

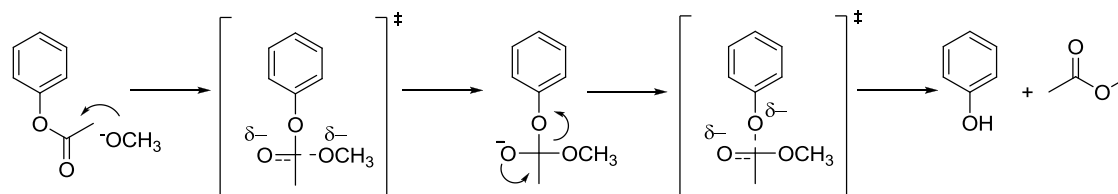


Figura 1.22: Meccanismo della reazione di transesterificazione utilizzata come modello.

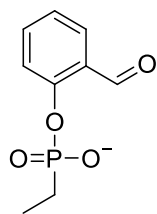


Figura 1.23: Molecola *scaffold* utilizzata negli studi di *screening*

Prendendo spunto dagli studi di *self-selection* di catalizzatori già presenti in letteratura, è stato utilizzato un analogo dello stato di transizione della reazione in esame, proponendolo come *target* all'interno di una libreria combinatoria. La differenza evidente rispetto ai tradizionali studi di *self-selection* presentati nei paragrafi precedenti, ha riguardato l'utilizzo del DCC durante il processo di *screening*. Questa tecnica ha permesso di rivelare differenze di energia di stabilizzazione molto piccole indotte dal riconoscimento molecolare tra il *target* e i membri della libreria, aumentando la sensibilità dello *screening* stesso.⁷⁴

L'utilizzo di una metodologia basata sul DCC prevede la formazione di un complesso non covalente pseudo-intramolecolare che viene successivamente "catturato" dalla formazione di un legame covalente reversibile: a questo scopo è stata progettata una molecola, in seguito denominata *scaffold*, in cui sono presenti sia l'analogo dello stato di transizione (gruppo fosfonato) sia il gruppo chimico necessario per la formazione del legame covalente reversibile (ancora aldeidica, Figura 1.23).

La libreria è costituita da una serie di idrazidi commercialmente disponibili (Figura 1.24 **A-K**) che presentano in catena laterale gruppi che potenzialmente possono interagire con l'analogo dello stato di transizione. Durante il processo di *screening*, i gruppi laterali delle idrazidi della libreria interagiscono con il *target* presente sulla molecola *scaffold*: il processo di *self-selection* è determinato dalla presenza di un riconoscimento molecolare che stabilizza il complesso non covalente, determinando l'amplificazione del componente della libreria maggiormente stabilizzato. L'analisi della miscela di idrazoni all'equilibrio, effettuata sia con tecniche NMR che UV, fornisce informazioni riguardo alla stabilità relativa dei componenti della libreria e quindi sulla stabilizzazione indotta dal riconoscimento molecolare.^{75, 76}

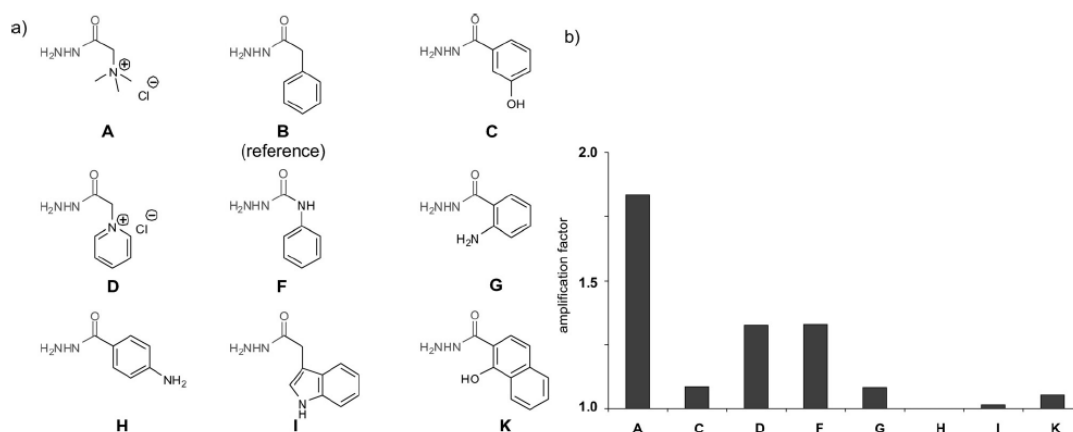


Figura 1.24: a) libreria di idrazidi utilizzata negli studi di *screening*. b) Profilo di amplificazione ottenuto durante gli studi.

Dagli studi di amplificazione è emerso che l'idrazide maggiormente amplificata è quella contenente un gruppo ammonio: in tal caso la stabilizzazione è indotta da un'interazione di tipo elettrostatico tra il gruppo fosfonato, carico negativamente, e il gruppo ammonio, carico positivamente.

Il gruppo selezionato durante lo *screening* è stato utilizzato successivamente in studi cinetici che hanno evidenziato la capacità di accelerare la reazione di transesterificazione. A questo scopo sono state sintetizzate le molecole **9A**, **9B** e **9F** in cui sono presenti gli stessi elementi strutturali utilizzati negli studi di *screening*, poste in prossimità del gruppo estereo (Figura 1.25).

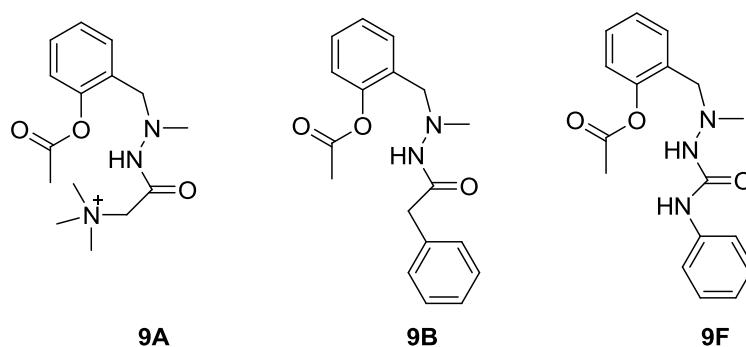


Figura 1.25 : Molecole utilizzate agli esperimenti cinetici.

L'effetto catalitico è stato testato misurando le costanti di pseudo-primo ordine della reazione di transesterificazione con metossido di sodio: questi studi hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione tra l'amplificazione e l'effetto cinetico del gruppo selezionato durante lo *screening*, in particolare la molecola **9A**, in cui è presente il

gruppo ammonio selezionato durante gli esperimenti di *screening* presenta una reattività maggiore rispetto a quella riscontrata per le molecole **9B** e **9F**. Più in dettaglio, l'ordine di reattività segue quello di amplificazione: $k_{\text{obs}}(\mathbf{9A}) > k_{\text{obs}}(\mathbf{9F}) > k_{\text{obs}}(\mathbf{9B})$.

L'effetto osservato è dovuto alla stabilizzazione dello stato di transizione, carico negativamente, da parte del gruppo ammonio tramite catalisi intramolecolare. Occorre evidenziare che le molecole studiate non presentano *turnover* e pertanto non possono essere considerate dei catalizzatori veri e propri; tuttavia questi studi hanno permesso di mostrare come una metodologia di screening combinatorio basata sul DCC possa essere utilizzato in studi di *self-selection* di catalizzatori, permettendo la selezione di unità strutturali in grado di presentare effetto catalitico su una reazione modello.

Lo studio effettuato durante il mio Dottorato parte da questi risultati. Nella prima parte di questo elaborato viene presentata una metodologia per la misurazione di interazioni non covalenti in soluzione basata sull'utilizzo congiunto del DCC e dei DMC descritti nel paragrafo 1.4, concentrandosi sull'interazione non covalente ammonio-fosfonato osservata nei precedenti studi di amplificazione. Successivamente questa metodologia è stata applicata allo studio quantitativo degli effetti di gruppi spettatori sul processo di riconoscimento molecolare: in questo ambito è stata proposta una metodologia basata sul *labelling* ^{13}C che ha permesso l'analisi di una miscela dinamica complessa. Infine, i risultati ottenuti sono stati applicati allo studio dello stato di transizione di una reazione modello, svolgendo uno studio sistematico con lo scopo di valutare le interazioni non covalenti che determinano l'evento catalitico.

1.9 Bibliografia

1. Atkins, P. J., *Physical Chemistry*. 5. ed.; Oxford University Press: Oxford, 1994.
2. Murthy, P., *J. Chem. Ed.* **2006**, 83, 1010-1013.
3. Voet D., V. J. G., *Biochemistry*. 3 ed.; Wiley: New York, 2004; Vol. 1.
4. Jorgensen, W. L., *PNAS* **1993**, 90, 1635-1636.
5. Lehn, J. M., *Science* **2002**, 295, (5564), 2400-2403.
6. Lehn, J. M., *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*. Wiley-VCH: Weinheim, 1995.
7. Anelli, P. L.; Ashton, P. R.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Delgado, M.; Gandolfi, M. T.; Goodnow, T. T.; Kaifer, A. E.; Philp, D., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 193-218.
8. Lehn, J. M., *Angew. Chem. Int. Ed* **1990**, 29, 1304-1319.
9. Riis-Johannessen, T.; Severin, K., *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 8291-8295.
10. Feng, Q.; Park, T. K.; Rebek, J., Jr., *Science* **1992**, 256, 1179-1180.
11. Hardouin-Lerouge, M.; Hudhomme, P.; Sallé, M., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 30-43.
12. Chen, C.-W.; Whitlock, H. W. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4921-4922.
13. Schrader, T., *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1537-1541.
14. Talbiersky, P.; Batskovsky, F.; Klarner, F. G.; Schrader, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9824-9828.
15. Weiss, S. T.; McIntyre, N. R.; McLaughlin, M. L.; Merkler, D. J., *Drug Discovery Today*. **2006**, 11, 819-824.
16. Russel-Seidel, S.; Stang, P. J., *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 972-983.
17. Rebek, J. J., *Angew. Chem. Int. Ed* **2005**, 44, 2068-2078.
18. Corbellini, F.; Knechtel, R. M. A.; Grootenhuis, P. D. J.; Crego-Calama, M.; Reinhoudt, D. N., *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 298-307.
19. Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11408-11409.
20. Ajami, D.; Rebek, J. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15038-15039.
21. Kawano, M.; Kobayashi, Y.; Ozeki, T.; Fujita, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6558-6559.
22. Horovitz, A.; Fersht, A. R., *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 613-617.
23. Carter, P. J.; Winter, G.; Wilkinson, A. J.; Fersht, A. R., *Cell* **1984**, 38, 835-840.
24. Di Cera, E., *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1563-1591.
25. Schreiber, G., *Biomol. Sens.* **2002**, 19-32.

26. Hunter, C. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5310-5324.
27. Aoyama, Y.; Asakawa, M.; Yamagishi, M.; Toi, H.; Ogoshi, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 112, 3145-3151.
28. Aoyama, Y.; Asakawa, M.; Matsui, Y.; Ogoshi, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6233-6240.
29. Bisson, A. P.; Carver, F. J.; Hunter, C. A.; Waltho, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10292-10293.
30. Bisson, A. P.; Carver, F. J.; Eggleston, D. S.; Haltiwanger, R. C.; Hunter, C. A.; Livingstone, D. J.; McCabe, J. F.; Rotger, C.; Rowan, A. E., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8856-8868.
31. Adams, H.; Carver, F. J.; Hunter, C. A.; Morales, J. C.; Seward, E. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1542-1544.
32. Carver, F. J.; Hunter, C. A.; Jones, P. S.; Livingstone, D. J.; McCabe, J. F.; Seward, E. M.; Tiger, P.; Spey, S. E., *Chem.-Eur. J.* **2001**, 7, 4854-4862.
33. Adams, H.; Harris, K. D. M.; Hembury, G. A.; Hunter, C. A.; Livingstone, D. J.; McCabe, J. F., *Chem. Commun.* **1996**, 2531-2532.
34. Hunter, C. A.; Low, C. M. R.; Vinter, J. G.; Zonta, C., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9936-937.
35. Hunter, C. A.; Low, C. M. R.; Rotger, C.; Vinter, J. G.; Zonta, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 4873-4876.
36. Hunter, C. A.; Low, C. M. R.; Rotger, C.; Vinter, J. G.; Zonta, C., *Chem. Commun.* **2003**, 834-835.
37. Adams, H.; Blanco, J. L. J.; Chessari, G.; Hunter, C. A.; Low, C. M. R.; Sanderson, J. M.; Vinter, J. G., *Chem-Eur. J.* **2001**, 7, 3494-3503.
38. Adams, H.; Cockroft, S. L.; Guardigli, C.; Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Spey, S. E.; Urch, C. J.; Ford, R., *ChemBioChem* **2004**, 5, 657-665.
39. Chessari, G.; Hunter, C. A.; Low, C. M. R.; Packer, M. J.; Vinter, J. G.; Zonta, C., *Chem-Eur. J.* **2002**, 8, 2860-2867.
40. Blasie, C. A.; Berg, J. M., *Biochemistry* **1997**, 36, 6218-6222.
41. Oki, M., *Acc. Chem. Res.* **1990**, 357-361.
42. Oki, M.; Nishino, M.; Kaieda, K.; Nakashima, T.; Toyota, S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, 74, 357-361.
43. Paliwal, S.; Geib, S.; Wilcox, C. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 4497-4498.
44. Kim, E.-i.; Paliwal, S.; Wilcox, C. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11192-11193.
45. Gung, B. W.; Xue, X.; Reich, H. J., *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7232-7237.
46. Ren, T.; Jin, Y.; Kim, K. S.; Kim, D. H., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, 15, 401-405.

47. Hof, F.; Scofield, D. M.; Schweizer, W. B.; Diederich, F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5056-5059.
48. Gasparini, G.; Dal Molin, M.; Lovato, A.; Prins, L. J., Dynamic Covalent Chemistry. In *Supramolecular Chemistry: from Molecules to Nanomaterials*, Philip, A. G.; Steed, J. W., Eds. John Wiley & Sons, Ltd.: 2012.
49. Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F., *Angew. Chem. Int. Ed* **2002**, 41, 898-952.
50. Whitesides, G. M.; Simanek, E. E.; Mathias, J. P., *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 37-44.
51. Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M., *Science* **2002**, 295, 2403-2407.
52. Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P., *Angew. Chem. Int. Ed* **2001**, 40, 2382-2426.
53. Leininger, S.; Olenyuk, B.; Stang, P. J., *Chem. Rev.* **2000**, 100, 853-907.
54. Claessens, C. G.; Stoddart, J. F., *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, 10, 254-272.
55. Fuhrhop, A. H.; Wang, T. Y., *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2901-2937.
56. Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S., *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3652-3711.
57. Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., *Chem.-Eur. J.* **2004**, 10, 257-266.
58. Sevier, C. S.; Kaiser, C. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 836-847.
59. Shiff, H., *Ann. Chem. Pharm.* **1864**, 131, 118.
60. Carey, F. A.; Sundberg, R. J., *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanism*. 3. ed.; Plenum Press: New York, 1990.
61. Lee, M. Y.; Dordick, J. S., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 376-384.
62. Sheldon, R., *Chem. Commun.* **2001**, 2399-2407.
63. Shill, G., *Catenanes, Rotaxanes and Knots*. Academic: New York, 1971.
64. Sauvage, J.-P.; Dietrich-Buechecker, C., *Molecular Catenanes, Rotaxanes and Knots*. Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
65. Cram, D. J., *Nature* **1992**, 356, 29-36.
66. Quan, M. L. C.; Cram, D. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2754-2755.
67. Nierhaus, K. H.; Wilson, D. N., *Protein Synthesis and Ribosome Structure*. Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
68. Fersht, A., *Structure and Mechanism in Protein Structure*. 3rd. ed.; Freeman: New York, 1999.
69. Anfinsen, C. B., *Science* **1973**, 181, 223-230.
70. Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed* **2009**, 48, 2288-2306.
71. Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 9367-9372.

72. Woll, M. G.; Gellman, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11172–11174.
73. Gasparini, G. *Sviluppo di catalizzatori mediante Dynamic Covalent Capture*. Università degli Studi di Padova, 2008.
74. Gasparini, G.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed* **2008**, 47, 2475-2479.
75. Gasparini, G.; Vitorge, B.; Scrimin, P.; Jeannerat, D.; Prins, L. J., *Chem. Commun.* **2008**, 3034-3036.
76. Gasparini, G.; Bettin, F.; Scrimin, P.; Prins, L. J., *Angew. Chem. Int. Ed* **2009**, 48, 4546-4550.

2. Studio di interazioni deboli mediante *Dynamic Covalent Capture*

2.1 Introduzione

Nel Capitolo 1 sono stati presentati alcuni esempi utili a chiarire l'importanza delle interazioni deboli nei sistemi biologici e nei sistemi sintetici. La comprensione di questi sistemi e la progettazione di nuove architetture chimiche basate sulla chimica dinamica implica la conoscenza approfondita di tali interazioni: da ciò nasce la necessità di una metodologia semplice che riesca a quantificarle, con lo scopo di ottenere informazioni riguardo la loro natura e di rilevare l'esistenza di eventuali effetti cooperativi.

L'approccio denominato *Double Mutant Cycles* (DMC) si presenta come una metodologia semplice e robusta, in grado di fornire tali informazioni in modo rapido. Esso si basa sulla progettazione di un ciclo termodinamico in cui vengono mutati a uno a uno i residui coinvolti nell'interazione di interesse, sostituendoli con gruppi chimici diversi che non presentano interazioni tra loro. Per ogni complesso mutato viene calcolata l'energia libera, e la sua variazione a seguito della mutazione viene correlata con l'esistenza di un'interazione stabilizzante tra i residui di interesse. Questo metodo, largamente utilizzato in ambito biologico per l'analisi dell'interazione tra residui amminoacidici,¹ può essere applicato anche a complessi sintetici supramolecolari.² Tale metodologia ha permesso lo studio di molti sistemi complessi, rilevando e misurando interazioni non covalenti di diversa natura. Il principale limite consiste nella necessità di progettare e sintetizzare un sistema che permetta di misurare in modo semplice l'energia termodinamica relativa al complesso in esame. Per un approfondimento sui principi e sui limiti di utilizzo di questa metodologia si rimanda al Capitolo 1, paragrafo 1.4.

L'energia termodinamica di un sistema è correlata con il contenuto di energia del sistema stesso: l'energia termodinamica, considerata come energia libera di Gibbs, è alla base delle relazioni che costituiscono la termodinamica e fornisce importanti informazioni riguardo al sistema in esame. Ad esempio la variazione di energia libera che si verifica a seguito di una reazione chimica, definita come $\Delta_r G$, indica se tale reazione ha carattere spontaneo ($\Delta_r G < 0$) o meno ($\Delta_r G > 0$). All'equilibrio, per definizione $\Delta_r G = 0$ e il contenuto energetico del sistema è descritto dall'energia libera di

reazione standard, ΔG° . L'energia libera standard di una reazione all'equilibrio è correlata con la sua composizione all'equilibrio dalla relazione:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{J}) \quad (1)$$

dove K_{eq} , definita come costante di equilibrio termodinamica, definisce la composizione del sistema all'equilibrio. Il valore di ΔG° deriva dalla somma di due contributi, uno entalpico (ΔH°) e uno entropico (ΔS°), secondo la relazione:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{J}) \quad (2)$$

Per gli scopi proposti in questo elaborato ci si è concentrati sullo studio di ΔG° , tralasciando l'analisi dei contributi entropici ed entalpici. Il valore di ΔG° deriva dal bilancio delle energie di formazione standard di reagenti e prodotti: esso risulta costituito dalla somma di molteplici contributi quali l'energia dei legami chimici all'interno delle molecole, gli effetti di solvatazione, le interazioni non covalenti inter e intramolecolari. Di conseguenza, una variazione del contenuto energetico del sistema si riflette necessariamente sulla sua composizione all'equilibrio.

Nell'approccio DMC le variazioni di energia libera relative a ogni complesso mutante vengono correlate con l'esistenza di un'interazione non covalente nel complesso di interesse. Se le condizioni al contorno riguardo alle perturbazioni introdotte vengono rispettate (vedi Capitolo 1, paragrafo 1.2.1), la differenza della variazione di energia che si osserva può essere correlata con l'esistenza di un'interazione non covalente, che viene in tal modo quantificata. Il contenuto energetico di ogni complesso mutante viene valutato servendosi di una reazione di equilibrio specifica, che viene scelta in modo che la misura della composizione della miscela all'equilibrio risulti accessibile sperimentalmente. Negli esempi presentati si utilizzano reazioni di formazione di legami non covalenti con ioni metallici, reazioni di formazione di legami idrogeno,¹ reazioni di *folding* proteico,³ reazioni che prevedono un cambiamento conformazionale come l'equilibrio di rotazione attorno ad un asse molecolare.⁴ In tutti i casi si tratta di reazioni il cui equilibrio è sensibilmente influenzato dall'esistenza dell'interazione in esame e in cui risulta semplice calcolare la composizione all'equilibrio, ad esempio mediante titolazioni UV o NMR. L'utilizzo di tali reazioni pone la necessità di progettare e sintetizzare sistemi molecolari complessi che rendano possibile la misura di tali equilibri, come ad esempio i "molecular zipper" di Hunter⁵ o le "molecular torsion balances" di Wilcox.⁶ La generalità dell'approccio introdotto dai DMC viene perciò fortemente limitata dalla necessità di sintetizzare questi sistemi.

Un metodo conveniente e generale per l'applicazione nelle misure di DMC è fornito dall'approccio introdotto dal *Dynamic Covalent Capture* (DCC):⁷ in questo caso la reazione di equilibrio che viene utilizzata per la misura dell'energia libera relativa a ogni sistema è la reazione di formazione di un legame covalente reversibile, la cui composizione di equilibrio è facilmente valutabile con tecniche NMR, HPLC o UV-Vis. Nell'approccio introdotto dal DCC, la formazione del legame covalente è combinata con la presenza di un riconoscimento molecolare tra le due specie interagenti: questo permette di individuare interazioni covalenti anche molto deboli e pertanto si presta in modo ottimale ad essere utilizzato in studi di interazioni non covalenti basati sul DMC.

In questo capitolo verrà presentato l'utilizzo del DCC in studi di interazioni deboli in soluzione. Questa metodologia verrà applicata allo studio dell'interazione non covalente in un sistema modello già utilizzato in studi precedenti in cui è stata dimostrata in modo indiretto l'esistenza di un riconoscimento molecolare.⁸ I risultati verranno discussi presentando i vantaggi e le limitazioni che questa metodologia comporta in questo tipo di studi.

2.2 Progettazione del sistema

Come già accennato nel Capitolo 1, la metodologia del DCC si basa sulla combinazione di un evento di riconoscimento molecolare tra due specie e la formazione di un legame covalente reversibile tra le due molecole interagenti. La progettazione del sistema prevede innanzitutto la scelta di una reazione reversibile da utilizzare durante questi studi. La scelta si è orientata verso la reazione di scambio di idrazone, rappresentata in figura 2.1.

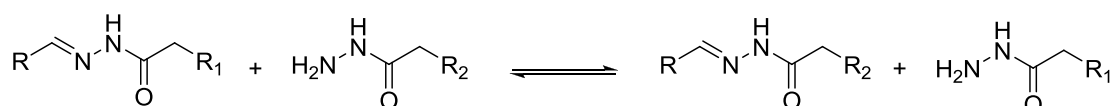


Figura 2.1: Equilibrio di scambio tra idrazoni in presenza di un eccesso di idrazidi

Questa reazione è molto utilizzata in studi di chimica dinamica e prevede l'esistenza di un equilibrio di scambio tra due idrazoni in presenza di un eccesso di idrazidi. Tale scelta è motivata dal fatto che questa reazione è già stata utilizzata in studi precedenti svolti dal gruppo di ricerca che hanno permesso di ottimizzare le condizioni in cui svolgere l'equilibratura: l'esistenza di un equilibrio di scambio è necessaria all'utilizzo del DCC e deve essere assicurata in ogni momento. La reazione di formazione di idrazone è

anch'essa una reazione di equilibrio e avviene facilmente per condensazione di un'aldeide con un'idrazide e formazione di una molecola d'acqua.

Negli studi presentati, per la formazione degli idrazoni sono state utilizzate delle aldeidi aromatiche e una serie di idrazidi commercialmente disponibili. Nelle condizioni utilizzate in questi esperimenti la formazione dell'idrazone è quantitativa e non è necessario ricorrere all'utilizzo di catalizzatori o a metodologie per la rimozione dell'acqua formata dalla reazione (Figura 2.2). Gli idrazoni così formati possono facilmente essere isolati per semplice rimozione dei solventi o per precipitazione.

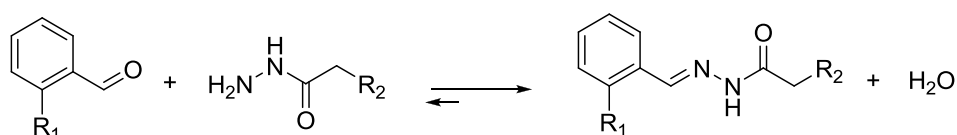


Figura 2.2: Reazione di formazione dell'idrazone. Il riconoscimento molecolare avviene tra i gruppi R_1 e R_2 , mentre il *Covalent Capture* avviene a seguito della formazione del legame imminico.

2.3 Esperimenti di scambio con idrazoni

Le condizioni in cui avvengono gli esperimenti sono state ottimizzate in modo da garantire l'esistenza di uno scambio di idrazoni: questo si verifica utilizzando un eccesso di idrazidi rispetto alla quantità di aldeide. Il raggiungimento dell'equilibrio e la composizione della miscela può essere facilmente determinata tramite spettroscopia ^1H NMR, basandosi sull'integrazione dei segnali relativi alla formazione degli idrazoni (nella zona tra 7 e 9 ppm). Tramite un semplice bilancio di massa è possibile quantificare ogni specie presente nel sistema.

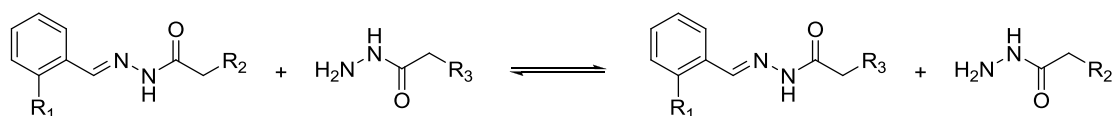


Figura 2.3: Schema della reazione di scambio di idrazone utilizzata negli esperimenti.

Una volta quantificate le specie all'equilibrio risulta semplice calcolare K_{eq} relativa alla reazione in esame, e da questa ottenere il valore di ΔG° .

Affinchè il calcolo risulti corretto, è necessario valutare il raggiungimento dell'equilibrio di scambio: questo è possibile in due modi. Il primo prevede il confronto tra gli spettri ^1H NMR della miscela registrati in tempi diversi: la perfetta sovrapposizione degli spettri

indica che non ci sono cambiamenti nella composizione della miscela e quindi che l'equilibrio è stato raggiunto. Alternativamente il raggiungimento dell'equilibrio è valutato verificando che la composizione finale della miscela fosse indipendente dalla composizione iniziale del sistema. Le condizioni ottimali per il raggiungimento dell'equilibrio sono state studiate precedentemente: i tempi di raggiungimento dell'equilibrio sono variano da qualche ora a più giorni. Per indurre il raggiungimento dell'equilibrio le miscele sono state mantenute a 50°C e la miscela è stata monitorata nell'arco di più giorni.

2.3.1 Double Mutant Cycle con idrazoni

La metodologia DMC è stata applicata allo studio di una interazione non covalente tra due gruppi carichi in soluzione. Le molecole utilizzate negli esperimenti di scambio sono state scelte in modo da poter essere utilizzate in una procedura basata sul DCC. Sono state utilizzate le molecole rappresentate in figura 2.4, già utilizzate in esperimenti svolti

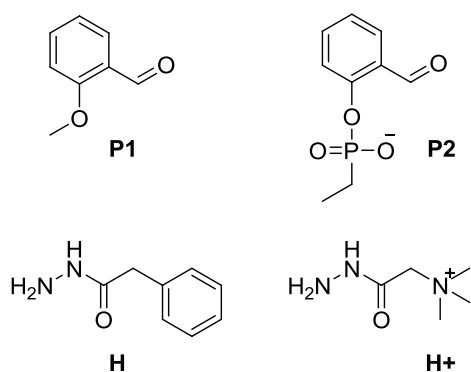


Figura 2.4: Molecole utilizzate durante gli studi di scambio.

precedentemente. Lo scaffold **P2** presenta un gruppo aldeidico, necessario alla formazione dell'idrazone, e in posizione orto il gruppo fosfonato, carico negativamente. Allo stesso modo lo scaffold **P1** (2-metossi benzaldeide) ha le stesse caratteristiche dello scaffold **P2**, ma il gruppo fosfonato viene sostituito da un gruppo metossido. Nel caso di **P2**, il controione relativo al gruppo fosfonato è il tetrabuttilammonio, che è stato scelto per garantire la solubilità del composto in solvente organico, mentre per il gruppo

ammonio in **H+** il controione è cloruro. La natura del controione potrebbe influenzare sensibilmente la forza dell'interazione non covalente, quindi si è scelto di mantenerla costante in tutti gli esperimenti in modo da semplificare lo studio del sistema. Per questioni di chiarezza nella rappresentazione, i controioni vengono omessi nelle figure.

Lo scambio viene effettuato utilizzando una coppia di idrazidi, entrambi disponibili commercialmente, che presentano in catena laterale rispettivamente il gruppo ammonio (**H+**) o il gruppo fenile (**H**). Come già indicato precedentemente, l'evento di riconoscimento avviene tra il gruppo ammonio presente su **H+** e il gruppo fosfonato in **P2**, le specie **P1** e **H** non presentano gruppo in grado di dare riconoscimento molecolare e pertanto vengono utilizzati come riferimento.

Il primo esperimento di scambio viene effettuato tra le idrazidi **H** e **H+** in presenza dello scaffold **P1** (Figura 2.5). La miscela viene preparata in modo che la soluzione finale contenga un eccesso di 5 equivalenti di ciascuna idrazide (25 mM) rispetto alla quantità di aldeide presente (5mM). In queste condizioni l'idrazone viene formato in maniera quantitativa: l'analisi ^1H NMR della miscela mostra la totale scomparsa del segnale relativo all'aldeide dopo poche ore dall'aggiunta. Una volta formati gli idrazoni, avviene la reazione di scambio a causa della presenza di un eccesso delle due idrazidi. L'equilibratura avviene in CD_3OD , mantenendo la soluzione a 50°C per 2 giorni.

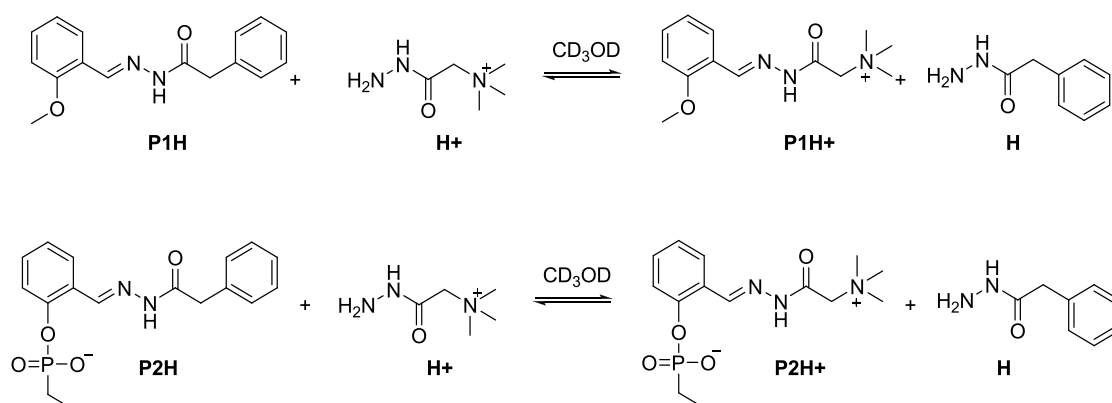


Figura 2.5: Equilibrio di scambio. $[\text{P1}] = [\text{P2}] = 5\text{mM}$, $[\text{H}] = [\text{H+}] = 25\text{mM}$, CD_3OD , 323K .

Il controllo del raggiungimento dell'equilibrio e l'analisi della miscela vengono effettuati tramite spettroscopia ^1H NMR, dall'integrazione dei segnali relativi alle due specie. Occorre notare come ogni idrazone generi un set di due segnali: questi sono relativi a un'isomeria che coinvolge la parte ammidica dell'idrazone; questo aspetto è noto in letteratura e verrà trattato in seguito nel paragrafo 2.4.

L'analisi ^1H NMR della miscela fornisce la quantità relativa dei due idrazoni **P1H** e **P1H+** prodotti, da cui risulta semplice calcolare la quantità di ogni specie coinvolta nello scambio tramite un semplice bilancio di massa. Da questo si può ricavare la costante relativa a questo equilibrio e di conseguenza anche l'energia libera standard relativa alla reazione di scambio, utilizzando le relazioni:

$$K = \frac{[\text{PXH}][\text{H+}]}{[\text{PXH+}][\text{H}]} \quad (2)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (\text{J}) \quad (3)$$

I risultati mostrano che i due idrazoni **P1H** e **P1H+** all'equilibrio sono presenti circa nella stessa quantità (**P1H+** 53%, **P1H** 47%): questo indica che la stabilità delle due specie è simile, infatti il valore della costante di equilibrio risulta praticamente unitario.

Allo stesso modo l'esperimento di scambio è stato effettuato utilizzando lo scaffold **P2** (Figura 2.5). In questo caso si assiste a uno *shift* dell'equilibrio di scambio in favore della formazione dell'idrazone **P2H+** che viene espresso in maggiore quantità all'equilibrio. In particolare risulta che **P2H+** è presente al 67% mentre **P2H** al 33%. Anche in questo caso sono state calcolate la costante relativa all'equilibrio e l'energia libera standard. I risultati vengono riassunti in Tabella 2.1.

Tabella 2.1: Studi di scambio.

PxH + H+ ↔ PxH+ + H		
P_x	K_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
1	1.14	-0.36
2	2.00	-2.10
ΔΔG° (kJ/mol)		-1.75

[P1] = [P2] = 5mM; [H] = [H+] = 25mM; CD₃OD, 323K

Il rapporto tra le costanti relative ai due equilibri che coinvolgono i due scaffold è definito come "fattore di amplificazione" e dà un'indicazione della differenza nella posizione dei due equilibri. Lo *shift* che si osserva nell'equilibrio che coinvolge lo scaffold **P2** è stato attribuito al riconoscimento molecolare tra il gruppo ammonio e il gruppo fosfonato: questa interazione stabilizza la specie **P2H+** a scapito di **P2H** e tale stabilizzazione si riflette sulla composizione della miscela all'equilibrio, descritta da K_{eq}. Questi risultati possono essere combinati per formare un DMC che descriva questa interazione stabilizzante, rappresentato schematicamente in figura 2.6.

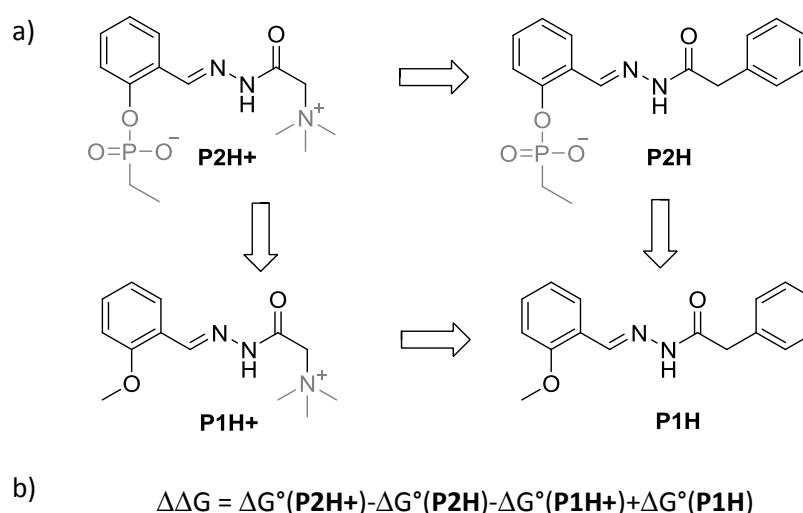


Figura 2.6: a) Schema del DMC utilizzato per la quantificazione dell'interazione ammonio-fosfonato presente nella molecola **P2H+**. In colore diverso si indicano le unità di riconoscimento. b) Espressione utilizzata nel calcolo.

Il valore $\Delta\Delta G$ (figura 2.6b), come per i DMC “classici”, rappresenta l’energia libera relativa all’interazione non covalente presente nella molecola **P2H+**, cioè l’interazione tra ammonio e fosfonato. Questo valore è ottenibile direttamente dagli esperimenti di scambio che coinvolgono i due *scaffold*: in particolare lo scambio tra **P2H+** e **P2H** fornisce la differenza $\Delta G^\circ(\mathbf{P2H+}) - \Delta G^\circ(\mathbf{P2H})$, relativa alla prima riga del ciclo; allo stesso modo il valore $\Delta G^\circ(\mathbf{P1H+}) - \Delta G^\circ(\mathbf{P1H})$ è ricavato direttamente dall’equilibrio che coinvolge **P1H+** e **P1H**. A differenza di quanto avviene nei DMC presentati finora, in cui era necessario calcolare l’energia libera relativa a ogni specie tramite esperimenti di titolazione, questo valore è ottenuto con un unico esperimento di scambio che coinvolge separatamente gli scaffold **P1** e **P2**. Sulla base di queste considerazioni, il valore dell’interazione stabilizzante fosfonato-ammonio presente nella molecola **P2H+** è facilmente ricavabile dalla differenza delle due energie libere ottenute dagli esperimenti di scambio, ottenendo -1.75 kJ/mol ($-2.1 \text{ kJ/mol} - (-0.36 \text{ kJ/mol})$).

Occorre sottolineare che questo non è il valore dell’energia libera relativa alla molecola **P2H+**, bensì il valore dell’energia dell’interazione non covalente ammonio-fosfonato in essa presente. Questa interazione sta alla base dello *shift* che si osserva nell’equilibrio di scambio tra **P2H+** e **P2H** rispetto a quanto avviene per **P1H+** e **P1H**. Il riferimento rispetto a cui questa energia è calcolata è fornita dalla situazione in cui il riconoscimento non è presente, ovvero lo scambio **P1H+** e **P1H**.

2.3.2 Esperimenti di controllo

Affinché il dato ottenuto con questa metodologia sia affidabile, occorre operare alcuni controlli sul sistema. Innanzitutto, le condizioni in cui si svolgono i due equilibri devono essere le stesse: variazioni delle concentrazioni iniziali delle specie, della temperatura o della forza ionica del solvente possono determinare la variazione di K_{eq} influenzando così sul valore di $\Delta\Delta G$. Il rischio che si corre in questo caso è quello di attribuire la variazione di $\Delta\Delta G$ osservata all’esistenza di un’interazione stabilizzante, mentre questa potrebbe invece essere dovuta al cambiamento delle condizioni sperimentali. Per questo motivo è necessario controllare scrupolosamente le condizioni sperimentali in cui avvengono gli equilibri, monitorando tutti i parametri che possono comportare una variazione dell’equilibrio di scambio. Un ulteriore controllo da effettuare riguarda la possibile esistenza di effetti indipendenti dall’interazione intramolecolare che potrebbero favorire intrinsecamente una delle specie dell’equilibrio. Questi effetti potrebbero avere natura diversa, come ad esempio effetti elettronici o di solvatazione, e potrebbero determinare un errore nella valutazione di $\Delta\Delta G$. La presenza di effetti che stabilizzano intrinsecamente una specie rispetto a un’altra non è deducibile dagli esperimenti

effettuati, da cui non è possibile stabilire se la formazione del legame imminico sia intrinsecamente favorita per una delle specie coinvolte nel ciclo, a prescindere dall'esistenza dell'interazione ammonio-fosfonato.

Per questo motivo sono stati considerati gli scaffold **P1p** e **P2p** (figura 2.7a) che presentano la funzione aldeidica in posizione para rispetto al gruppo metossido o fosfonato. In queste molecole la formazione del legame imminico è indipendente dall'evento di riconoscimento molecolare in quanto i gruppi coinvolti non si trovano nella posizione relativa corretta per poter formare un legame imminico una volta avvenuto il riconoscimento molecolare (Figura 2.7b). Gli esperimenti di scambio coinvolgono gli stessi idrazidi **H** e **H+** utilizzati in precedenza, e si svolgono nelle stesse condizioni sperimentali (*scaffold* 5 mM, idrazidi 25 mM ciascuna).

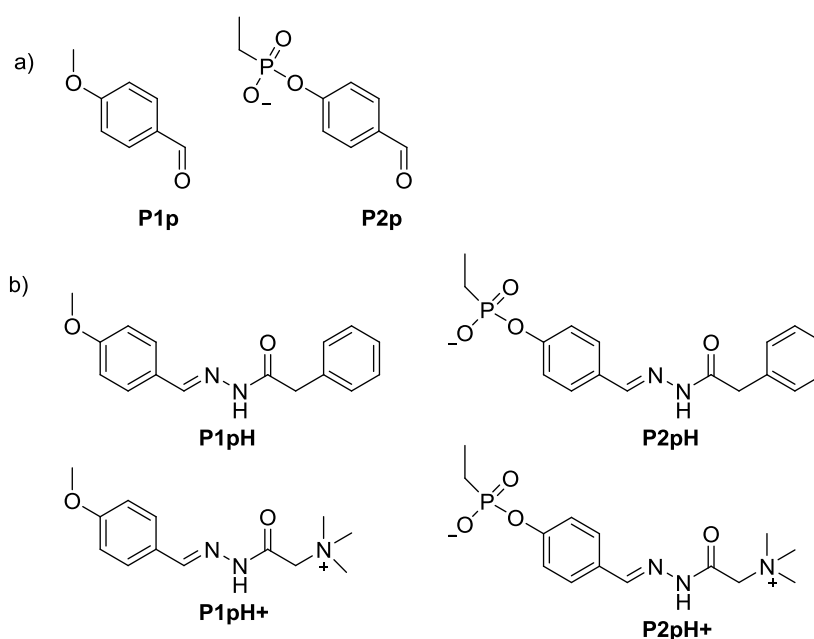


Figura 2.7: Struttura delle molecole utilizzate negli esperimenti di scambio. a) scaffold, b) idrazoni.

Nel caso di **P1p**, la composizione all'equilibrio è stata valutata tramite spettroscopia ^1H NMR, dopo aver valutato il chemical shift relativo all'idrazone **P1pH+** (figura 2.8a). La sintesi dell'idrazone è stata effettuata direttamente nel tubo NMR, in cui sono stati aggiunti lo *scaffold* **P1p** (4-metossi benzaldeide) e l'idrazide **H+** in lieve eccesso, entrambi commercialmente disponibili. La formazione dell'idrazone può essere osservata sia dalla comparsa dei segnali relativi ai protoni imminici (8.16 ppm e 7.92 ppm) che dalla scomparsa del segnale aldeidico (9.84 ppm). Una volta effettuato l'esperimento di scambio nelle condizioni usuali, i segnali relativi agli idrazoni possono facilmente essere

assegnati. L'integrazione dei segnali porta a concludere che all'equilibrio la miscela risulta essere composta per il 55% da **P1pH+** e per il 45% da **P1pH** (Figura 2.8b).

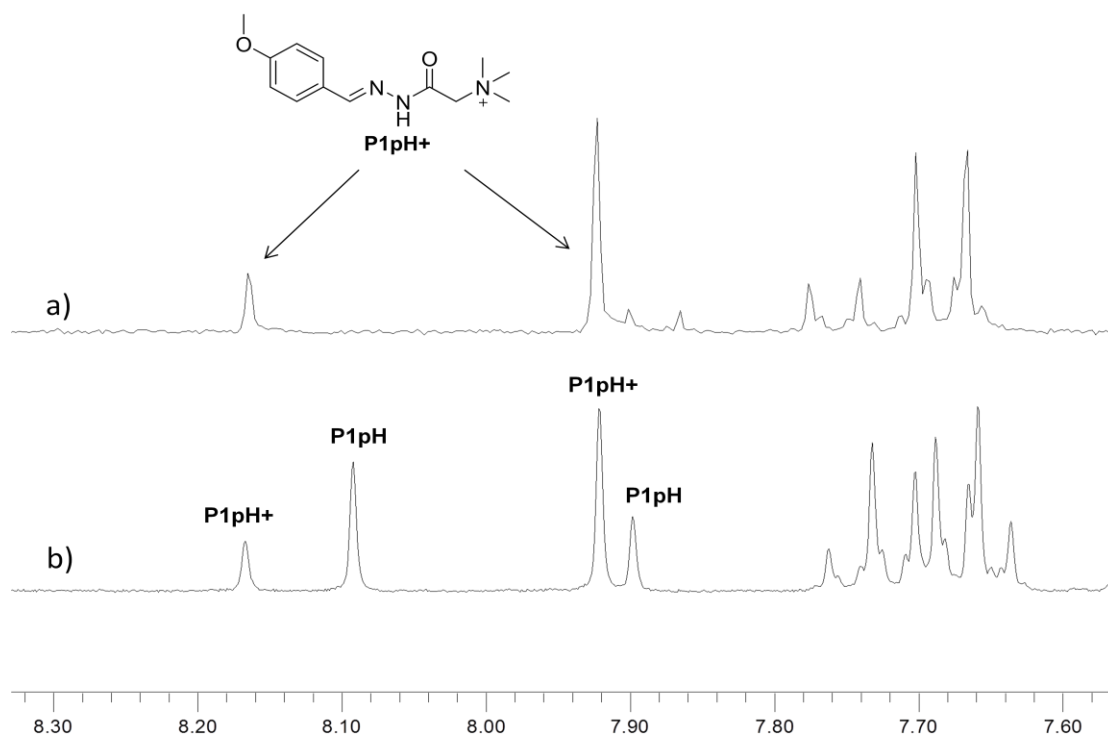


Figura 2.8: Spettri ^1H NMR relativi a) all'idrazone **P1pH+**, b) alla miscela di equilibrio **P1pH/P1pH+**. $[\text{P1p}] = 5\text{mM}$, $[\text{H}] = [\text{H}^+] = 25\text{mM}$, CD_3OD , 323K.

La stessa valutazione è stata effettuata per lo scaffold **P2p**: in questo caso gli spettri ^1H NMR degli idrazoni puri mostrando un *overlap* di segnali che non permette la valutazione accurata della miscela con questa tecnica (Figura 2.9).

Si è deciso di valutare la composizione all'equilibrio tramite HPLC, dopo aver verificato che i tempi di ritenzione delle due specie siano sufficientemente diversi (8.9 min per **P2pH+** e 13.3 min per **P2pH**). La calibrazione è stata effettuata su entrambi gli idrazoni **P2pH** e **P2pH+** in un *range* compreso tra 1 mM e 5 mM, valutando l'intensità del segnale a 280 nm. Anche in questo caso non è stato necessario isolare gli idrazoni puri: la reazione è stata eseguita direttamente in *vial* utilizzando un eccesso di idrazidi rispetto allo *scaffold* e valutando la formazione degli idrazoni corrispondenti tramite ESI-MS.

L'esperimento di scambio è stato effettuato utilizzando le stesse condizioni utilizzate in precedenza (MeOH, 50°C, 2 giorni); la composizione della miscela all'equilibrio è facilmente valutabile dall'integrazione dei picchi relativi alle due specie, utilizzando le curve di calibrazione dei composti puri.

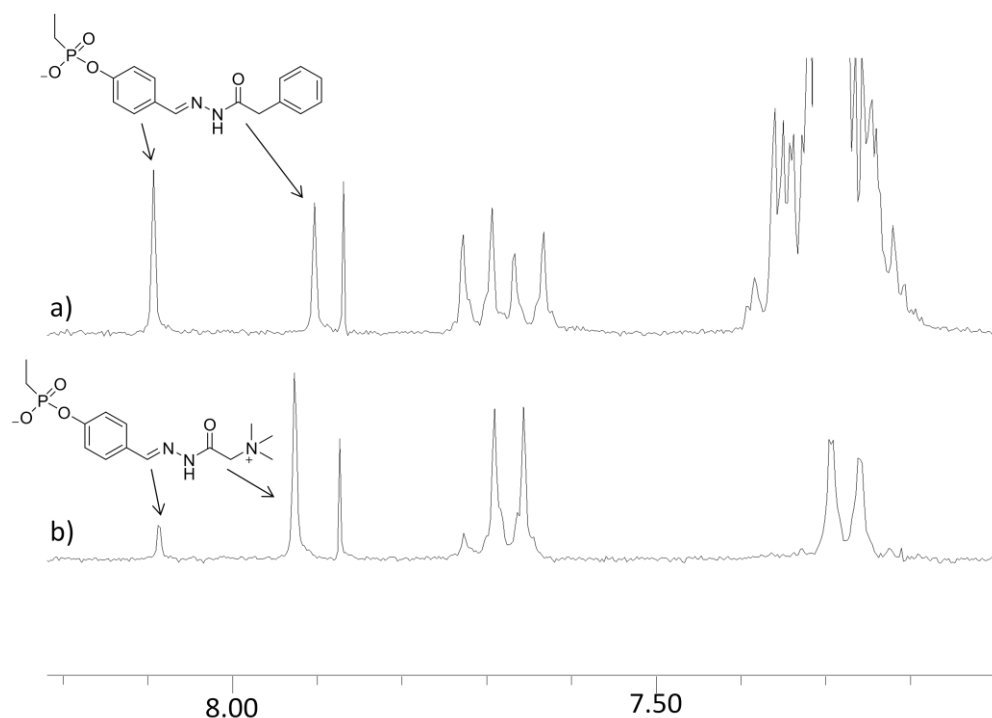


Figura 2.9: Spettri ^1H NMR (250 MHz, CD_3OD) relativi agli idrazoni **P2pH** e **P2pH+**. a) $[\text{P2p}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{H}] = 25 \text{ mM}$; b) $[\text{P2p}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{H}^+] = 25 \text{ mM}$.

Si ottiene un rapporto all'equilibrio di 58% per **P2pH+** e di 42% per **P2pH**. Questi risultati vanno confrontati con quelli ottenuti dallo scambio in presenza di **P1p**. La Tabella 2.2 mostra il riassunto dei risultati relativi agli equilibri che coinvolgono **P1p** e **P2p**.

Tabella 2.2: Studi di scambio.

Pxp	PxpH + H\leftrightarrow PxpH$^+$ + H	
	K_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
1	1.23	-0.54
2	1.38 ^a	-0.87
$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)		-0.33

$[\text{P1p}] = 5 \text{ mM}$; $[\text{H}] = [\text{H}^+] = 25 \text{ mM}$; CD_3OD , 323K. a) $[\text{P2p}] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{H}] = [\text{H}^+] = 12.5 \text{ mM}$, analisi svolta con HPLC.

I risultati mostrano come entrambi gli equilibri presentino un valore di K_{eq} confrontabile, si osserva solo un piccolo *shift* dell'equilibrio che favorisce **P2pH+**, corrispondente a una stabilizzazione di -0.33 kJ/mol rispetto all'equilibrio di riferimento tra **P1pH** e **P1pH+**. Questo effetto può essere ricondotto a un bilancio di contributi diversi dal riconoscimento molecolare che favoriscono **P2pH+** rispetto a **P2pH** (effetti elettronici, sterici, di solvatazione, forza ionica del solvente...); tale valore è comunque decisamente inferiore a quello che si osserva con **P2H+**, in cui l'energia di stabilizzazione è stata quantificata in 1.75 kJ/mol (vedi Tabella 2.1). Questo esperimento è in accordo con l'ipotesi secondo cui la stabilizzazione osservata per il composto **P2H+** rispetto a **P2H** ha origine da

un'interazione intramolecolare non covalente che coinvolge i gruppi ammonio e fosfonato, mentre gli eventuali contributi derivanti da altri fattori di stabilizzazione (quantificati in 0.33 kJ/mol) possono essere considerati minoritari.

2.4 Isomeria degli idrazoni

La razionalizzazione dei risultati ottenuti durante gli esperimenti di scambio prevede uno studio approfondito della struttura degli idrazoni utilizzati durante questi studi: il riconoscimento molecolare che caratterizza questi sistemi infatti dipende fortemente dalla posizione relativa e dalla distanza dei gruppi interagenti. Di conseguenza è necessario analizzare in dettaglio la struttura dello *spacer* dell'idrazone per valutare in modo corretto tali effetti. La struttura degli idrazoni utilizzati presenta una certa rigidità conformazionale dovuta alla presenza di una struttura di risonanza che coinvolge tre legami lungo la molecola: il legame imminico C=N, il legame N-N e il legame ammidico N-C=O. La presenza di un'estesa risonanza lungo questi legami impedisce la loro libera rotazione attorno all'asse, determinando la presenza di un'isomeria cis-trans.⁹ In principio, l'isomeria lungo questi tre legami determina la potenziale presenza di 8 isomeri diversi, in realtà solo 2 di questi sono effettivamente presenti in soluzione. Studi effettuati tramite spettroscopia NMR presenti in letteratura effettuati su molecole molto simili attribuiscono tale isomeria al legame ammidico, il quale è presente in conformazione E o Z.¹⁰ Al contrario gli altri due legami si presentano sempre in conformazione E, dato che l'isomero Z è sfavorito da impedimenti sterici. Ne risulta che gli isomeri presenti in soluzione hanno configurazione EEE o EEZ (Figura 2.10).

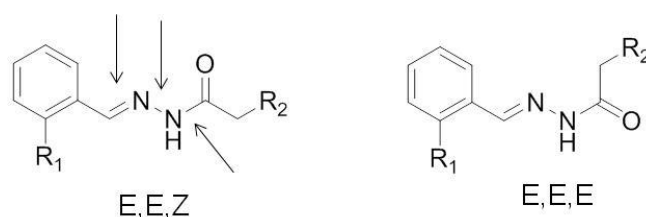


Figura 2.10 : Isomeria relativa alla parte ammidica degli idrazoni.

L'equilibrio di scambio dei due isomeri è sufficientemente lento da poter essere osservato tramite ¹H NMR: queste molecole infatti generano un *set* di due segnali distinti, il cui rapporto riflette la loro quantità relativa in soluzione. La natura di tale isomeria non è del tutto chiarita ed è ancora oggetto di studio da parte di diversi gruppi: il rapporto isomerico è fortemente influenzato dalla presenza di un metilene in α rispetto al

C carbonilico dell'idrazone, dalla natura del gruppo R_2 e dal solvente, mentre la natura del gruppo R_1 non mostra avere nessun effetto.¹¹ La figura 2.11 mostra a titolo di esempio gli spettri ^1H NMR relativi alle molecole **P1H**, **P1H+**, **P2H** e **P2H+**, concentrandosi sulla zona 7.5-8.5 ppm in cui risuonano i protoni imminici. E' possibile osservare come la presenza di due isomeri generi in tutte le molecole un *set* di due segnali sia per il protone imminico (circa a 8.5 ppm) sia per il protone aromatico in orto al legame imminico (circa 8.0 ppm). Le molecole **P1H** e **P2H** mantengono lo stesso rapporto isomerico (circa 60-40), lo stesso avviene per la coppia **P1H+** e **P2H+** (circa 20-80), confermando che la natura del gruppo R_1 non influisce sul rapporto isomerico. La stessa isomeria si riscontra anche negli idrazoni in cui il gruppo R_1 è presente in para rispetto al legame imminico (**P1pH**, **P1pH+**, **P2pH**, **P2pH+**). Anche in questo caso il rapporto isomerico è mantenuto identico e non dipende da R_1 .

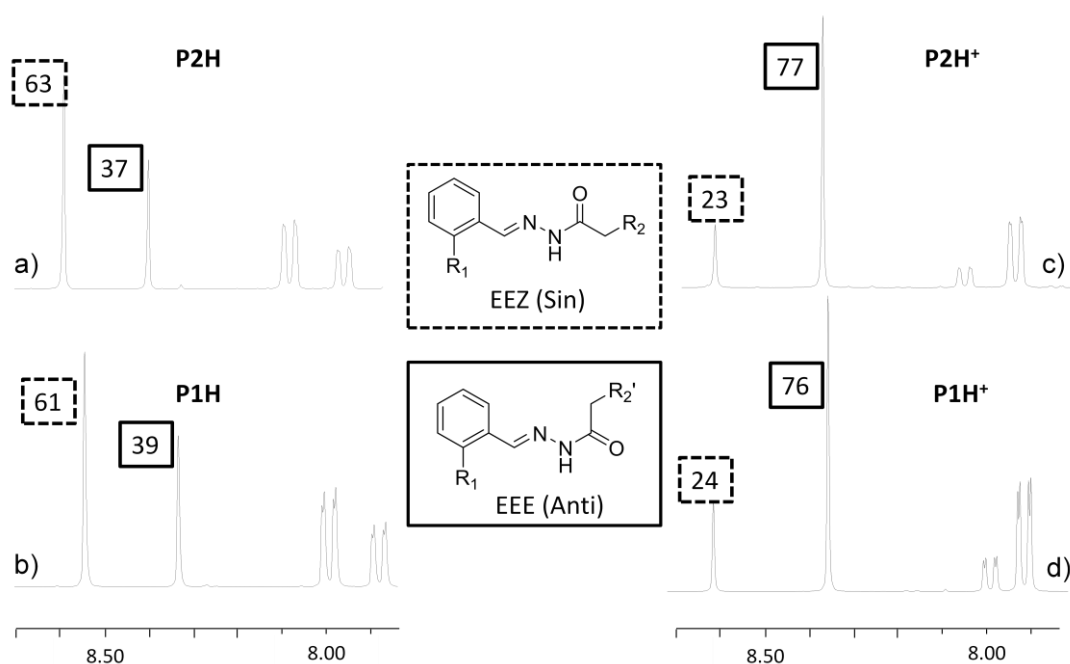


Figura 2.11: Spettri ^1H NMR, CD_3OD , 323K relativa alle molecole a) **P2H**; b) **P1H**; c) **P2H+**, d) **P1H+**. Sugli spettri viene indicato il rapporto isomerico.

L'assegnazione dei segnali ai relativi isomeri è stata effettuata sulla base di lavori presenti in letteratura su acilidrazoni molto simili a quelli utilizzati per questo progetto. Nel lavoro di Syakaev¹² del 2006 la struttura di queste molecole viene elucidata utilizzando spettri 1D (^1H e ^{13}C) e 2D-NMR, valutando in particolare la costante di accoppiamento J tra il C etilenico e il protone imminico che risulta essere molto diversa nei due isomeri (figura 2.12). Questi esperimenti hanno permesso di stabilire che il segnale imminico che risuona a campi più bassi appartiene all'isomero EEZ.

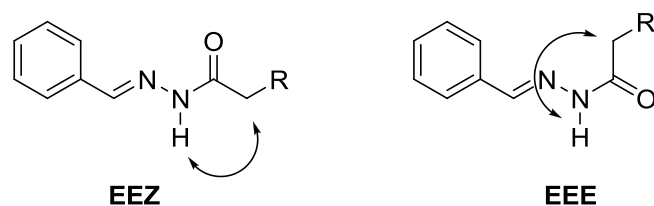


Figura 2.12: Accoppiamento J C-H nei due isomeri.

Le strutture dei due isomeri mostrano chiaramente che le posizioni relative dei gruppi interagenti R_1 e R_2 sono nettamente diverse nei due casi: è pertanto probabile che nei due isomeri **P2H+** (EEZ) e **P2H+** (EEE) la forza dell'interazione elettrostatica ammonio-fosfonato sia differente. Questo fatto complica notevolmente la razionalizzazione dei risultati ottenuti dagli esperimenti di scambio, dato che l'interazione che è alla base del riconoscimento dipende fortemente dalla posizione relativa dei due gruppi coinvolti.

Gli esperimenti di scambio mostrano che la presenza di un riconoscimento molecolare non varia il rapporto isomerico presente nelle molecole: questo effetto è da sottolineare soprattutto nel caso delle specie derivate dall'idrazide **H+** in cui il riconoscimento indotto dalla presenza del gruppo fosfonato non varia il rapporto isomerico, che rimane 20:80 cis/trans per entrambe le specie **P1H+** e **P2H+**. Si possono fare due ipotesi riguardo la scarsa influenza del riconoscimento molecolare sull'isomeria:

i) i due isomeri non si trovano in equilibrio tra loro e la loro distribuzione è determinata dalla loro cinetica di formazione;

ii) l'effetto indotto dal riconoscimento sull'isomeria è troppo piccolo per essere osservato.

La situazione descritta dal caso i) si verifica quando le energie di attivazione relative allo scambio isomerico sono troppo elevate per poter permettere l'instaurarsi di un equilibrio. Questo non sembra essere il caso del nostro sistema: esperimenti presenti in letteratura in cui il processo di isomerizzazione in condizioni simili è studiato tramite ^1H NMR al variare della temperatura, riportano per questi sistemi in una barriera di circa 78 kJ/mol.¹² Nel caso ii) la presenza di un'interazione intramolecolare sposta di poco l'equilibrio relativo all'isomeria, pertanto essa non può essere osservata negli esperimenti di scambio. Questo caso si verifica dal momento in cui viene studiato lo *shift* di un equilibrio che risulta già molto spostato verso una delle due specie: confrontando due equilibri descritti dalle costanti K_1 e K_2 , a parità di rapporto di amplificazione (K_2/K_1), la differenza numerica tra le costanti di equilibrio K_2 e K_1 misurata attraverso l'integrazione dei picchi NMR risulta maggiore quando il valore di K_1 è vicino a 1. Ad

esempio, partendo da una miscela i cui componenti sono presenti in rapporto 50:50 ($K_1 = 1$), per ottenere un rapporto di amplificazione pari a 1.5 si deve osservare uno *shift* che porti la miscela a un rapporto 60:40 ($K_2 = 1.5$); mentre se il rapporto iniziale delle specie risulta già 80:20 ($K_1 = 4$), lo stesso rapporto di amplificazione verrà osservato per una miscela 86:14 ($K_2 = 6.14$). Tale differenza diventa ancora più evidente se si considerano i valori di $\Delta\Delta G$, che presenta una dipendenza logaritmica dal rapporto di amplificazione:

$$\Delta\Delta G = -RT \ln \frac{K_2}{K_1} \quad (4)$$

In questo modo il $\Delta\Delta G$ associato a uno *shift* che porti le composizioni da 80:20 a 85:15 è significativamente maggiore di quello necessario per determinare uno *shift* da 50:50 a 55:45. E quindi possibile che lo *shift* indotto dalla presenza del riconoscimento molecolare non sia sufficiente a determinare un cambiamento di composizione di una miscela presente già in rapporto 80:20, che risulti rilevabile con la tecnica utilizzata.

Sono stati effettuati studi ulteriori che permettessero di chiarire la struttura in soluzione di queste molecole. è stata considerata la rotazione attorno al legame $C_{\text{aromatico}}-C_{\text{imminico}}$ che porta i due gruppi R_1 e R_2 a trovarsi in posizioni relative molto diverse, come evidenziato in figura 2.13.

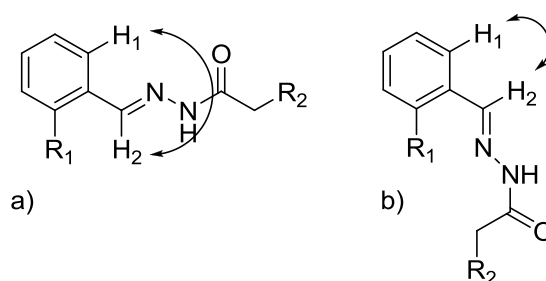


Figura 2.13 : rotazione del legame $C_{\text{aromatico}} - C_{\text{imminico}}$ e indicazione dei contatti NOE

La posizione relativa del sistema coniugato dell'idrazone rispetto a R_1 può essere valutata da esperimenti NOE che possono evidenziare l'eventuale contatto tra i due protoni H_1 e H_2 . Gli spettri NOE eseguiti sugli idrazoni **P1H**, **P2H**, **P1H+** e **P2H+** hanno mostrato un contatto NOE compatibile con una forma estesa, come rappresentato in figura 12.2 a, in cui i due protoni H_1 e H_2 si trovano alla massima distanza. Questa osservazione porta a concludere che la rotazione attorno al legame $C_{\text{aromatico}} - C_{\text{imminico}}$ sia in qualche modo impedita: è probabile che questo effetto derivi l'ingombro sterico introdotto dalla presenza del gruppo R_1 .

2.5 Esperimenti di scambio tra immine

Una volta determinata la validità del metodo basato sul DCC per la misura di interazioni non covalenti, è stato svolto uno studio sistematico dell'interazione non covalente ammonio-fosfonato presente in altre molecole simili agli idrazoni già utilizzati. In questo modo è possibile ottenere informazioni circa la natura di questa interazione, determinando gli effetti che possono influenzare il riconoscimento e la formazione del

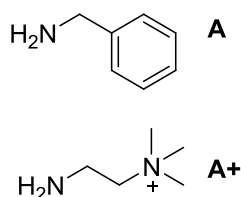


Figura 2.14: ammine utilizzate negli esperimenti di scambio.

legame covalente relativo al *Covalent Capture*. In prima battuta si è deciso di effettuare lo scambio utilizzando ammine anziché idrazidi, di modo da poter utilizzare la reazione reversibile di scambio di ammina. Questa reazione, anch'essa largamente utilizzata nell'ambito della chimica covalente reversibile,¹³ presenta evidenti somiglianze con la reazione di scambio di idrazone utilizzata in precedenza. Una volta stabilite le condizioni

ottimali per far avvenire lo scambio con idrazoni, si utilizzando le stesse per effettuare lo scambio tra immine. Anche in questo caso l'analisi della miscela all'equilibrio è stata valutata con ¹H NMR; a differenza di quanto avviene per gli idrazoni, le immine non presentano l'isomeria che si riscontra con gli idrazoni, limitando gli effetti di *overlap* e facilitando in tal modo l'analisi all'equilibrio.

2.5.1 DMC con immine

Gli esperimenti di scambio sono stati svolti utilizzando le stesse molecole scaffold **P1** e **P2** già utilizzate in precedenza, mentre per lo scambio sono state utilizzate le ammine **A** e **A+**, in figura 2.14. Entrambe sono commercialmente disponibili, tuttavia l'ammina **A+** è venduta come sale cloridrato pertanto è necessario trattarla con 1 equivalente di base (NaOH) al fine di liberare la funzione amminica. L'ammina così ottenuta si presenta come un solido bianco fortemente igroscopico e deve essere preparata di fresco e conservata in atmosfera inerte. Questo passaggio è necessario per permettere la formazione dell'immina corrispondente in quanto l'ammina presente come sale cloridrato non reagisce con l'aldeide.

Gli esperimenti di scambio sono stati svolti nelle stesse condizioni utilizzate per gli idrazoni (scaffold 5 mM, ammine 25 mM ciascuna, CD₃OD, 2 giorni, 323K). Il ciclo termodinamico relativo al DMC è rappresentato in figura 2.15.

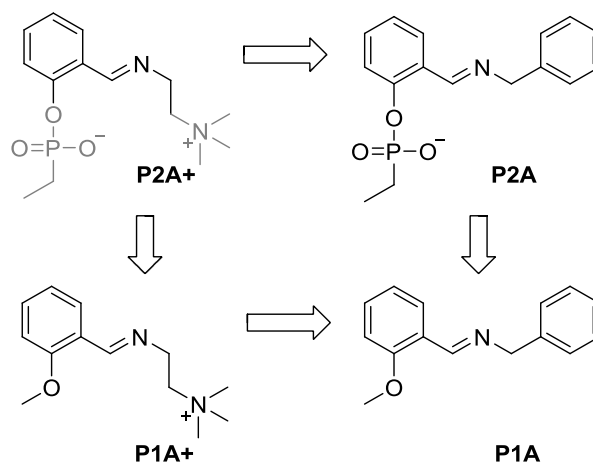


Figura 2.15: DMC relativo all'interazione ammonio-fosfonato nel composto **P2A+**.

Analogamente a quanto osservato per l'idrazone **P2H+**, anche in questo caso la formazione di **P2A+** avviene in maniera preferenziale rispetto a **P2A**. Come in precedenza, lo *shift* è attribuibile all'interazione non covalente ammonio-fosfonato. La tabella 2.3 mostra i risultati ottenuti.

Tabella 2.3: Studi di scambio.

Px	PxA + A+ ↔ PxA+ + A	
	K_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
1	0.96	0.11
2	2.12	-2.24
$\Delta\Delta G^\circ$ kJ/mol		-2.35

[P1] = [P2] = 5mM; [A]=[A+]=25mM; CD₃OD, 323K

Risulta immediatamente evidente come in questo caso il valore dell'interazione elettrostatica risulti maggiore rispetto a quanto ottenuto per l'idrazone **P2H+**. La differenza è dovuta al cambiamento nella natura dello *spacer* tra le due cariche che, rispetto all'idrazone, risulta più corto e più flessibile. L'aumento di flessibilità dello *spacer* tra le unità di riconoscimento porta a due effetti:

- la formazione del legame non covalente porta a una diminuzione dell'entropia a seguito di una diminuzione della libertà conformazionale della specie;
- la flessibilità introdotta dallo *spacer* alchilico porta i due gruppi interagenti a trovarsi più vicini nello spazio, di modo da interagire maggiormente aumentando il guadagno

entalpico associato alla reazione. Il valore dell'interazione non covalente in **P2A+** risulta 2.35 kJ/mol, ovvero 0.6 kJ/mol superiore al valore della stessa interazione in **P2H+**: questo porta a considerare che l'effetto entalpico (favorevole) sia predominante rispetto a quello entropico (presumibilmente sfavorevole).

2.6 Esperimenti di scambio idrazoni/immine

Gli esperimenti precedenti hanno evidenziato una differenza tra l'interazione elettrostatica stabilizzante nelle ammine rispetto a quanto avviene negli idrazoni. Al fine di chiarire ulteriormente l'origine di questa differenza, sono stati progettati dei DMC che prendessero in esame lo scambio misto tra ammine e idrazidi. Scegliendo nel modo opportuno i gruppi interagenti da esaminare e le molecole da utilizzare come riferimento, è possibile individuare contributi ulteriori al riconoscimento molecolare diversi da quello elettrostatico tra ammonio e fosfonato.

Un'analisi di questo tipo prevede la misura dell'equilibrio di scambio misto tra immine e idrazoni. La stabilità intrinseca di queste specie risulta molto diversa, in particolare le immine si dimostrano termodinamicamente molto meno stabili dei corrispondenti idrazoni: occorre tenere conto di tale differenza una volta che si progetta l'esperimento di scambio.¹⁴ Utilizzando infatti quantità equimolari di idrazide e ammina, all'equilibrio si assiste alla formazione esclusiva dell'idrazone a scapito dell'immina. In queste condizioni il sistema è ancora all'equilibrio dinamico: idealmente la formazione dell'immina è possibile, ma essa non viene prodotta in quantità tali da non essere individuabile con le tecniche analitiche utilizzate. Inoltre un equilibrio troppo spostato in favore di uno dei membri introduce una fonte di errore notevole nel calcolo dell'interazione non covalente tramite DMC in quanto le variazioni della composizione dell'equilibrio a seguito della mutazione risultano troppo piccole per poter essere misurate in modo affidabile. Per ovviare a questo problema occorre lavorare in condizioni tali da favorire la formazione di immina rispetto all'idrazone utilizzando nello scambio un eccesso di ammina superiore a quello di idrazide. Ne consegue che un monitoraggio accurato delle condizioni sperimentali risulta indispensabile per effettuare questi esperimenti.

2.6.1 Esperimenti di scambio H+/A

In primo luogo è stata valutato l'eccesso di ammina da utilizzare necessario per poter ottenere una quantità misurabile di immina rispetto all'idrazone. A questo scopo è stata preparata una miscela contenente lo scaffold **P1** in concentrazione 5 mM, l'idrazide **H+** 5mM e l'ammina **A** in concentrazioni variabili tra 10 equivalenti e 50 equivalenti (50-250 mM). È stato valutato il rapporto all'equilibrio tra l'immina **P1A** e l'idrazone **P1H+**, presente in due isomeri. I risultati sono riportati in figura 2.15 che mostra gli spettri delle miscele all'equilibrio: si nota un aumento del segnale a 8.86 ppm relativo all'immina rispetto all'idrazone (8.62 e 8.38 ppm) all'aumentare della concentrazione di ammina **A** aggiunta.

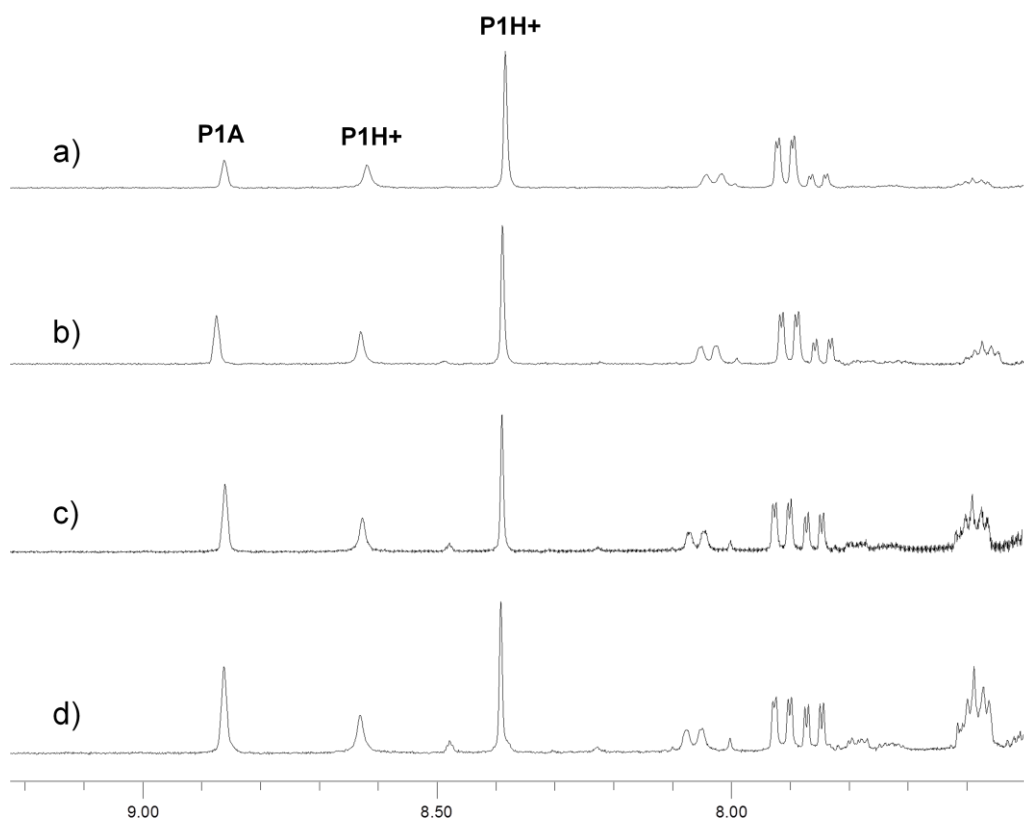


Figura 2.15: Spettri ^1H NMR della miscela all'equilibrio con quantità variabili di **A** aggiunte. $[\text{P1}] = 5\text{mM}$, $[\text{H+}] = 5\text{mM}$, CD_3OD , 323K a) $[\text{A}] = 50\text{mM}$; b) $[\text{A}] = 100\text{mM}$; c) $[\text{A}] = 200\text{mM}$; d) $[\text{A}] = 250\text{mM}$.

Un eccesso di 10 equivalenti di ammina **A** rispetto all'aldeide **P1** si rivela sufficiente a produrre una quantità di immina misurabile rispetto a quella dell'idrazone **P1H+**. È preferibile non utilizzare eccessi troppo elevati di uno dei membri della libreria al fine di non modificare troppo le condizioni della soluzione rispetto agli esperimenti svolti precedentemente, in modo da poter effettuare un confronto accettabile. Studi svolti

precedentemente nel gruppo di ricerca hanno inoltre evidenziato che l'utilizzo di eccessi troppo elevati di uno dei membri della libreria rispetto agli altri può determinare l'insorgere di contributi intermolecolari che agiscono in modo competitivo con l'evento di riconoscimento molecolare, diminuendone gli effetti.¹⁵

L'esperimento di scambio è stato quindi effettuato preparando una soluzione contenente **P1** 5 mM, **H+** 5 mM e **A** 50 mM (10 equivalenti). Il tutto è stato lasciato a 50°C e la soluzione è stata monitorata con ¹H NMR nell'arco di 6 giorni in modo da valutare eventuali cambiamenti nella composizione. Occorre sottolineare che nonostante l'utilizzo di **H+** in quantità equimolare rispetto all'aldeide, la soluzione mantiene comunque una condizione di equilibrio dinamico di scambio: nella miscela infatti non è presente aldeide libera e la quantità di idrazide in soluzione, benché presente in quantità substechiometrica, è sufficiente ad assicurare lo scambio. Utilizzando le stesse condizioni è stato effettuato l'esperimento di scambio in presenza dello scaffold **P2**, in modo da costruire il DMC rappresentato in figura 2.16.

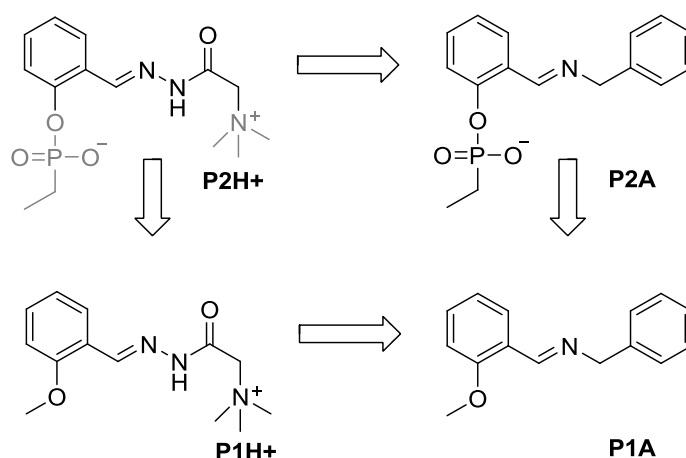


Figura 2.16: DMC per il calcolo dell'interazione stabilizzante nel composto **P2H+** rispetto a **P2A**.

I dati ottenuti sono riportati in Tabella 2.4. Da un primo confronto con i risultati ottenuti dagli scambi tra idrazoni si nota immediatamente come le costanti di equilibrio risultino maggiori di 2-3 ordini di grandezza: questo risultato è in accordo con la maggiore stabilità degli idrazoni rispetto alle immine che si riflette sulla costante di equilibrio relativa allo scambio tra le due specie. In particolare gli idrazoni risultano più stabili di 15-20 kJ/mol rispetto alle rispettive immine in queste condizioni.

Tabella 2.4: Studi di scambio.

	PxA + H+ ↔ PxH+ + A	
Px	K_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
1	220.3	-14.49
2	1631.3	-19.87
	$\Delta\Delta G^\circ$ kJ/mol	-5.38

[P1] = [P2] = 5mM; [A] = 50mM; [H+] = 5mM; CD₃OD, 323K.

Il valore di $\Delta\Delta G^\circ$ che si ottiene da questi esperimenti è interessante: in queste condizioni l'interazione ammonio-fosfonato risulta decisamente superiore a quanto ottenuto nel DMC di figura 2.6, nel quale la stessa interazione risulta essere di 1.75 kJ/mol. Dato che l'interazione misurata è la medesima, la differenza deve avere un'origine esterna. Il motivo di questa discrepanza sta nel riferimento scelto per la misura dell'interazione: infatti i valori di energia libera di stabilizzazione che si ottengono non sono grandezze assolute, ma si riferiscono a una condizione arbitraria scelta nel momento della progettazione del DMC. Ovviamente è conveniente scegliere un riferimento in cui l'interazione stabilizzante sia assente, e riferire la misura ottenuta a questa condizione. I sistemi di riferimento che verificano tale condizione sono molteplici e possono essere utilizzati indifferentemente a seconda delle esigenze sperimentali (solubilità, disponibilità della specie o facilità nella sintesi...). Un differenza così marcata nel valore di interazione ottenuto può essere riconducibile a un effetto esterno, diverso dall'interazione ammonio-fosfonato, che coinvolge lo *spacer* dell'idrazione.

2.6.2 Esperimenti di scambio H/A

Al fine di verificare questa ipotesi, è stato progettato il DMC riportato in figura 2.17.

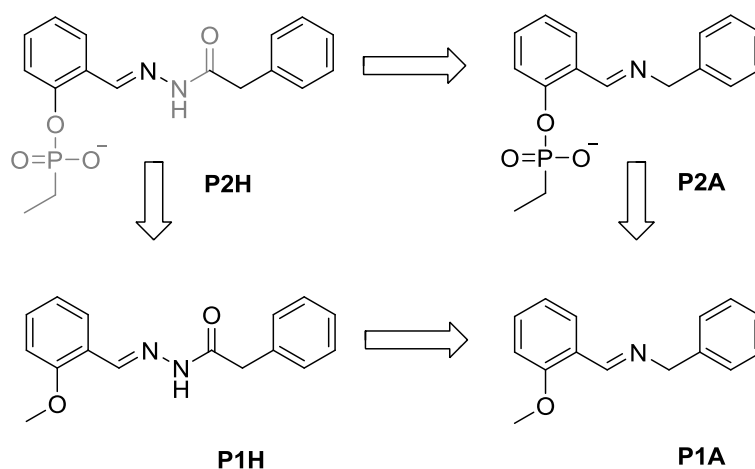


Figura 2.17: DMC progettato per verificare l'esistenza di un'interazione tra il gruppo fosfonato e lo spacer ammidico dell'idrazone.

In questo sistema lo scopo è di verificare l'esistenza di un'interazione stabilizzante nel composto **P2H**. Il ciclo termodinamico è stato organizzato in maniera analoga agli esperimenti precedenti, utilizzando un eccesso di ammina di 10 equivalenti rispetto alla quantità di idrazide e *scaffold*. In Tabella 2.5 vengono riportati i risultati ottenuti.

Tabella 2.5: Studi di scambio.

	PxA + H ↔ PxH + A	
Px	K_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
1	69.6	-11.4
2	282.5	-15.1
$\Delta\Delta G^\circ$ kJ/mol		-3.76

[P1] = [P2] = 5mM; [A] = 50mM; [H] = 5mM; CD₃OD, 323K.

Questo risultato mostra chiaramente la presenza di un'interazione stabilizzante nel composto **P2H**: essa è stata attribuita a un'interazione di tipo legame idrogeno che coinvolge il gruppo fosfonato e il protone ammidico presente sullo *spacer*. L'effetto di questa interazione non era stato evidenziato nel DMC di figura 2.6: il motivo sta nel fatto che anche il composto **P2H**, utilizzato come riferimento, sperimenta la stessa interazione che viene in tal modo "cancellata" dal ciclo. La scelta di un riferimento in cui è presente un'interazione stabilizzante porta nel DMC di figura 2.6 a sottostimare il valore dell'interazione stabilizzate in **P2H+**. Al contrario, nel DMC di figura 2.16 e 2.17 l'utilizzo dell'ammina di riferimento **A**, che non presenta il protone imminco, permette di valutare l'interazione stabilizzante in **P2H+** in modo completo, comprendendo sia l'effetto

dell'interazione elettrostatica ammonio-fosfonato sia quello dovuto al legame idrogeno tra il protone imminico e il gruppo fosfonato.

2.6.3 Esperimenti di controllo

Analogamente a quanto avviene per gli esperimenti di scambio che coinvolgono idrazoni, occorre effettuare degli esperimenti di controllo per verificare che l'interazione stabilizzante individuata sia dovuta unicamente a un'interazione intramolecolare e non abbia origine elettronica o sterica. Questo è particolarmente importante nello studio degli scambi misti idrazone-immine in cui la natura delle molecole coinvolte nello scambio è profondamente diversa. La differente stabilità del legame imminico nelle due molecole viene tenuta in considerazione dal confronto delle coppie **P2H⁺/P2H** rispetto a **P1H⁺/P1H**, tuttavia il ciclo non dà informazioni riguardo a una possibile differente stabilità intrinseca di **P2H⁺** rispetto a **P2A**: si corre infatti il rischio di sovrastimare l'effetto dell'interazione intramolecolare, attribuendo a questa effetti che al contrario potrebbero avere un'altra origine. Analogamente a quanto è avvenuto per gli idrazoni, è stato progettato un esperimento di controllo in cui l'interazione intramolecolare è stata impedita effettuando gli esperimenti di scambio con gli scaffold **P1p** e **P2p**. Questo equivale a costruire il DMC in figura 2.18, in cui viene valutata una possibile stabilizzazione di **P2pH** rispetto a **P2A**, diversa dall'interazione intramolecolare.

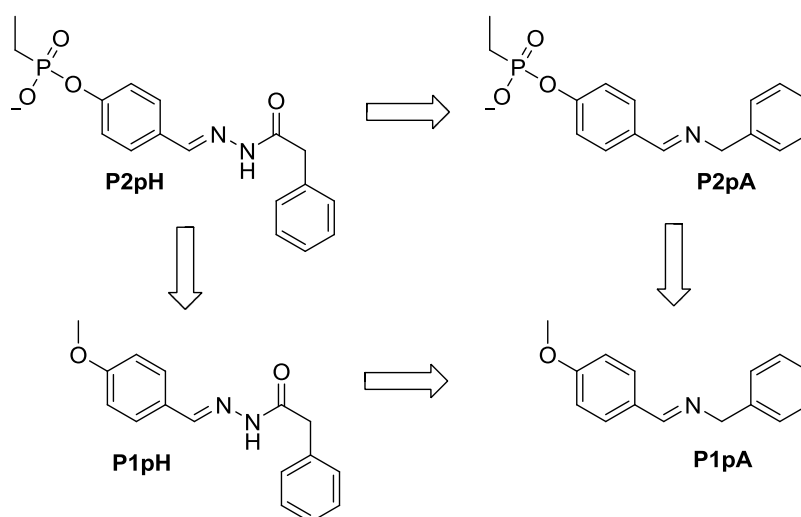


Figura 2.18: DMC di controllo che verifica l'esistenza di una stabilità intrinseca di **P2H** rispetto a **P2A**, non valutata nel DMC di figura 2.16.

La tabella 2.6 mostra chiaramente che la stabilità relativa delle specie **P2pH** e **P2pA** è analoga a quella degli omologhi **P1pH** e **P1pA**. Questo esclude la presenza di effetti stabilizzanti diversi dall'interazione intramolecolare nelle specie **P2H** e **P2A**,

permettendo quindi di attribuire l'effetto stabilizzante proprio all'interazione del gruppo fosfonato con il protone amminico tramite legame idrogeno.

Tabella 2.6: Studi di scambio.

	PxpA + H ↔ PxpH + A	
Px	K_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
1	28.6	-9.01
2	29.2	-9.06
	$\Delta\Delta G^\circ$ kJ/mol	-0.05

[P1p] = [P2p] = 5mM; [A] = 50mM; [H] = 5mM; CD₃OD, 323K.

2.7 Conclusioni

Gli esperimenti presentati finora hanno permesso di stabilire l'esistenza di un'interazione intramolecolare che stabilizza la specie **P2H+** rispetto ad altre in cui tale interazione non è presente. In particolare è stato evidenziato che tale interazione ha origine da due contributi distinti: il primo deriva dalla semplice interazione elettrostatica tra fosfonato e ammonio, il secondo prevede la formazione di un legame idrogeno che coinvolge la parte ammidica dell'idrazone. Esperimenti di controllo effettuati con molecole che non presentano interazioni intramolecolari stabilizzanti hanno permesso di escludere per i sistemi in esame la presenza di stabilizzazioni derivati da effetti sterici, elettronici o di altra natura che favoriscono intrinsecamente una specie rispetto all'altra. L'effetto di tali interazioni è sicuramente molto minore di quello osservato in presenza del riconoscimento, pertanto l'energia di stabilizzazione misurata nei cicli termodinamici può essere attribuita con buona approssimazione all'interazione intramolecolare che determina il riconoscimento. Il limite più evidente di questa metodologia consiste nella difficoltà di valutare l'effetto relativo dei contributi elettrostatici e di legame idrogeno sull'evento di riconoscimento molecolare. Dall'analisi dei dati termodinamici in nostro possesso risulta infatti molto difficile separare i due contributi, in quanto l'effetto macroscopico che costituisce l'*output* degli esperimenti – ovvero lo *shift* dell'equilibrio di scambio in presenza di gruppi interagenti – è il risultato globale della combinazione di entrambi gli effetti: un unico esperimento di scambio non fornisce alcuna informazione sul peso relativo di questi contributi. L'analisi separata dei contributi di riconoscimento prevede necessariamente la progettazione di diversi cicli termodinamici, ognuno che tenga conto di un unico effetto di stabilizzazione. In questo modo l'effetto globale può essere valutato dalla somma degli effetti separati, ma alla condizione che essi siano additivi: la presenza di effetti cooperativi complica l'analisi in quanto risulta impossibile

separare i due contributi in questo modo. L'analisi proposta con il DMC fallisce in quanto viene a mancare la condizione di additività degli effetti secondari a seguito della mutazione: l'effetto globale non è uguale alla somma degli effetti separati, ma risulta maggiore (effetto cooperativo positivo) o minore (effetto cooperativo negativo). La figura 2.19 riassume i risultati ottenuti.

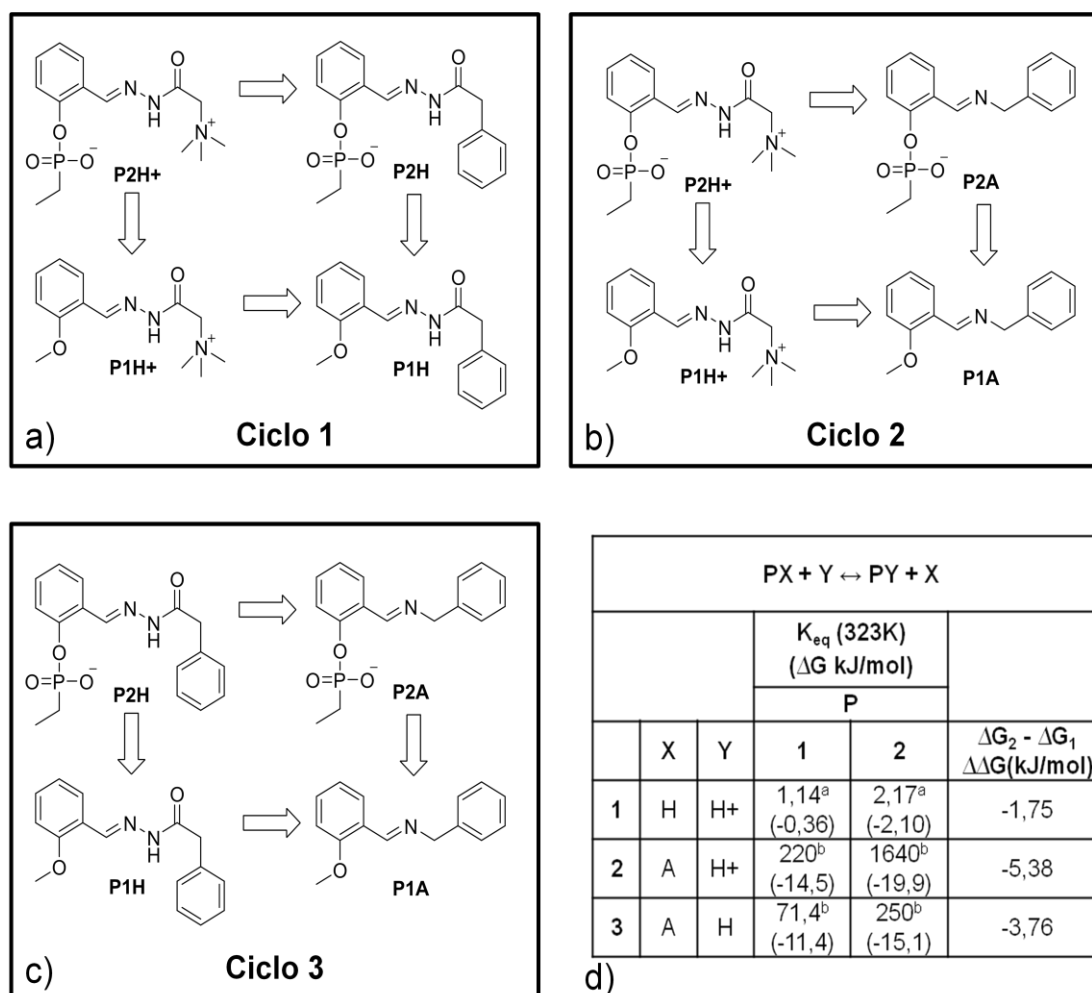


Figura 2.19: Riassunto dei risultati ottenuti dagli esperimenti di DMC. a) ciclo 1, b) ciclo 2, c) ciclo 3; d) Tabella riassuntiva dei risultati. [P1] = [P2] = 5mM, CD₃OD. a) [X]=[Y]=25mM; b) [X]=50mM; [Y]=5mM.

Nel sistema in esame, il ciclo 2 (Figura 2.19b) misura l'effetto globale dell'interazione elettrostatica e di legame idrogeno, fornendo un valore di -5.38 kJ/mol. Allo stesso modo il ciclo 3 quantifica l'effetto del solo legame idrogeno in -3.76 kJ/mol. Occorre sottolineare come il bilancio termodinamico totale risulti rispettato: il ciclo 1 fornisce un valore di 1.75 kJ/mol, in accordo con quanto ottenuto dalla somma algebrica dei risultati derivati dai cicli 2 e 3 (-1.62 kJ/mol): la discrepanza risulta < 0.1 kJ/mol, compatibile con l'errore sperimentale.

Gli esperimenti finora presentati non forniscono informazioni riguardo alla possibile cooperatività degli effetti in quanto risulta impossibile stabilire se l'effetto del legame idrogeno sia lo stesso per le molecole **P2H+** o **P2H**. In altre parole, è possibile che la presenza della carica positiva in **P2H+** influisca sulla forza dell' legame idrogeno, rafforzandolo o destabilizzandolo. Occorre precisare che il ciclo 1 non è in grado di fornire questa informazione, in quanto anche in questo caso è impossibile verificare che la forza del legame idrogeno in **P2H+** e **P2H** sia effettivamente la stessa. L' informazione certa fornita da questo esperimento è che la presenza di una carica positiva aumenta la stabilizzazione della molecola **P2H+** rispetto a **P2H** di -1.75 kJ/mol, tuttavia non è possibile stabilire se ciò sia dovuto a un'interazione elettrostatica ammonio-fosfonato o a un effetto diretto della carica positiva sulla forza del legame idrogeno.

La presenza di una cooperatività tra gli effetti appena descritti non è improbabile: il gruppo ammonio potrebbe ad esempio "orientare" in modo favorevole il braccio dell'idrazone favorendo il legame idrogeno o modificare l'acidità del protone ammidico: in entrambi i casi la forza dell'interazione risulterebbe diversa da quella misurata in **P2H**, determinando la comparsa di effetti cooperativi. I risultati ottenuti permettono comunque di porre dei limiti agli effetti relativi delle due interazioni. La figura 2.20 mostra schematicamente le due interazioni presenti nelle molecole **P2H+** e **P2H**: si riconoscono l'interazione elettrostatica fosfonato-ammonio (P-A) e l'interazione di legame idrogeno (P-H).

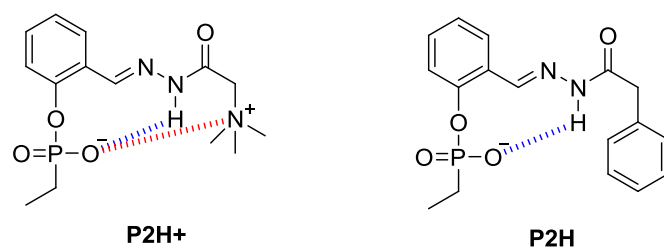


Figura 2.20: Rappresentazione delle interazioni stabilizzanti ipotizzate per le molecole **P2H+** (a sinistra) e **P2H** (a destra).

Mentre il valore di P-H nella molecola **P2H** è misurabile direttamente (ciclo 3 figura 2.19, -3.76 kJ/mol), lo stesso può assumere valori diversi nella molecola **P2H+**. In particolare è possibile distinguere tre casi separati, a seconda che le due interazioni siano additive *i*), presentino cooperatività positiva *ii*), o cooperatività negativa *iii*). Nel caso *i*) si avrà che la forza dell'interazione P-H è la stessa nelle due molecole, pertanto P-A è calcolabile dalla somma algebrica dei due contributi, risultando -1.62 kJ/mol. Nel caso *ii*) l'effetto della carica positiva si esprime in un aumento della forza dell'interazione P-H, che risulta in tal

modo >3.76 kJ/mol: di conseguenza l'interazione P-A risulta < 1.62 kJ/mol. Infine nel caso *iii*) la carica destabilizza l'interazione P-H che risulta in tal modo < 3.76 kJ/mol, determinando un valore di P-A > 1.62 kJ/mol. Nessuno degli esperimenti presentati permette di quantificare separatamente il valore delle due interazioni presenti nella molecola **P2H+**: la mutazione di uno dei membri influisce necessariamente sull'altro in modo imprevedibile e non necessariamente additivo. In questo modo viene a mancare uno dei requisiti necessari per l'utilizzo dei DMC negli studi nelle interazioni non covalenti, che prevede l'additività degli effetti secondari introdotti dalle mutazioni.

I risultati ottenuti durante questi studi evidenziano le potenzialità di una metodologia basata sul DMC per lo studio di interazioni non covalenti in soluzione. La metodologia proposta si presenta come un metodo robusto per la misura di interazioni non covalenti in soluzione: tramite una semplice analisi termodinamica è stato possibile determinare il valore dell'interazione stabilizzante di una serie di composti, eseguendo un'analisi sistematica del valore di tale interazione al variare della natura delle specie coinvolte.

L'implementazione introdotta dall'utilizzo del DCC in questi tipi di studi ha permesso innanzitutto di misurare le differenze di stabilità dei diversi composti in modo semplice, tramite misure ^1H NMR all'equilibrio e ha facilitato la progettazione dei DMC, evitando l'utilizzo di sistemi supramolecolari complessi. In particolare nel sistema in esame è stato possibile effettuare lo studio utilizzando molecole disponibili commercialmente o di facile sintesi, con la possibilità di variare in modo semplice i gruppi interagenti e le condizioni di studio (solvente, temperatura, *range* di concentrazione...).

Lo studio ha permesso confrontare in modo diretto molecole con stabilità termodinamiche nettamente diverse, come le immine e gli idrazoni. Questo risultato è stato ottenuto con un'ottimizzazione della concentrazione di ammina da utilizzare nello scambio, utilizzata in eccesso di 10 equivalenti rispetto alla quantità di idrazide e *scaffold*. Un'ampia scelta delle condizioni sperimentali è una delle conseguenze dell'utilizzo di una metodologia basata sul DCC, in cui la formazione di un legame covalente imminico permette di ottenere composti stabili, semplici da studiare, caratterizzare e che possono eventualmente essere isolati. Lo studio sistematico che è stato presentato ha permesso di valutare come la natura dello *spacer* tra i due gruppi carichi possa determinare importanti differenze nella forza dell'interazione non covalente, con la possibilità di progettare sistemi in cui la forza dell'interazione sia facilmente prevedibile a priori e modulabile. La possibilità di misurare differenze di energia molto piccole (dell'ordine di 1 kJ/mol) ha permesso di individuare la presenza di un'interazione stabilizzante derivata da un legame idrogeno che coinvolge il protone

ammidico dell'idrazone e il gruppo fosfonato. Lo studio di queste interazioni è di particolare interesse in ambito biologico: tale interazione infatti è analoga a quella presente tra gruppi fosfato e protoni appartenenti a basi azotate che determinano la formazione di strutture complesse di tipo proteico che si osservano nell' RNA.¹⁶

Una particolare attenzione va dedicata all'analisi dei risultati ottenuti: mentre è semplice rilevare una differenza di stabilità tra due molecole, può risultare complesso attribuirle a un unico effetto di interazione non covalente. Occorre innanzitutto escludere effetti elettronici, sterici o di solvatazione che possono determinare una stabilizzazione interseca di una specie rispetto a un'altra indipendente dall'interazione che si intende studiare. Diversi esperimenti di controllo portano a concludere che questo non si verifica nel nostro sistema, in cui l'effetto di stabilizzazione può essere attribuito con buona sicurezza all'interazione intramolecolare in esame. Un'ulteriore controllo va eseguito sulle molecole utilizzate come riferimento: dato che le grandezze ottenute sono tutte relative, occorre accertarsi che nel sistema utilizzato come riferimento non siano presenti interazioni, con il rischio di sottostimare la forza dell'interazione in esame, come per il ciclo 1, figura 2.19. Alcune di queste interazioni non sono immediatamente individuabili, pertanto può risultare necessario progettare ulteriori DMC utilizzando riferimenti diversi per accertarsi che esse siano effettivamente assenti o per poterle quantificare a loro volta. Infine, occorre tenere presente che la metodologia permette di individuare la presenza di interazioni stabilizzanti di natura diversa all'interno di un unico composto, ma non fornisce informazioni riguardo alla possibile loro cooperatività, in particolare le interazioni risultano quantificabili solo assumendo che esse siano additive.

2.8 Parte sperimentale

2.8.1 Strumentazione

Spettri NMR

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati a 298 K con spettrometro Bruker AC-250, operante a 250.2 MHz, ed a 323 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300, operante a 300.1 MHz. I valori di chemical shift (δ) riportati sono dati in ppm, calibrando la scala rispetto al segnale determinato dalla frazione di solvente non deuterato presente come impurezza (CDCl_3 $\delta=7.26$ ppm, CD_3OD $\delta=3.31$ ppm, DMSO-d_6 $\delta=2.49$ ppm, ACN-d_6 $\delta=1.94$ ppm).

Gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$, disaccoppianti dal protone, sono stati registrati a 298 K con spettrometro Bruker AC-250, operante a 62.9 MHz, ed a 301 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300, operante a 75.5 MHz. I valori di chemical shift (δ) riportati sono dati in ppm, calibrando la scala rispetto al segnale determinato dal solvente deuterato presente (CDCl_3 $\delta=77.0$ ppm, CD_3OD $\delta=49.3$ ppm, DMSO-d_6 $\delta=40.45$ ppm).

Gli spettri $^{31}\text{P-NMR}$, disaccoppiati dal protone, sono stati registrati a 301 K con spettrometro Bruker Avance DRX-300, operante a 121.5 MHz. I valori di chemical shift (δ) riportati sono dati in ppm, eseguendo una calibrazione esterna (H_3PO_4 85% in acqua $\delta=0.0$ ppm).

Nel riportare gli spettri NMR è stata utilizzata la seguente simbologia:

s: singoletto

d: doppietto

t: tripletto

q: quartetto

m: multipletto

Misure di massa

Gli esperimenti di *Spettrometria di Massa* sono stati effettuati utilizzando uno spettrometro Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD Trap-SL, con ionizzazione ad elettrospray, filtro esapolo ed analizzatore di massa a trappola ionica. Si è operato

mediante infusione diretta di una soluzione del campione con concentrazione $10^{-5} \div 10^{-6}$ M.

Analisi HPLC

Le *analisi HPLC* sono state condotte su uno strumento Shimadzu LC-10AT VP, utilizzando un detector UV-Vis SPD-10A VP. La colonna e la rampa utilizzata è indicata per ciascun composto.

Analisi UHPLC

Le *analisi UHPLC* sono state effettuate su uno strumento Agilent 1290 Infinity LC/MS System equipaggiato con una sorgente ad elettrospray, filtro quadrupolo e detector diode array. La colonna e la rampa utilizzata è indicata per ciascun composto.

Analisi TLC

Le *analisi TLC* sono state eseguite su lastre Macherey-Nagel POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ di plastica ricoperte di silice (40x80 mm, 0.2 mm spessore) o lastre Fluka di alluminio ricoperto di silice (40x80 mm, 0.2 mm spessore, diametro delle particelle 10 Å indicatore fluorescente a $\lambda=254\text{nm}$) e visualizzate mediante UV-Vis o sviluppate con soluzione di ninidrina in etanolo, potassio permanganato in acetone, blue shift o vapori di iodio.

Purificazioni cromatografiche

Le *Purificazioni Cromatografiche* sono state effettuate su colonna a gravità o a bassa pressione secondo la tecnica Flash Chromatography. E' stato utilizzato gel di silice Machery-Nagel con granulometria 230÷400 mesh per cromatografia flash, e 70÷230 mesh per cromatografia su colonna a gravità.

Eseguite anche delle purificazioni su lastra preparativa (gel di silice, spessore 2 mm, dimensioni 20 cm x 20 cm).

Purificazioni HPLC

Le *purificazioni HPLC* sono state eseguite su uno strumento Shimadzu LC-8A, utilizzando come detector UV-Vis SPD-6A. La colonna utilizzata è Jupiter Proteo 4u 90A (250x21.20 mm , 4 μm), flusso 17 ml/min.

2.8.2 Materiali

Solventi e reattivi

I reattivi impiegati nelle sintesi sono acquistati da Sigma-Aldrich o Fluka come prodotti ad elevata purezza (>98%) e sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

I solventi utilizzati sono HPLC-grade, provenienti da Fluka ed usati senza ulteriori purificazioni. Per le analisi ESI-MS è stata utilizzata acqua distillata filtrata mediante sistema Millipore MILLI-Q, mentre metanolo ed acetonitrile provengono da Riedel-de Haën Chromasolv[®].

I solventi deuterati sono provenienti da Sigma-Aldrich (CDCl_3 99.8%D; methanol- d_4 99.9%D, DMSO- d_6 99.8%D, $\text{CD}_3\text{CN-d}_3$ 99.8%).

2.8.3 Procedura per gli esperimenti di scambio

¹H NMR

Le soluzioni madre degli *scaffold* vengono preparate (100-200 mM) in CD₃CN per evitare la formazione di emiacetali. Le soluzioni madre delle idrazidi (10-50 mM) vengono preparate in CD₃OD. Le soluzioni vengono aggiunte in un tubo NMR munito di *screw cap* e diluite fino a 600 uL per ottenere una concentrazione di 5 mM per lo *scaffold* e 25 mM per ognuna delle idrazidi. Il tubo viene riscaldato a 50°C per 2 giorni, controllando periodicamente la composizione tramite ¹H NMR sulla base dei segnali nella zona imminica. L'equilibrio è raggiunto quando la composizione è costante e gli spettri risultano perfettamente sovrapponibili. La quantità di idrazone/immina formata viene valutata sulla base dell'integrale dei segnali della zona imminica (tra 7.5 ppm e 8.5 ppm per tutti gli idrazoni-immine in esame), fornita da spettri ¹H NMR effettuati a 323K, e la composizione della miscela viene dedotta da bilanci di massa effettuati sulla quantità di idrazide/ammina inizialmente aggiunta.

HPLC

La soluzione madre di **P2p** viene preparata in CH₃CN per evitare la formazione di emiacetali, mentre le soluzioni madre di **H** e **H+** vengono preparate in CH₃OH. Le rette di calibrazione relative agli idrazoni **P2pH** e **P2pH+** vengono preparate svolgendo la sintesi dell'idrazone direttamente in *vial*, evitando di isolare l'idrazone. Pertanto vengono preparate le soluzioni da iniettare aggiungendo la soluzione madre di **P2p** fino a ottenere concentrazioni comprese tra 1 mM e 5 mM e l'idrazide **H** oppure **H+** in eccesso (25 mM). Le *vial* vengono riscaldate a 50°C per la notte e la formazione dell'idrazone corrispondente è valutata con ESI-MS.

Colonna: Jupiter Proteo 4u, 250X4.60 mm, 4 um, flusso 0.8 mL/min, λ = 280 nm.

Rampa: CH₃CN (+TFA 0.1%) da 10% a 90% in 15 min, 90% per 5 min.

P2pH : 13.3 min

P2pH+ 8.9 min

Rette di calibrazione: $y = ax + b$

P2pH : a: 12136064; b: 121008

P2pH+ a: 9610033; b: 62999

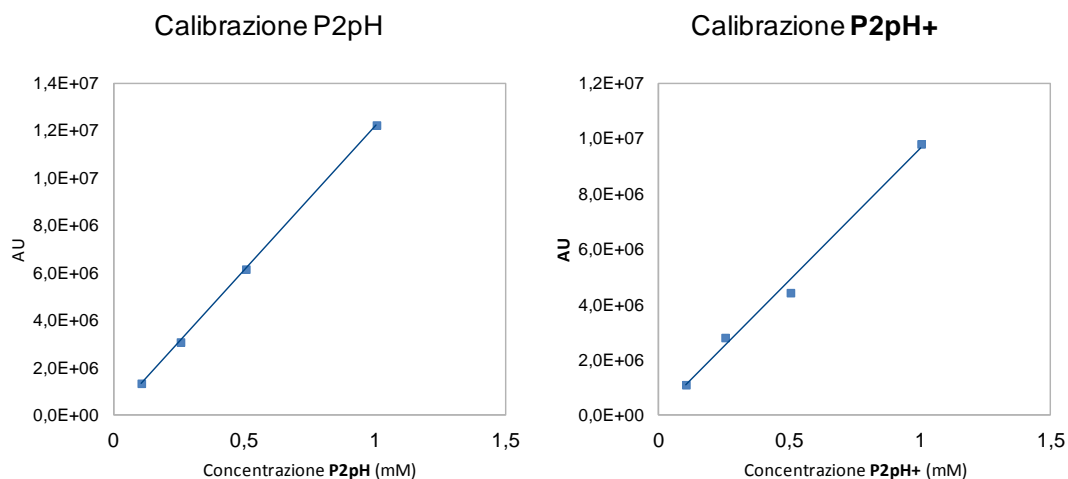
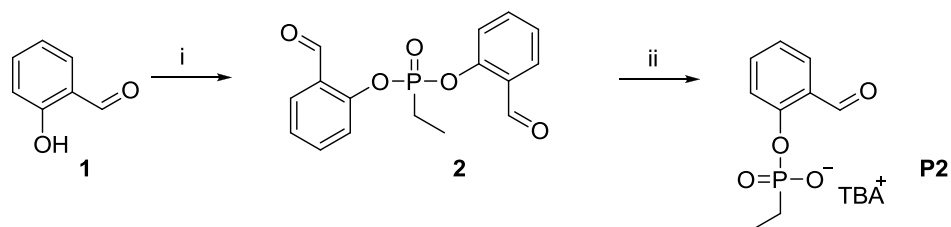


Figura 2.18: Curve di calibrazione per le due specie **P2pH** e **P2pH+**.

L'esperimento di scambio è effettuato preparando una soluzione contenente **P2p** 5mM, **H**, **H+** 25mM in CH_3OH , utilizzando le stesse soluzioni madre utilizzate per la taratura. La soluzione è mantenuta a 50°C per 2 giorni, quindi è iniettata all'HPLC dopo opportuna diluizione. La formazione quantitativa degli idrazoni è valutata dalla retta di calibrazione ad essi relativa e il loro rapporto è valutato dall'area dei picchi corrispondenti.

2.8.4 Sintesi e caratterizzazioni

Di seguito viene riportato lo schema utilizzato per la sintesi dello scaffold **P2**. Per la sintesi dello scaffold **P2p** è stata utilizzata la stessa procedura sintetica, modificando la natura del derivato aldeidico utilizzato nel primo passaggio.



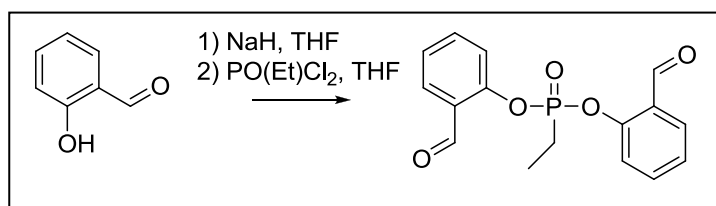
Schema 2.1 : i) NaH , $\text{PO}(\text{Et})\text{Cl}_2$, THF ; ii) NaOH , $\text{acetone}/\text{H}_2\text{O}$, TBA^+AcO^- in CHCl_3

Procedura generale per la sintesi di 2

NaH (60% in olio minerale, 1 eq) è lavato con diverse aliquote di esano e posto in atmosfera di azoto in un pallone a tre colli munito di ancoretta magnetica.

Successivamente viene sospeso in THF anidro. La sospensione ottenuta è raffreddata a 0°C. La miscela è mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 45 minuti. Raffreddata nuovamente la soluzione a 0°C, etilfosfonildicloruro (0.5 eq) è aggiunto goccia a goccia e la soluzione così ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione una notte. Il solido formato viene filtrato e lavato con THF, recuperando la fase organica. Il solvente è rimosso per evaporazione a pressione ridotta, ottenendo un residuo che viene purificato con cromatografia Flash (SiO₂) o per ricristallizzazione.

Sintesi di bis(2-formylphenyl) ethylphosphonate (2a)



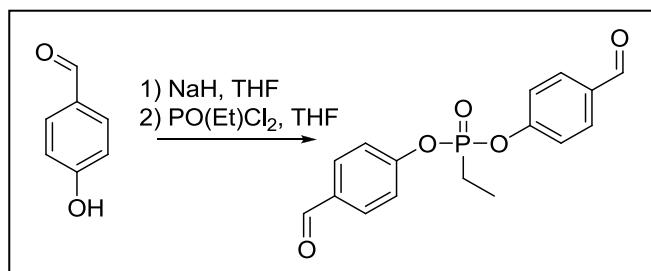
Solido bianco cristallino, ricristallizzato da CH₃CN, 56% resa.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.30 (td, 3H, J =7.7Hz, J=22.1Hz), 2.19 (qd, 2H, J=7.6Hz, J=18.3Hz), 7.12-7.23 (m, 4H), 7.41 (ddd, 2H, J=1.9Hz, J=7.5Hz, J=9.1Hz), 7.75 (d, 2H, J=7.0Hz), 10.17 (s, 2H)

¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.53 (J_{C-P} 7.3 Hz), 19.76 (J_{C-P} 141.5 Hz), 121.58 (J_{C-P} 3.0 Hz), 125.73, 127.34 (J_{C-P} 5.1 Hz), 129.94, 135.70, 151.62, 188.07

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm) 29.09

ESI (+, ACN + HCOOH 0.1%): *m/z* 340.8 [M+Na]⁺.calcd: 341.2

Sintesi di bis(4-formylphenyl) ethylphosphonate (2b)

Olio giallo, 82% resa.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.38 (td, 3H, J=7.7Hz, J=21.9Hz), 2.19 (qd, 2H, J=7.6Hz, J=18.2Hz), 7.36 (dd, 4H, J=0.9Hz, J=8.4Hz), 7.87 (d, 4H, J=8.6Hz), 9.95 (s, 2H)

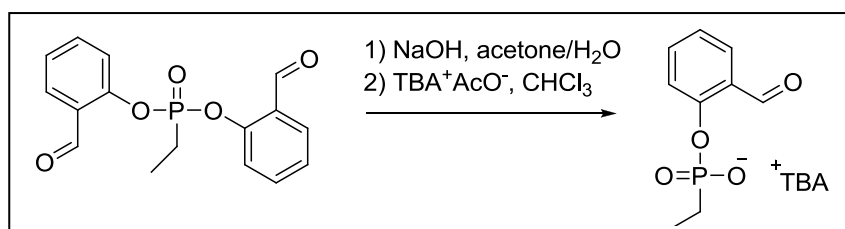
¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.30 (J_{C-P} 7.3 Hz), 19.49 (J_{C-P} 141.9 Hz), 120.95 (J_{C-P} 4.6 Hz), 131.63, 133.40, 154.69 (J_{C-P} 9.1 Hz), 190.56

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 25.61

ESI (+, ACN + HCOOH 0.1%): *m/z* 319.3 [M+H]⁺.calcd: 319.3

Procedura generale per la sintesi dello scaffold

Il substrato **2** è sciolto in acetone (5 mL) e la soluzione ottenuta è raffreddata a 0°C. Si aggiunge una soluzione di NaOH 0.1 M in volume tale da raggiungere 1 equivalente rispetto al substrato. La soluzione così ottenuta è lasciata una notte sotto agitazione, dopodiché viene estratta con EtOAc (3 x 25 mL). La fase acquosa è liofilizzata per ottenere un solido bianco. Il solido viene sospeso in CHCl₃ e viene aggiunto 1 equivalente di tetrabuttilammonio acetato. La sospensione è lasciata sotto agitazione per una notte, successivamente viene filtrata su siringa e il prodotto è recuperato rimuovendo il solvente per evaporazione a pressione ridotta. Il solido ottenuto è fortemente igroscopico e va conservato in atmosfera inerte.

Sintesi di 2-formylphenyl ethylphosphonate (P2)

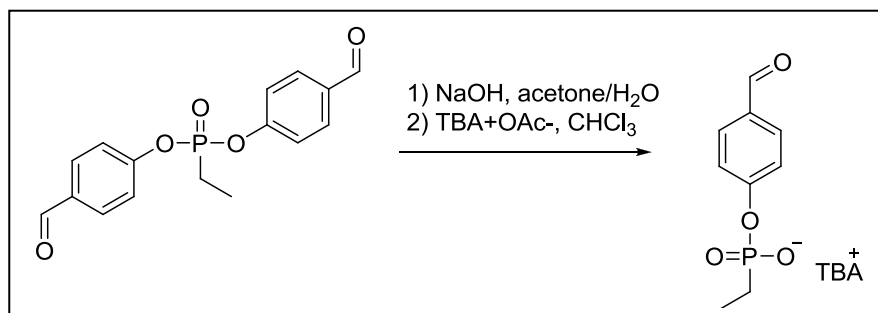
Solido igroscopico, conservato sotto atmosfera di azoto, 95% resa.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.20 (dt, $J = 21.11, 7.55$ Hz, 3H), 1.90 (qd, $J = 18.83, 7.55$ Hz, 2H), 7.22-7.33 (m, 2H), 7.48-7.53 (m, 1H), 7.84-7.87 (m, 1H), 8.17 (s br, 1H), 10.32 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.98 (d, $J_{P-C} = 6.45$ Hz), 19.02 (d, $J_{P-C} = 145.46$ Hz), 121.72, 125.11, 127.68 (d, $J_{P-C} = 3.80$ Hz), 128.56, 135.32, 151.95 (d, $J_{P-C} = 9.31$ Hz), 188.51

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 34.43

ESI-MS(-) ACN: [M-H]⁻ 213.3 m/z, calcd, 213.2

Sintesi di 4-formylphenyl ethylphosphonate (P2p)

Solido igroscopico, conservato sotto atmosfera di azoto, 87% resa.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.96 (t, 12H, J=7.2Hz), 1.05-1.25 (m, 3H), 1.33-1.47 (m, 8H), 1.56-1.74 (m, 10H), 3.28-3.35 (m, 8H), 7.50 (d, 2H, J=8.6Hz), 7.75 (d, 2H, J=8.6Hz), 9.86 (s, 1H)

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃CN) proton decoupled δ (ppm): 23.23

ESI (+, ACN + HCOOH 0.1%): m/z 215.2 [M+2H]⁺. calcd: 215.2

2.9 Bibliografia

1. Boyer, J. A.; Clay, C. J.; Luce, K. S.; Edgell, M. H.; Lee, A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8010-8019.
2. Roman, M.; Cannizzo, C.; Pinault, T.; Isare, B.; Andrioletti, B.; van der Schoot, P.; Bouteiller, L., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 132, 16818-16824.
3. Riemen, A. J.; Waters, M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14081-14087.
4. Fischer, F. R.; Schweizer, W. B.; Diederich, F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8270-8273.
5. Cockroft, S. L.; Hunter, C. A., *Chem. Commun.* **2009**, 3961-3963.
6. Bhayana, B.; Wilcox, C. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6833-6836.
7. Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2288-2306.
8. Gasparini, G.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2475-2479.
9. Palla, G.; Predieri, G.; Dominano, P., *Tetrahedron* **1986**, 42, (13), 3649-3654.
10. Syakaev, V. V.; Podyachev, S. N.; Buzykin, B. I.; Latypov, S. K.; Habicher, W. D.; Konovalov, A. I., *J. Mol. Struct.* **2006**, 788, 55-62.
11. Giorgi, G.; Ponticelli, F.; Savini, L.; Chiasserini, L.; Pellerano, C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, 2259-2264.
12. Levrard, B.; Fieber, W.; Lehn, J. M.; Herrmann, A., *Helv. Chem. Acta* **2007**, 90, 2281-2314.
13. Osowska, K.; Miljanic, O. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2010** 133, 724-727.
14. Carey, F. A.; Sundberg, R. J., *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanism*. 4.th ed.; Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, 2000.
15. Gasparini, G.; Martin, M.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Chem. Commun.* **2007**, 1340-1342.
16. Duchart-Ferner, E.; Ferner, J.; Wohnert, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7927-7930.

3. Studio di una miscela dinamica complessa con spettroscopia ^{13}C NMR[‡]

3.1 Introduzione

Gli studi presentati nel capitolo 2 hanno introdotto una metodologia per lo studio e la quantificazione dell'interazione non covalente tra gruppi chimici in soluzione. In particolare lo studio si è concentrato su un sistema modello semplice, in cui la natura delle interazioni non covalenti coinvolte era già nota. La complessità raggiunta in questo studio è molto al di sotto di quella riscontrata in sistemi naturali, i quali sono formati da un *network* complesso di interazioni non covalenti. Il risultato macroscopico, espresso da eventi di *binding*, *self-assembly* o catalisi, è in realtà il risultato di una complessa rete di interazioni non covalenti che comprendono effetti di diversa origine. La costruzione di sistemi funzionali sintetici in grado di mimare i sistemi naturali implica necessariamente lo studio approfondito di tali effetti.

Un enorme passo avanti in questo ambito è stato introdotto dall'utilizzo di librerie dinamiche che permettono di ampliare il grado di complessità e di diversità chimica del sistema. Chiaramente la complessità raggiungibile è limitata dagli strumenti analitici in grado di fornire informazioni sulla libreria in esame. La tecnica HPLC si è imposta come metodologia analitica privilegiata per lo studio di questi sistemi per le sue caratteristiche di versatilità e di applicabilità a una vasta serie di sistemi chimici. Molti degli esempi dell'utilizzo di librerie dinamiche riportati in letteratura prevedono proprio l'utilizzo di tecniche cromatografiche HPLC, eventualmente accoppiate con detector di massa, che riescono a fornire informazioni in modo semplice e rapido sulla composizione della miscela. Tuttavia nello studio di una libreria di composti con caratteristiche molto simili, la separazione della miscela può risultare difficile. In casi del genere l'utilizzo di una tecnica che permetta un'identificazione più immediata dei composti risulta preferibile: la spettroscopia NMR può costituire un'alternativa per questo tipo di studi.

Il vantaggio principale della spettroscopia NMR rispetto a tecniche cromatografiche risiede nella possibilità di ottenere informazioni in maniera "non invasiva", senza alterare gli equilibri della miscela o i processi di riconoscimento molecolare che possono essere

[‡] Parte dei risultati presenti in questo capitolo è pubblicata in: Dal Molin, M., Gasparini G., Scrimin, P., Rastrelli, F., Prins, L. J., *Chem Commun.* **2011**, 47, 12476-12478.

invece disturbati dalle condizioni sperimentali in cui avviene l'analisi HPLC. Inoltre la tecnica NMR permette di riconoscere molecole con caratteristiche chimico-fisiche molto simili tra loro: in questo caso infatti i segnali sono estremamente sensibili anche a cambiamenti strutturali molto piccoli. Lo svantaggio principale, che si ritrova soprattutto nella tecnica ^1H NMR, risiede nella possibilità di sovrapposizione di segnali che rendono difficoltosa l'interpretazione dello spettro: in tal modo la complessità della miscela viene fortemente limitata allo studio di librerie composte da pochi membri. Benché questo problema possa essere alleviato dall'utilizzo di tecniche bidimensionali o particolari protocolli, la complessità della libreria resta comunque molto al di sotto di quella raggiungibile con tecniche cromatografiche.

Questo capitolo presenta l'utilizzo di una metodologia basata sulla spettroscopia NMR per lo studio di una miscela dinamica complessa. In particolare ci si è concentrati sullo studio di una libreria dinamica che fa uso di molecole simili a quelle utilizzate in precedenza e già presentate nel capitolo 2. L'evento di riconoscimento molecolare che caratterizza questi sistemi è già stato studiato in dettaglio e si è potuto stabilire che esso ha origine da interazioni non covalenti di tipo elettrostatico e legame idrogeno. Lo scopo del progetto è quello di ampliare la complessità del sistema introducendo sulle molecole alcuni gruppi spettatori e verificare il loro effetto sul riconoscimento. Questo studio è stato effettuato modificando la natura degli *scaffold* utilizzati negli esperimenti di scambio con l'inserzione di gruppi chimici in posizioni vicine rispetto ai siti coinvolti nel *binding*. Analogamente a quanto è avvenuto per gli studi basati sul DMC, l'effetto di questi gruppi viene valutato in base alla variazione della stabilità termodinamica della molecola in cui essi vengono introdotti, associando una diminuzione dell'energia termodinamica con un aumento della forza di interazione intramolecolare.

La differenza principale rispetto agli studi svolti precedentemente risiede nell'utilizzo di una libreria complessa, in cui sono presenti diversi equilibri di scambio che avvengono contemporaneamente all'interno dello stesso sistema. La spettroscopia ^1H NMR si è rivelata inadatta a essere applicata allo studio di librerie estese, pertanto la nostra attenzione si è rivolta verso l'utilizzo della spettroscopia ^{13}C NMR. A questo scopo gli *scaffold* utilizzati vengono marcati isotopicamente introducendo in posizione aldeidica un carbonio marcato al ^{13}C : in tal modo ogni molecola presente nel sistema fornirà un unico segnale. Questo approccio diminuisce sensibilmente la complessità dello spettro associato, aprendo la strada verso lo studio di librerie complesse, in cui lo scambio è effettuato utilizzando contemporaneamente più *scaffold*. Il vantaggio principale risulta in un aumento della complessità del sistema, che può essere studiato attraverso un numero di esperimenti limitato.

Questa metodologia analitica viene applicata a un sistema complesso, basato sui risultati presentati nel Capitolo 2. Viene poi effettuato uno studio sistematico sull'inserzione di gruppi spettatori, discutendone l'effetto sulla struttura delle molecole e sull'evento di riconoscimento molecolare.

3.2 Progettazione del sistema

Tutti gli esperimenti presentati nel capitolo 2 si basano sulla formazione di un equilibrio di scambio tra una molecola *scaffold* e una coppia di idrazidi o ammine. Lo *screening* è stato effettuato variando di volta in volta la natura di una delle specie coinvolte nello scambio: in questo modo lo *shift* dell'equilibrio in favore di una specie è associato all'esistenza di un'interazione stabilizzante.

Lo stesso principio può essere esteso a una rete di equilibri più complessa, in cui siano presenti molteplici equilibri di scambio, eventualmente interconnessi tra loro. La composizione all'equilibrio della libreria riflette la stabilità termodinamica relativa di ogni membro: se i *building block* della libreria sono progettati nel modo opportuno, la loro stabilità termodinamica può essere utilizzata per descrivere la forza dell'interazione intramolecolare non covalente in essi presente.

L'utilizzo della spettroscopia ^{13}C NMR per lo studio della composizione all'equilibrio della libreria implica l'utilizzo di *scaffold* in cui il carbonio aldeidico viene marcato al ^{13}C . La scelta di effettuare il *labelling* in questa posizione deriva dalla relativa semplicità nella sintesi di queste molecole e dal fatto che il *chemical shift* relativo al segnale imminico risulta molto sensibile ai cambiamenti di intorno chimico, permettendo di distinguere molecole con strutture molto simili. Gli *scaffold* utilizzati in questi studi (figura 3.1) presentano diversi gradi di sostituzione sull'anello aromatico, in cui sono stati introdotti un gruppo metile in posizione 3 (**P3**) e un ulteriore gruppo metossido in posizione 6 (**P4**).

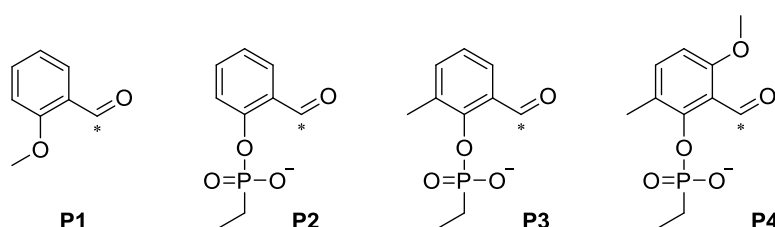


Figura 3.1: *Scaffold* utilizzati per la costruzione della libreria. L'asterisco indica la posizione del nucleo marcato.

Le molecole denominate **P1** e **P2** sono analoghe a quelle utilizzate negli studi presentati in precedenza e vengono utilizzate come riferimento. La scelta del gruppo metile introdotto sullo *scaffold* **P3** permette di valutare effetti di origine sterica che possono influenzare la posizione relativa dei gruppi interagenti, mentre il gruppo metossido (**P4**) è stato scelto con lo scopo di ottenere informazioni riguardanti l'eventuale effetto della presenza di un doppietto elettronico sulla posizione del sistema laterale dell'idrazone/immina rispetto al gruppo fosfonato. Gli esperimenti di scambio vengono effettuati utilizzando lo stesso *pool* di idrazidi e ammine utilizzate in precedenza, riportate in figura 3.2.

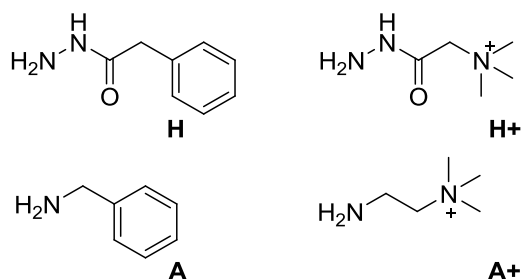


Figura 3.2 : Idrazidi e ammine utilizzate negli esperimenti di scambio.

L'introduzione del *labelling* al carbonio aldeidico fa sì che ogni idrazide/immina originata dalla reazione con lo *scaffold* fornisca un unico segnale all' NMR, o eventualmente un set di più segnali in presenza di isomeria. Nel caso della spettroscopia ^{13}C NMR, il *range* di

chemical shift in cui normalmente risuonano i segnali è di circa 200 ppm, decisamente più esteso di quello sperimentato nella spettroscopia ^1H NMR in cui tutti i segnali cadono in un *range* di circa 10-12 ppm. Questo permette di limitare gli effetti di sovrapposizione di segnali, introducendo la possibilità di studiare librerie più estese.

3.2.1 Sintesi degli *scaffold*

L'introduzione di un carbonio ^{13}C in posizione aldeidica prevede una reazione di formilazione dell'anello utilizzando un reagente isotopicamente marcato. Nel nostro caso l'attenzione si è concentrata sulle reazioni in grado di introdurre un gruppo formile in posizione orto rispetto all'ossidrilico di un fenolo: tra queste è stata scelta la reazione del fenolo MOM-protetto con N,N-dimetilformamide (DMF) dopo trattamento con alchillio, il cui schema è presentato in figura 3.3.

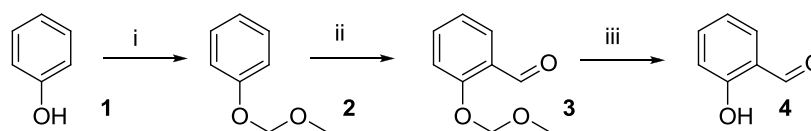


Figura 3.3: Schema della reazione utilizzata per l'introduzione di una funzione aldeidica in orto a un fenolo. i) NaH, MOMCl, THF; ii) n-BuLi, DMF, Et₂O; iii) HCl, Et₂O.

La reazione fornisce un metodo conveniente per la sintesi di derivati della salicilaldeide con diversi gradi di sostituzione all'anello aromatico, a seconda del reagente fenolico di partenza. Questa scelta è stata motivata dalla disponibilità e dal costo del reagente isotopicamente marcato da utilizzare (in questo caso N,N-dimetil (form- ^{13}C) ammido, figura 3.4) e dalle alte rese di reazione riportate in letteratura.

La reazione prevede innanzitutto la protezione della funzione fenolica per reazione con clorometil-metil etere (MOM-Cl). Successivamente la molecola così ottenuta viene trattata con n-butililitio per ottenere la metallazione selettiva in posizione orto; il

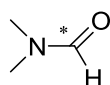


Figura 3.4: N,N-dimetil, (form- ^{13}C) ammido

successivo trattamento dell'addotto con DMF fornisce l'aldeide aromatica in alte rese. Infine la funzione fenolica è ripristinata per trattamento in condizioni acide, che elimina il gruppo protettore.

L'utilizzo della funzione metossimetile come gruppo protettore facilmente rimovibile per i fenoli e la sua applicazione alla loro orto-metallazione selettiva è presentata per la prima volta da Stern, English e Cassidy nel 1957.¹ La letteratura riporta negli anni seguenti numerosi esempi in cui aril metossimetil eteri sono stati metallati con n-BuLi e successivamente trattati con diversi elettrofili per fornire un'ampia varietà di metossimetil eteri orto-sostituiti (Figura 3.5).² In particolare la reazione con DMF fornisce la corrispondente aldeide in alte rese.³

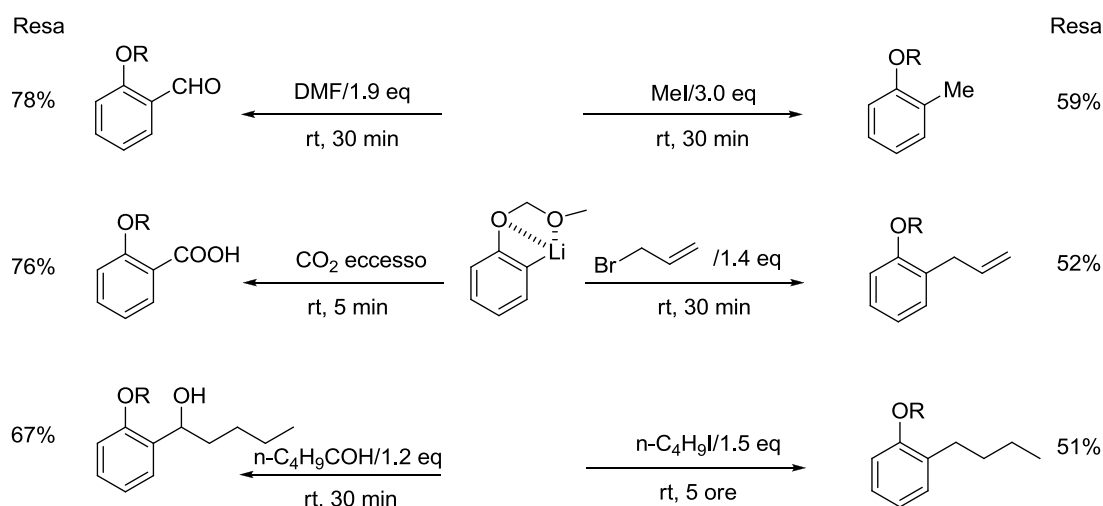


Figura 3.5: Esempi di sintesi di metossi metil aril eteri orto sostituiti.

Il reattivo alchillitio utilizzato nella metallazione è fortemente sensibile alla presenza di acqua, con la quale reagisce formando butano e LiOH, pertanto le procedure riportate in letteratura prevedono l'utilizzo di un eccesso di n-BuLi rispetto al reagente e condizioni

anidre dato che la presenza di tracce di acqua abbassa sensibilmente la resa della reazione. Per questi motivi le procedure riportate in letteratura prevedono l'utilizzo di DMF anidra, eventualmente distillata di fresco, in eccesso di almeno 2 equivalenti rispetto al precursore MOM protetto. A causa dell'elevato costo della ^{13}C DMF, essa è stata utilizzata senza procedere alla distillazione e in quantità stechiometrica rispetto al reagente di partenza. Nonostante le condizioni anidre in cui la reazione è stata eseguita, questo ha determinato l'ottenimento di rese molto inferiori a quelle riportate in letteratura, ma comunque accettabili per tutti i composti.

In questo modo si ottengono i derivati della salicilaldeide marcati al carbonio carbonilico che costituiscono i precursori per la sintesi degli *scaffold* **P1-P3**, il cui schema generale è riportato in figura 3.6. La sintesi dello *scaffold* **P1** prevede la metilazione della funzione fenolica, che avviene utilizzando CH_3I in presenza di base con rese quantitative. La sintesi dello *scaffold* **P2** prevede la sintesi del dimero corrispondente (**5**) che viene successivamente idrolizzato in presenza di 1 equivalente di base, mentre lo *scaffold* **P3** viene ottenuto direttamente dal trattamento del derivato aldeidico con EtPOCl_2 . La carica negativa sul gruppo fosfonato negli *scaffold* **P2** e **P3** è sviluppata per scambio ionico del sale di sodio ottenuto dopo l'idrolisi del composto **5** con tetrabutylammonio acetato. Come già accennato in precedenza, lo ione tetrabutylammonio garantisce la solubilità del composto in solvente organico, utilizzato per preparare le soluzioni madre e gli esperimenti di scambio.

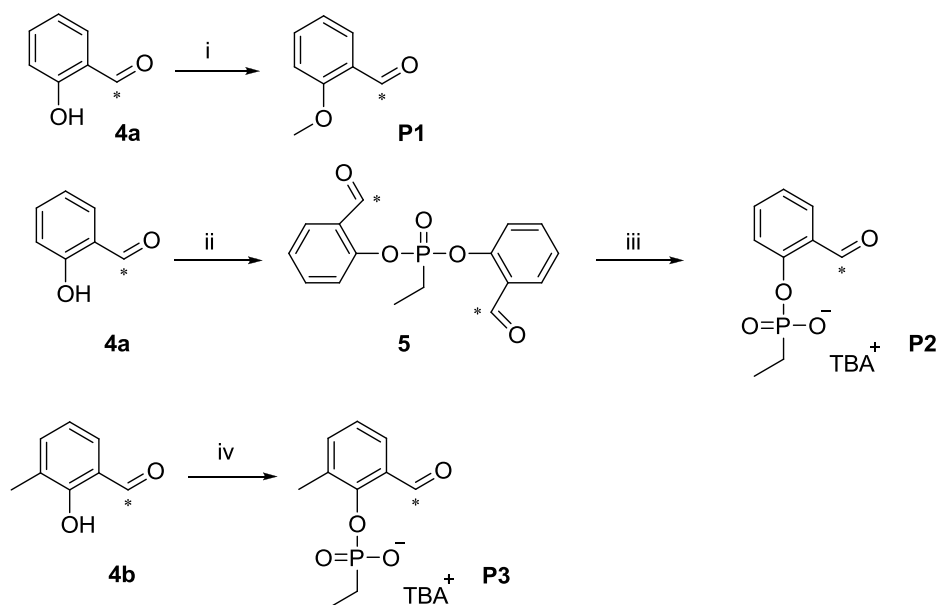


Figura 3.6: Schema generale per la sintesi degli *scaffold* **P1-P3**. i) CH_3I , K_2CO_3 , CH_3CN ; ii) NaH , EtPOCl_2 , THF; iii) NaOH , H_2O /acetone, $\text{TBA}^+ \text{AcO}^-$, CHCl_3 .

La sintesi del composto **P4** segue uno schema diverso rispetto a quello riportato per gli altri *scaffold*, presentato in figura 3.7.

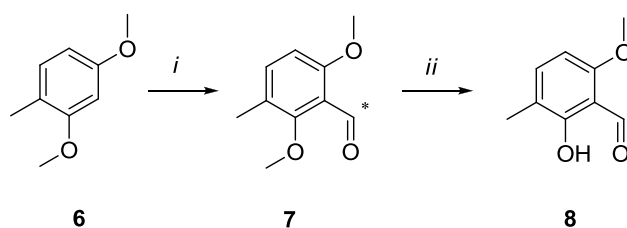


Figura 3.7: Schema di sintesi dello *scaffold* **P4**. i) n-BuLi, ^{13}C DMF, Et_2O ; ii) $\text{MgI}(\text{Et}_2\text{O})$, toluene.

Il primo *step* di sintesi prevede la formilazione con ^{13}C DMF come riportato in precedenza: l'introduzione del gruppo formile avviene selettivamente in posizione 2 (**7**), a causa dell'effetto orto-orientante dei due gruppi metossido presenti sulla molecola **6**. Successivamente la sintesi di **8** prevede una deprotezione selettiva del gruppo metossido in posizione 2 che viene effettuata con l'utilizzo di $\text{MgI}(\text{Et}_2\text{O})$, come riportato in letteratura.⁴ Analogamente a quanto avviene con BBr_3 o AlBr_3 , questo reattivo è utilizzato per la sintesi di fenoli in posizione orto a un carbonile a partire dai corrispondenti metossidi, per ottenere la deprotezione selettiva del metossido più ingombrato stericamente. La formazione di **8** avviene selettivamente in alte rese. Una volta ottenuto il derivato **8**, la sintesi di **P4** procede analogamente a quanto avviene per **P2**.

3.2.2 Sequenza NMR e ottimizzazione dei parametri

La sequenza NMR utilizzata per l'analisi delle miscele è il DEPT (*Distorsion Enhancement by Polarization Transfer*): questo esperimento consente di determinare il numero di protoni direttamente legati a un singolo nucleo ^{13}C , mantenendo la semplicità dello spettro totalmente disaccoppiato. L'esperimento DEPT è stato preferito a una procedura ^{13}C standard in quanto presenta sensibilità molto più elevate rispetto a una normale ^{13}C NMR disaccoppiato: questo permette di ottenere un elevato rapporto segnale/rumore con un minor numero di scansioni, accorciando notevolmente i tempi di analisi.

L'esperimento DEPT trae vantaggio da un trasferimento di magnetizzazione dal protone al carbonio ad esso direttamente legato: in particolare esso si compone di una sequenza multi-impulso che eccita entrambi i nuclei ^1H e ^{13}C . L'effetto macroscopico risulta in un

cambiamento dell'intensità dei segnali ^{13}C NMR che presentano un diverso numero di protoni legati a seconda delle condizioni sperimentali utilizzate. Negli esperimenti effettuati è stata utilizzata la sequenza DEPT90 che permette di rilevare selettivamente i gruppi C-H. Occorre inoltre considerare che, a differenza di quanto avviene in un normale esperimento ^{13}C NMR, il fattore di risposta del DEPT90 è poco sensibile a moderate variazioni della costante di accoppiamento $J_{\text{C-H}}$: oscillazioni dell'ordine del 20% del valore della costante di accoppiamento rispetto all'optimum portano comunque a un recupero di magnetizzazione superiore al 90%. Le molecole utilizzate durante questi studi presentano tutte valori di costante di accoppiamento $J_{\text{C-H}}$ molto simile (circa 170 Hz), valutabili tramite un semplice spettro ^{13}C NMR non disaccoppiato al protone. Questo permette di utilizzare il DEPT90 come metodologia quantitativa per l'analisi della miscela.

L'ottimizzazione dei parametri ha riguardato il valore di R_d (*Delaxation Delay*) da utilizzare negli esperimenti, con lo scopo massimizzare rapporto segnale/rumore utilizzando tempi di analisi non troppo lunghi. A questo scopo è stata preparata una soluzione di ^{13}C DMF in CD_3OD in concentrazione 2.5 mM, compatibile con le concentrazioni delle molecole marcate utilizzate durante gli esperimenti. Sono stati registrati spettri DEPT90 della soluzione, mantenendo costante il numero di scansioni e monitorando il rapporto segnale/rumore al variare di R_d . Si è scelto di utilizzare un valore di R_d pari a 10 s, che rappresenta un compromesso accettabile per ottenere un buon valore di rapporto segnale/rumore mantenendo brevi i tempi di analisi.

3.2.3 Assegnazione dei segnali

La prima parte del lavoro ha riguardato l'assegnazione dei segnali relativi a ogni specie. A questo scopo sono stati preparati 4 tubi NMR in ognuno dei quali è stata aggiunta una delle molecole utilizzate per la formazione della libreria **H**, **H+**, **A** e **A+**, in concentrazione 25 mM ciascuna. A ogni tubo vengono aggiunti gli *scaffold* uno alla volta, in concentrazione 2.5 mM ciascuno. Dopo ogni aggiunta viene registrato lo spettro DEPT90 relativo, in cui è presente il segnale relativo all'idrazone/immina che viene formato subito dopo l'aggiunta. Il confronto degli spettri permette di assegnare tutte le specie. Il largo eccesso di idrazide/immina presente nel tubo rispetto allo *scaffold* aggiunto (circa 10 equivalenti) garantisce la formazione quantitativa dell'idrazone/immina, permettendo di valutare in modo semplice il *chemical shift* relativo a ogni nuova specie formata. La figura 3.8 riporta come esempio gli spettri utilizzati per l'assegnazione del set di idrazoni **P1-4 H**.

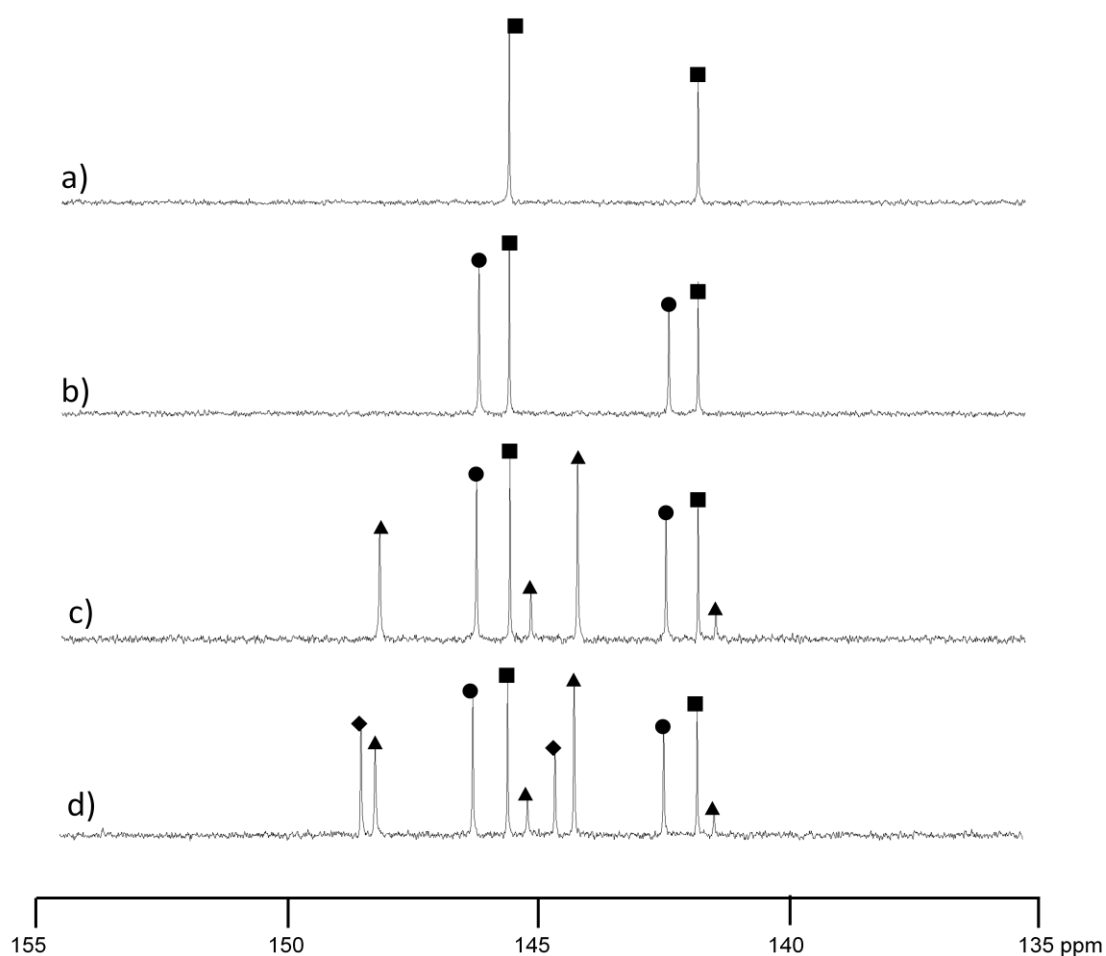


Figura 3.8: Assegnazione dei segnali relativi agli idrazoni **P1-4H** (a-d). Porzione di spettri DEPT90, 298K, CD₃OD, [H] = 25mM; a) [P1] ■ = 2.5 mM; b) [P1]=[P2] ● = 2.5 mM; c) [P1]=[P2]=[P4] ▲ = 2.5 mM; d) [P1]=[P2]=[P4]=[P3] ◆ = 2.5 mM.

Seguendo questa metodologia si evita la sintesi separata di ogni idrazone/immina. Occorre notare come ogni idrazone formato fornisca un set di 2 segnali, originati dalla presenza di due isomeri (per una discussione sull'isomeria negli idrazoni, si rimanda al capitolo 2, paragrafo 2.4). L'utilizzo quantitativo della spettroscopia ¹³C NMR permette di correlare l'area relativa a ogni segnale con la sua concentrazione in soluzione: per le molecole **P1-2H** il rapporto isomerico viene mantenuto analogo a quello ottenuto da esperimenti ¹H NMR. Infine lo spettro di figura 3.9c mostra come la molecola **P4H** presenti un set di 4 segnali attribuibili alla presenza in soluzione di 4 isomeri, due derivanti dall'isomeria cis-trans relativa al legame ammidico (segnali a 147.8 e 143.8 ppm), mentre altri due (144.7 e 141.0 ppm) sono originati da altri due isomeri in cui l'idrazone si trova fuori dal piano medio della molecola. Questi due isomeri, la cui struttura è confermata anche da calcoli su un modello teorico, sono presenti in

concentrazione molto bassa rispetto agli altri e sono probabilmente originati dall'elevato ingombro sterico introdotto dalla presenza dei gruppi metile e metossido in **P4**.

3.3 Esperimenti di scambio su P1 – P2

3.3.1 Determinazione delle condizioni

Un primo *set* di esperimenti è stato effettuato utilizzando solo lo *scaffold* **P1** in presenza di entrambe le coppie **H**, **H+** e **A**, **A+**. Esperimenti precedenti hanno già permesso di stabilire separatamente la stabilità relativa degli idrazoni/immine derivati da questo *scaffold*: questi dati sono stati utilizzati come base per la determinazione delle condizioni da utilizzare per il *design* della libreria contenente tutte le specie. In prima battuta è stato utilizzato lo *scaffold* **P1** non marcato (2-metossibenzaldeide), valutando il rapporto globale di immine rispetto agli idrazoni. A questo scopo sono state preparate delle soluzioni contenenti un diverso rapporto iniziale di idrazidi e ammine, di modo da poter valutare la formazione di immine rispetto a quello di idrazoni. In particolare la concentrazione di idrazidi aggiunte è stata mantenuta costante, utilizzando 1 equivalente di ogni idrazide rispetto allo scaffold (8 mM), mentre la concentrazione di ammine è stata variata in un range tra 20 equivalenti e 80 equivalenti ognuna. Gli spettri ottenuti dopo l'equilibratura mostrano che la concentrazione di immine formate rimane molto bassa rispetto alla quantità totale di idrazoni (immine 10%, idrazoni 90%) anche utilizzando concentrazioni molto alte di ammine (fino a 640 mM). Inoltre queste concentrazioni sono molto vicine al limite di solubilità dell'ammina **A+** in metanolo, e pertanto non possono essere utilizzate per la formazione della libreria.

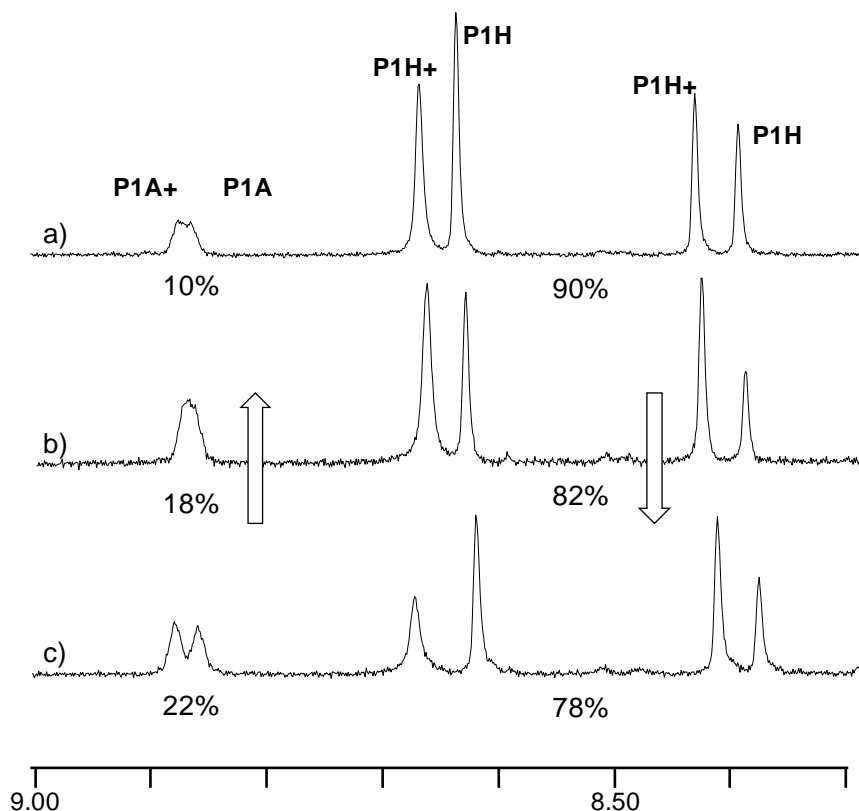


Figura 3.9: Spettri ¹H NMR relativi all'equilibrio immine-idrazoni per lo scaffold **P1**. 298 K, CD₃OD. a) [P1] = 8mM, [H]=[H+]=8mM, [A]=[A+]=160 mM (20eq); b) [P1] = 5mM, [H]=[H+]=3.5 mM (0.7 eq), [A]=[A+]= 300 mM (60 eq); c) [P1] = 5mM, [H]=[H+]=3mM (0.6 eq), [A]=[A+]= 250 mM (50 eq).

La produzione immine è stata favorita utilizzando concentrazioni di idrazide in quantità substechiomertica rispetto allo *scaffold* aggiunto. Occorre precisare che queste condizioni non inficiano la presenza di un equilibrio di scambio che è comunque presente all'interno del sistema. Lo scambio infatti coinvolge l'idrazide e l'idrazone: questo implica l'assenza di aldeide libera che può sottrarre l'idrazide all'equilibrio di scambio. Questa condizione è garantita normalmente utilizzando un eccesso di idrazide rispetto all'aldeide aggiunta, ma è altresì verificata in presenza di un secondo equilibrio che coinvolge l'aldeide libera, sottraendola alla soluzione. Questo è il caso del sistema in esame: la presenza di un largo eccesso di ammina in soluzione determina la formazione di un equilibrio di formazione di immina, che sposta quello di formazione di idrazone. In questo modo non è presente aldeide libera in soluzione e gli idrazoni/immine così formati saranno sottoposti a un equilibrio di scambio con le idrazidi/ammine rimaste in soluzione. Appare evidente che occorre utilizzare un eccesso di ammine sufficiente a poter spostare l'equilibrio di formazione di idrazone: questo è facilmente verificabile controllando che sia verificata la presenza di idrazide libera in soluzione.

Le condizioni da utilizzare durante i *test* di formazione della libreria sono state scelte in base a questi esperimenti, utilizzando una quantità substechiometrica di idrazione (0.7 eq ciascuno) e un eccesso di 40 equivalenti di ogni ammina rispetto allo *scaffold* aggiunto.

3.3.2 Test cinetici di formazione della libreria

Sono stati svolti degli esperimenti preliminari su una libreria ristretta, formata dai due *scaffold* **P1** e **P2** e da tutte le idrazidi (**H** e **H+**) e ammine (**A** e **A+**), con lo scopo di valutare la formazione dei corrispondenti idrazoni e immine. Durante questi esperimenti sono stati utilizzati gli *scaffold* marcati, valutando la formazione delle nuove specie tramite spettroscopia ^{13}C NMR. L'utilizzo di molecole marcate e di una sequenza DEPT90 ottimizzata permettono di registrare uno spettro ogni 6 minuti, con un rapporto segnale-rumore largamente sufficiente a determinare con accuratezza gli integrali relativi alle specie formate, permettendo di seguire l'evoluzione cinetica del sistema.

Un primo esperimento è stato effettuato aggiungendo in un tubo NMR le quattro idrazidi/ammine (430 mM per ogni ammina, 7.6 mM per ogni idrazide) e infine lo *scaffold* **P1** (11 mM), registrando gli spettri DEPT90 relativi alla miscela ogni 6 minuti. Le specie che si formano risultano ben separate sullo spettro (le immine risuonano attorno a 160 ppm, mentre gli idrazoni attorno a 140 ppm), pertanto è stato possibile seguire con un unico esperimento l'evoluzione delle quattro specie **P1H**, **P1H+**, **P1A** e **P1A+**. Una volta raggiunto l'equilibrio, quando le concentrazioni di tutte le specie risultano costanti, viene aggiunto lo *scaffold* **P2**, in quantità equimolare rispetto a **P1**. Il sistema risponde all'aggiunta del secondo *scaffold* con la formazione di un secondo set di molecole (**P2H**, **P2H+**, **P2A** e **P2A+**) le quali vengono coinvolte a loro volta negli equilibri di scambio. La figura 3.10 riporta la cinetica relativa alle due aggiunte, per chiarezza gli idrazoni e le immine vengono riportate in due grafici separati.

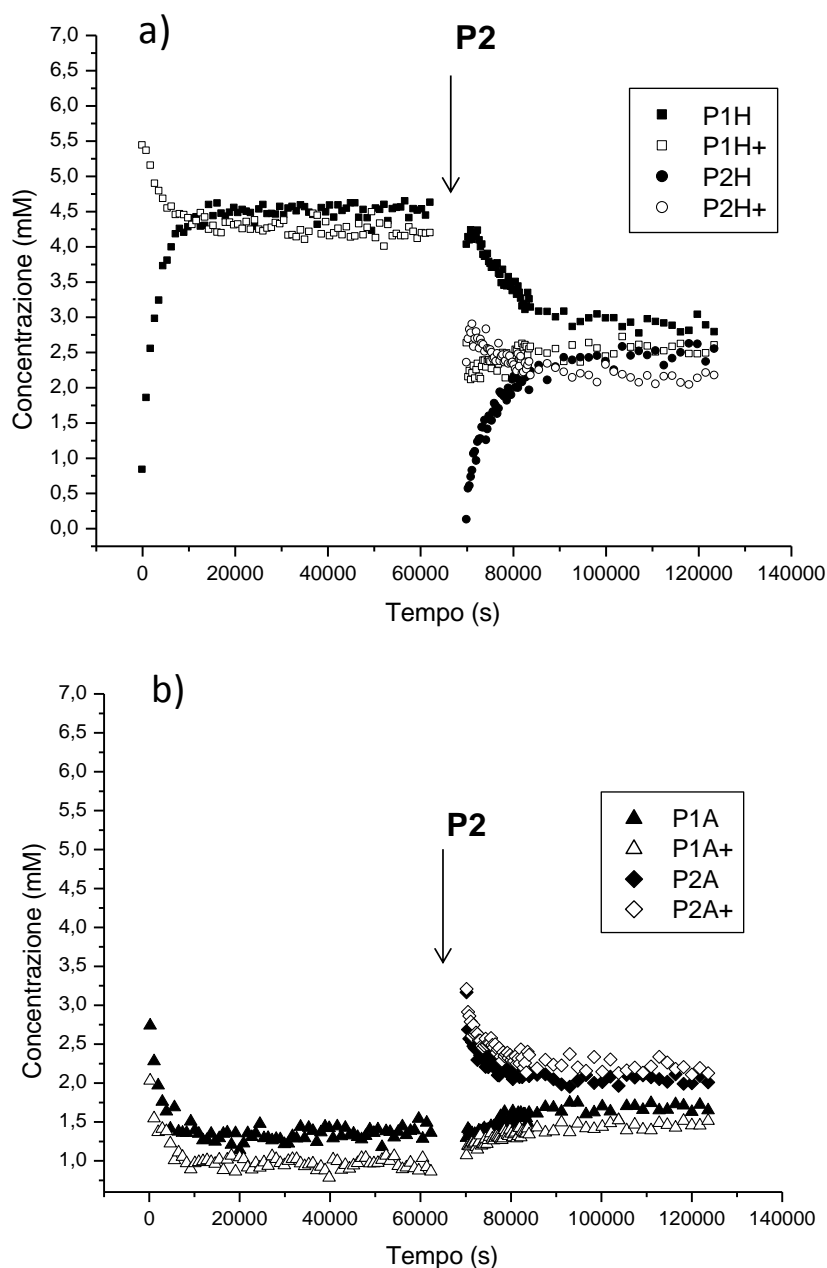


Figura 3.10 : Cinetica relativa alla formazione e allo scambio di una libreria formata dai due scaffold **P1** e **P2** e dalle quattro idrazidi/ammine **H**, **H+**, **A**, **A+**. Per chiarezza si riportano in due grafici separati a) gli idrazoni, b) le immine. La freccia indica il momento dell'aggiunta dello scaffold **P2**. 298K, CD₃OD. a) **[P1]** 11 mM, **[H]=[H+]**= 8 mM, **[A]=[A+]**= 420 mM. b) **[P1] = [P2]**= 8.5 mM, **[H]=[H+]**= 6 mM, **[A]=[A+]**= 320 mM.

In prima battuta i due isomeri di ogni idrazone sono considerati come un'unica specie, pertanto in figura 3.10 la concentrazione di ogni idrazone è ottenuta dalla somma degli integrali relativi ai due isomeri. La figura 3.11 mostra a titolo di esempio come sia tuttavia possibile seguire separatamente l'evoluzione della concentrazione dei due isomeri:

potenzialmente risulta possibile seguire la formazione di 12 specie diverse, 4 immine e 8 idrazoni.

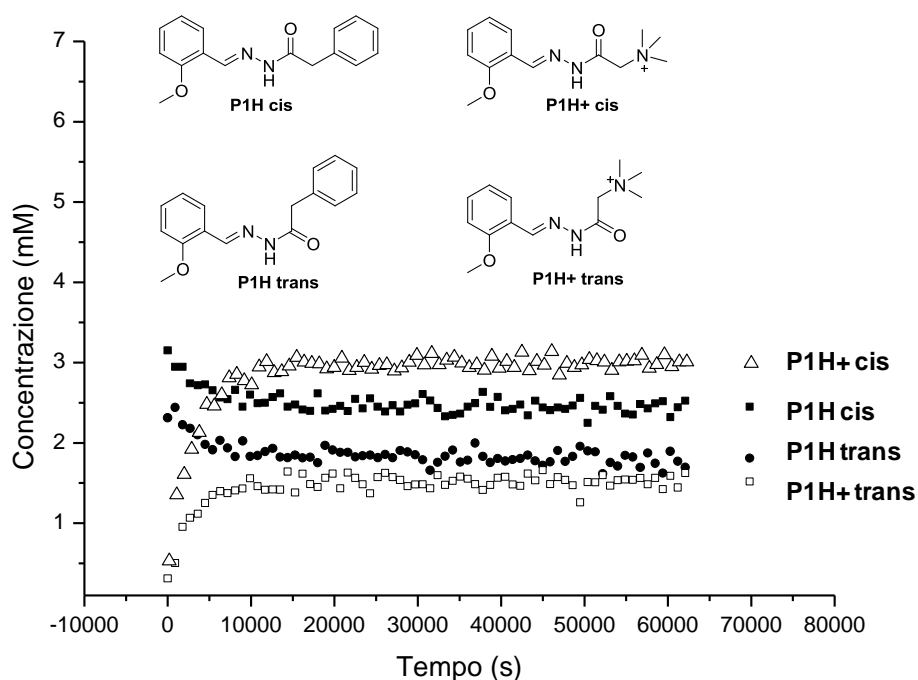


Figura 3.11 : Formazione e equilibrizzazione delle specie **P1H**, **P1H+**. 298K, CD_3OD , $[\text{P1}] = 11\text{mM}$, $[\text{H}] = [\text{H}^+] = 7.6 \text{ mM}$.

La prima parte dei grafici 3.10a e 3.10b riguarda la formazione e lo scambio relativi a **P1H**, **P1H+**, **P1A** e **P1A+**. L'equilibrio di scambio viene raggiunto dopo circa 5 ore (20000 sec), quando le concentrazioni degli idrazoni e delle immine risultano costanti. Come atteso, all'equilibrio le concentrazioni degli idrazoni risultano più alte rispetto a quelle delle rispettive immine, a causa della loro differente stabilità termodinamica, già discussa in precedenza. Una volta raggiunto l'equilibrio termodinamico viene aggiunto lo *scaffold* **P2** di modo che la sua concentrazione, una volta corretta per la diluizione, sia analoga a quella dello *scaffold* **P1**. Una volta formate, le nuove molecole scambiano con le idrazidi/ammine presente in soluzione fino a raggiungere nuovamente l'equilibrio termodinamico, dopo circa 8 ore dalla seconda aggiunta.

L'interpolazione degli andamenti delle concentrazioni nel tempo risulta tutt'altro che semplice per questo sistema: la scelta di utilizzare quantità substechiometrica di idrazidi **H** e **H+** rispetto allo *scaffold* infatti implica che gli equilibri che coinvolgono i due *scaffold* **P1** e **P2** non possano essere considerati indipendenti. L'aggiunta dello *scaffold* **P2** infatti modifica notevolmente l'equilibrio di scambio tra gli idrazoni **P1H** e **P1H+** (Figura 3.11a): le due aldeidi infatti competono per le stesse idrazidi, presenti in difetto rispetto alla

quantità totale di *scaffold*. Questo determina un riarrangiamento del sistema in cui la posizione finale dell'equilibrio è determinata dall'esistenza contemporanea di più reazioni competitive. La composizione all'equilibrio riflette comunque la stabilità termodinamica relativa delle specie, tuttavia la risposta del sistema all'aggiunta della molecola che determina il riconoscimento molecolare (**P2**), risulta molto minore di quella ottenibile con l'utilizzo di un eccesso di idrazidi, in quanto la presenza di un equilibrio di competizione interferisce con lo spostamento dell'equilibrio causato dal riconoscimento molecolare. Per contro, la figura 3.11b mostra come l'equilibrio relativo alle due specie **P1A** e **P1A+** venga influenzato solo in minima parte dall'introduzione dello *scaffold* **P2**: la presenza in soluzione di un largo eccesso di ammine libere (circa 40 equivalenti di ogni ammina rispetto alla quantità totale di *scaffold*) fa sì che gli effetti competitivi in questo caso vengano notevolmente ridotti.

Questi esperimenti evidenziano le limitazioni relative all'utilizzo di una libreria estesa i cui membri presentino stabilità relative molto diverse. Le condizioni sperimentali necessarie all'analisi della libreria – ovvero l'utilizzo di idrazidi in quantità substechiometriche con lo scopo di favorire la produzione di immine – determinano la formazione di equilibri competitivi tra gli *scaffold* che complicano l'analisi dell'equilibrio di scambio, di modo che la presenza di un riconoscimento molecolare determina uno *shift* della libreria molto minore di quello atteso e difficilmente rilevabile. Per questo motivo si è deciso di effettuare un'analisi separata di idrazoni e immine, dividendo la libreria in due sub-librerie più piccole, in cui i membri non presentino stabilità termodinamiche relative troppo diverse.

3.4 Libreria di idrazoni

Gli esperimenti effettuati hanno mostrato l'importanza del controllo delle condizioni in cui svolgere l'equilibratura della libreria: in particolare la variazione della concentrazione delle specie aggiunte determina importanti cambiamenti nella composizione all'equilibrio. Di conseguenza la progettazione di una libreria estesa a tutti quattro gli *scaffold* prevede un primo *step* di controllo della concentrazione delle soluzioni madre utilizzate nella preparazione degli esperimenti. Il controllo è effettuato per ogni soluzione di *scaffold* utilizzando una soluzione di ^{13}C DMF come standard interno, valutando la concentrazione di ogni soluzione tramite spettroscopia ^1H NMR dal confronto del

segnale relativo al protone ammidico della ^{13}C DMF rispetto al protone aldeidico relativo a ogni *scaffold*. Si è scelto di utilizzare la ^{13}C DMF anziché l'analogo non marcato in modo da poter svolgere la calibrazione prima di ogni esperimento DEPT. Occorre precisare che la presenza di ^{13}C DMF non interferisce con l'equilibratura della libreria: in primo luogo essa non reagisce con idrazidi o ammine per formare prodotti secondari e inoltre il segnale relativo al carbonio ammidico rilevabile durante gli esperimenti DEPT risuona a una frequenza diversa da quella degli idrazoni e delle immine formati.

Una volta preparate le soluzioni di *scaffold* in CD_3CN esse vengono conservate in recipienti chiusi a 4°C , tuttavia l'evaporazione del solvente determina cambiamenti nella concentrazione che rende necessaria la preparazione delle soluzioni prima di ogni esperimento. Effettuando la calibrazione con ^{13}C DMF si ottiene il valore di concentrazione della soluzione madre di *scaffold* senza doverla preparare di fresco, limitando la quantità di prodotto marcato da utilizzare. L'esperimento di calibrazione prevede la preparazione di una soluzione di ^{13}C DMF in CD_3CN di concentrazione nota, che viene preparata di fresco prima di ogni esperimento. In un tubo NMR viene aggiunto un volume noto di soluzione calibrante e di soluzione madre di *scaffold* di cui occorre determinare la concentrazione. Registrando lo spettro ^1H NMR relativo alla miscela è possibile confrontare i segnali relativi alle due specie, risalendo alla concentrazione reale della soluzione di *scaffold* della soluzione madre. La figura 3.12 mostra a titolo di esempio alcuni spettri utilizzati per la calibrazione.

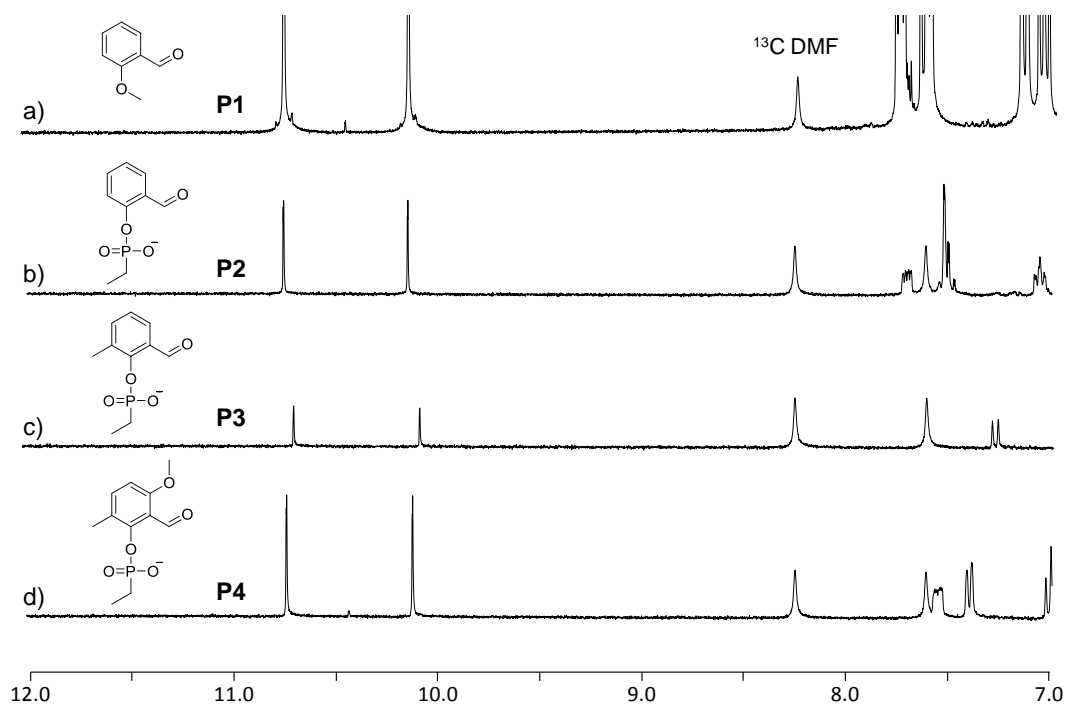


Figura 3.12 : Spettri ^1H NMR utilizzati per la calibrazione. In ogni tubo registrato in CD_3OD a 298 K viene aggiunta ^{13}C DMF 4.34 mM e la soluzione da determinare di a) **P1**, b) **P2**, c) **P3**, d) **P4**.

Si noti come il segnale ^1H NMR relativo al protone ammidico della ^{13}C DMF e a quello aldeidico dello *scaffold* marcato siano presenti come doppietto: questo è dovuto all'accoppiamento H-C tra il protone e il carbonio marcato a esso direttamente legato. Le sequenze utilizzate per spettri ^1H NMR normalmente non prevedono il disaccoppiamento protone-carbonio in quanto esso è visibile solo sui nuclei ^{13}C , la cui abbondanza isotopica naturale è circa 1.1%. Nel caso di molecole marcate al ^{13}C , tale accoppiamento diventa rilevabile, determinando la formazione di un doppietto la cui costante J riflette l'accoppiamento tra protone e carbonio. Questo *splitting* si osserva sia per il segnale relativo a ^{13}C DMF sia per quello relativo all'aldeide marcata, determinando per entrambi un dimezzamento dell'intensità dei segnali che diventano direttamente confrontabili.

3.4.1 Costruzione della libreria

Una prima libreria è stata costruita utilizzando i quattro *scaffold* **P1-4** e le due idrazidi **H** e **H+**. La libreria risulta così composta da 8 idrazoni, tuttavia il numero totale di specie in soluzione risulta maggiore se si considerano anche tutti gli isomeri relativi a ogni idrazone, arrivando ad un totale di 18 specie. Gli esperimenti di assegnazione effettuati in precedenza non sono sufficienti ad assegnare in modo univoco tutte le specie: molte molecole infatti presentano segnali che risuonano a *chemical shift* molto simili, pertanto

piccoli cambiamenti della forza ionica della soluzione rispetto agli esperimenti di assegnazione può determinare lo *shift* di alcuni segnali complicando notevolmente la procedura di assegnazione. Per aggirare il problema si è deciso di preparare due soluzioni separate, ognuna contenente tutti quattro gli *scaffold* in concentrazione 2.5 mM ciascuno e un eccesso di una delle idrazidi (**H** oppure **H+**). In questo modo ognuna delle due soluzioni conterrà 2.5 mM di ogni idrazione proveniente dagli *scaffold* **P1-4** e un eccesso di ognuna delle idrazidi. L'esperimento viene preparato aggiungendo in un tubo NMR un eguale volume di ogni soluzione, di modo che risulti composto da tutti quattro gli *scaffold* in concentrazione 2.5 mM ciascuno e da un eccesso di entrambe le idrazidi. La soluzione contenente l'eccesso di **H+** viene aggiunta per prima nel tubo, in un volume pari a metà del volume finale della soluzione. La restante aggiunta, costituita dalla soluzione contenente l'eccesso di **H**, viene effettuata in due tempi diversi, di modo che la soluzione finale contenga 2.5 mM tutti gli idrazoni, 1.25 mM provenienti da ogni soluzione separata, e un eccesso di entrambe le idrazidi. Uno spettro DEPT viene registrato dopo ogni aggiunta, in condizioni in cui l'equilibrio di scambio non è ancora stato raggiunto per tutti gli idrazoni. In queste condizioni l'aggiunta della soluzione in due tempi provoca l'aumento dell'intensità dei segnali relativi alle specie che vengono aggiunte man mano, che possono pertanto essere assegnate più agevolmente. Se lo scambio è sufficientemente lento, l'aumento di intensità sarà proporzionale al volume di soluzione aggiunto: dal confronto dei segnali degli spettri registrati prima e dopo le due aggiunte si identificano i segnali che presentano un variazione in linea con il volume aggiunto. Questa strategia permette di distinguere più facilmente i segnali relativi agli idrazoni originati dall'idrazide **H**, in modo da facilitare l'assegnazione dei segnali. Risulta ovvio che l'aumento di intensità è proporzionale al volume aggiunto solo nel caso in cui l'equilibrio di scambio risulti più lento del tempo necessario a registrare lo spettro.

Assieme agli esperimenti di assegnazione già descritti, questa strategia ha permesso di attribuire con più facilità i segnali relativi a ogni specie. La figura 3.13 mostra gli spettri relativi alle due aggiunte successive della soluzione contenente l'idrazide **H**: le frecce indicano i segnali che mostrano un aumento di intensità proporzionale al volume aggiunto. In particolare si noti che i segnali identificabili appartengono alle specie **P1H** (■), **P2H** (●) e **P3H** (◆) e ai loro rispettivi isomeri: questo risultato è in accordo con quanto rilevato dagli esperimenti di cinetica di equilibrizzazione, svolti con gli *scaffold* **P1** e **P2** (vedi paragrafo 3.3.2) i quali indicano che nella miscela in esame le specie **P1H** e **P2H** raggiungono l'equilibrio piuttosto lentamente.

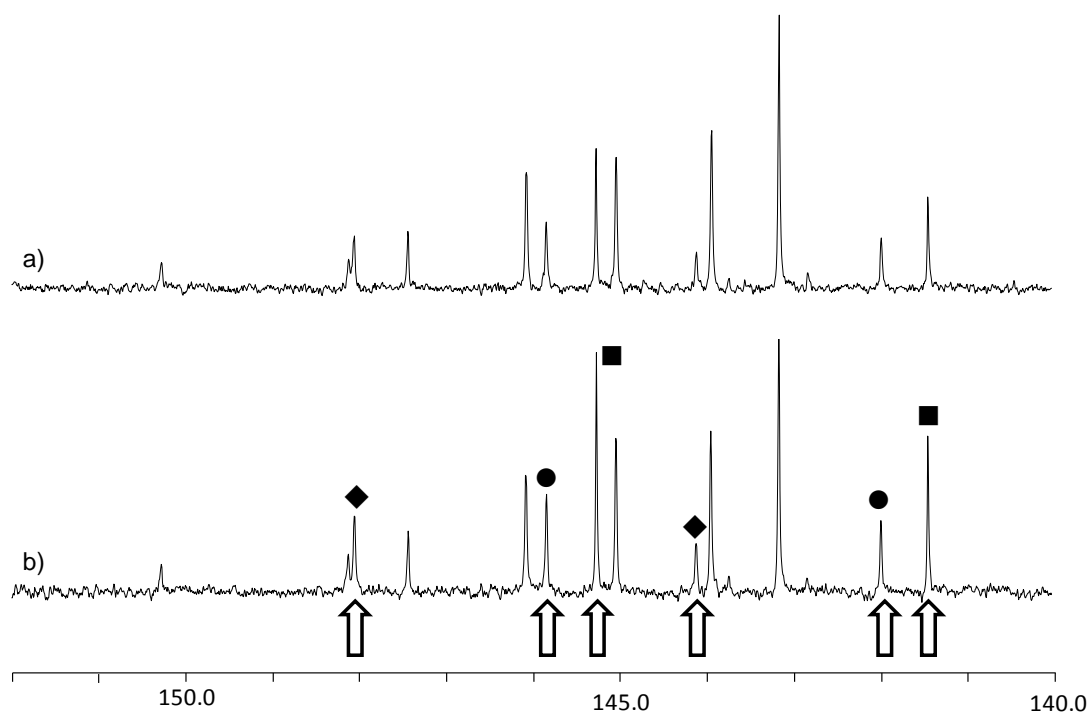


Figura 3.13: Spettri DEPT registrati prima del raggiungimento dell'equilibrio, in cui sono presenti tutti gli idrazoni **P1-4H** e **P1-4H+** e **H**, **H+** in eccesso, CD_3OD , 298K. Gli spettri sono registrati immediatamente a) dopo la prima aggiunta della soluzione contenente **H** in eccesso, b) dopo la seconda aggiunta. Le frecce indicano i segnali la cui intensità è aumentata a seguito della seconda aggiunta, che possono pertanto essere facilmente identificati.

La soluzione contenente l'intera libreria di idrazoni è mantenuta a 50°C per 2 giorni, per favorire il raggiungimento dell'equilibrio, dopodiché è stata analizzata con un semplice esperimento DEPT. La figura 3.14 riporta lo spettro ottenuto, mostrando per confronto anche gli spettri utilizzati per l'assegnazione. I segnali relativi a tutte le 18 specie sono chiaramente visibili e integrabili dopo 20 minuti di acquisizione. Dall'integrazione dei segnali è possibile valutare la concentrazione all'equilibrio di ogni specie.

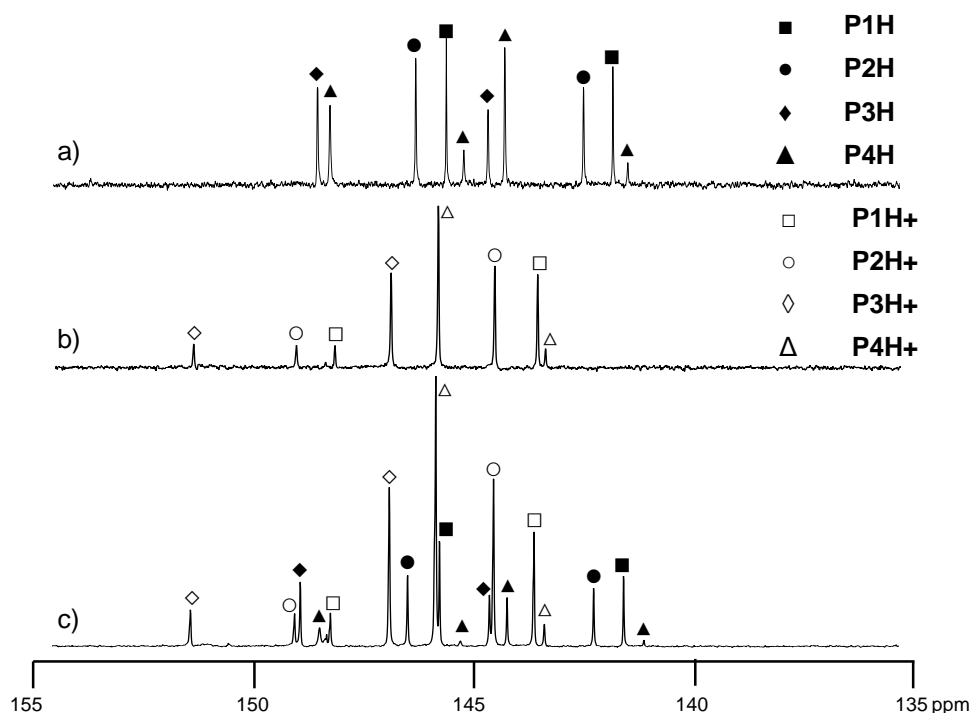


Figura 3.14: Porzione di spettro DEPT, CD_3OD , 298 K. a) $[\text{P1-4}] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{H}] = 25 \text{ mM}$; b) $[\text{P1-4}] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{H+}] = 25 \text{ mM}$, c) libreria completa di idrazoni, dopo equilibratura $[\text{P1-4}] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{H}] = [\text{H+}] = 25 \text{ mM}$.

3.4.2 Analisi all'equilibrio

L'analisi della miscela all'equilibrio è stata effettuata con l'approssimazione che gli equilibri relativi ai diversi *scaffold* fossero tutti indipendenti tra loro. Occorre tenere presente infatti che gli equilibri di formazione e di scambio di idrazoni competono tra loro per le idrazidi libere presenti in soluzione, determinando la formazione di una rete molto complessa di equilibri la cui analisi completa risulta piuttosto complicata. L'utilizzo di un eccesso di idrazidi libere permette di considerare separatamente gli equilibri di scambio relativi ai diversi *scaffold*, considerandoli tutti indipendenti fra loro. Per questo motivo si è scelto di utilizzare una concentrazione di ogni idrazide libera pari a 25 mM ciascuna, la bontà dell'assunzione è dimostrata anche dal fatto che, aumentando la concentrazione delle idrazidi libere a 40 mM ciascuna, non si osservano cambiamenti rilevanti nella composizione di equilibrio della miscela.

Utilizzando l'esperimento DEPT come tecnica quantitativa, è possibile ottenere il valore della concentrazione di ogni specie all'equilibrio. Per ogni idrazone vengono quantificati tutti gli isomeri, i risultati vengono riportati in tabella 3.1.

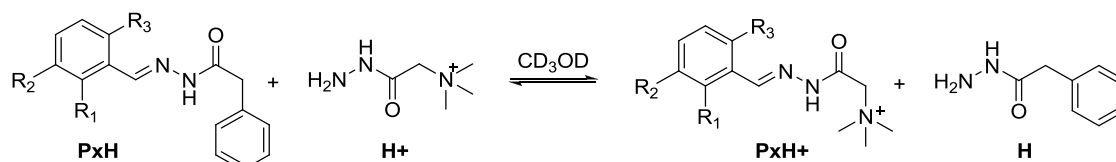
Tabella 3.1: Valori di area e di concentrazione all'equilibrio relative alle specie presenti nella libreria ottenuti dallo spettro DEPT

	P_xH		P_xH⁺		Somma	
	<i>Isomero cis</i>	<i>Isomero trans</i>	<i>Isomero trans</i>	<i>Isomero cis</i>		
P1	Area ^a	4.7	3.9	8.7	2.8	20.1
	(%)	(55)	(45)	(75)	(25)	
	C (mM)	0.52	0.43	0.96	0.31	
P2	Area	4.7	3.7	13.1	2.8	24.4
	(%)	(56)	(44)	(82)	(18)	
	C (mM)	0.44	0.35	1.23	0.26	
P3	Area	4.4	3.4	13.4	3.2	24.3
	(%)	(56)	(44)	(81)	(19)	
	C (mM)	0.40	0.31	1.22	0.29	

	P_xH				P_xH⁺		Somma	
	<i>Isomero cis</i>	<i>Isomero trans</i>	<i>Isomero b^b</i>	<i>Isomero a</i>	<i>Isomero trans</i>	<i>Isomero cis</i>		
	P4	Area ^a	3.3	2.2	0.51	0.32		23.2
	(%)	(52)	(34)	(8)	(6)	(94)	(6)	
	C (mM)	0.24	0.16	0.04	0.02	1.67	0.11	2.24

CD₃OD, 298K. a) I valori di area riportati vengono ottenuti dopo normalizzazione del totale a 100. b) La specie **P4H** origina un totale di 4 isomeri: vengono indicati rispettivamente con a e b i due isomeri minoritari, pari a circa 20% della concentrazione totale di idrazone, che sono stati attribuiti a un'isomeria in cui l'idrazone si trova fuori dal piano medio della molecola.

Con l'assunzione che gli equilibri relativi ai diversi *scaffold* siano tutti indipendenti, il sistema può essere descritto da 4 equilibri di scambio, ognuno riguardante uno *scaffold* diverso, il cui schema generale è riportato in figura 3.15.

**Figura 3.15:** Schema generale dell'equilibrio di scambio relativo ai diversi idrazoni.

Dalle concentrazioni di equilibrio ottenute, è possibile determinare il valore dell'energia libera standard relativa a ogni equilibrio che dipende dalla stabilità relativa delle specie **P_xH** e **P_xH⁺**. Come trattato nel capitolo 2, questa differenza ha origine da un'interazione intramolecolare tra il gruppo **R1** e i gruppi presenti sull'idrazone. In particolare si osserva

un'interazione stabilizzante nel caso in cui sulla molecola siano presenti il gruppo ammonio e il gruppo fosfonato. La natura dei gruppi R_2 e R_3 sullo *scaffold* modula tale interazione, determinando il cambiamento del valore della costante relativa allo scambio. Come per gli esperimenti presentati nel Capitolo 2, questa interazione è quantificabile dai valori di energia libera ottenuti da questi esperimenti, riferiti alla condizione in cui il riconoscimento molecolare non è presente. Come in precedenza, il riferimento è costituito dalla coppia $P1H/P1H^+$. I valori delle costanti di equilibrio e di energia libera di scambio sono riportati in tabella 3.2.

	$P_xH + H^+ \leftrightarrow P_xH^+ + H^b$ ΔG° kJ/mol (298K) (K_{eq})
P_1	-0.02 (1.01)
P_2	-0.8 (1.42)
P_3	-1.2 (1.61)
P_4	-2.7 (2.95)

Tabella 3.2: Valori di K_{eq} e di ΔG° kJ/mol relativa all'equilibrio di scambio, ottenuti utilizzando le concentrazioni ricavate dall'esperimento DEPT.

3.5 Libreria di immine

Lo studio della libreria di immine si è svolto in maniera analoga a quello effettuato sulla libreria di idrazoni, utilizzando i quattro *scaffold* **P1-4** e le due ammine **A** e **A+**.

Il primo passo nella progettazione della libreria è l'assegnazione dei segnali. Essa viene effettuata come per gli idrazoni, aggiungendo una alla volta i quattro *scaffold* **P1-4** a una soluzione contenente l'ammina in eccesso e registrando lo spettro DEPT dopo ogni aggiunta. In questo caso l'assegnazione dei segnali risulta molto più semplice dato che le immine non presentano isomeria e pertanto a ogni nuova immina formata corrisponde un unico segnale. La libreria viene facilmente formata mescolando uguali volumi delle soluzioni utilizzate per l'assegnazione, di modo da avere **P1-4** 2.5 mM e un eccesso di ognuna delle ammine, presenti in concentrazione 25 mM nella soluzione finale. L'evoluzione dell'equilibrio della miscela mantenuta a 50°C è stata seguita per 8 giorni, monitorando la miscela fino a composizione costante. Un'aggiunta di TFA in concentrazione catalitica (0.1%) dopo 8 giorni non ha portato alcun cambiamento nella composizione di equilibrio. Il risultato è riportato in figura 3.16 in cui si riportano per confronto anche gli spettri utilizzati per l'assegnazione.

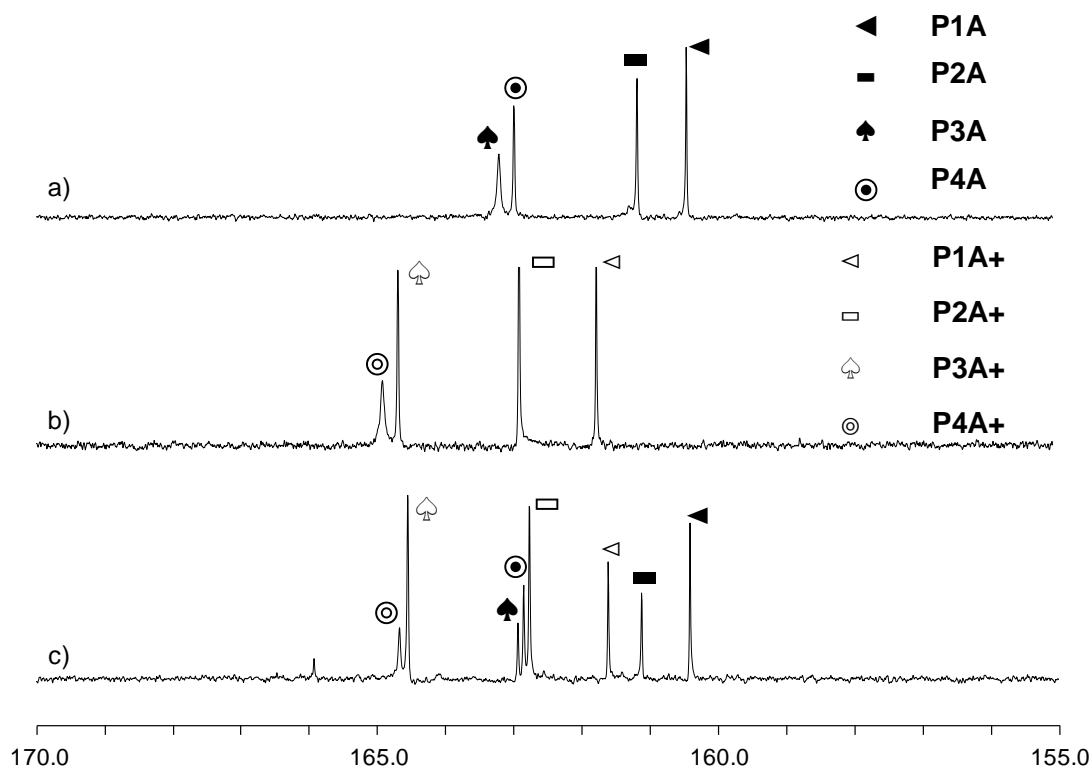


Figura 3.16: Spettri DEPT utilizzati negli esperimenti, CD_3OD , 298K. a) assegnazione dei segnali delle immine derivate da **A** [**P1-4**] = 2.5 mM, [**A**] = 25 mM; b) assegnazione delle immine derivate da **A+** [**P1-4**] = 2.5 mM, [**A+**] = 25 mM; c) miscela all'equilibrio [**P1-4**] = 2.5 mM, [**A**] = [**A+**] = 25 mM.

La concentrazione all'equilibrio è stata determinata dall'integrazione dei segnali relativi a ogni specie: dalla composizione all'equilibrio sono state calcolate le costanti di equilibrio K_{eq} relative allo scambio per ogni *scaffold*. Anche in questo caso, le condizioni sperimentali sono state scelte in modo da poter considerare indipendenti tutti gli equilibri di scambio, pertanto sono state utilizzate le stesse condizioni utilizzate per la libreria di idrazoni.

Nel caso dello *scaffold* **P4** si sono evidenziati dei problemi nel raggiungimento dell'equilibrio: in particolare vengono evidenziati dei segnali non presenti negli esperimenti di assegnazione che vengono attribuiti a una degradazione della specie **P4A+**. Per questo motivo si è deciso di studiare separatamente l'equilibrio di scambio relativo allo *scaffold* **P4**.

La tabella 3.3 riporta le concentrazioni di equilibrio della miscela.

Tabella 3.3 : Valori di area e di concentrazione all'equilibrio relative alle specie presenti nella libreria ottenuti dallo spettro DEPT

		P_xA	P_xA^+
P_1	Area ^a	54.6	45.4
	C (mM)	1.22	1.00
P_2	Area	29.8	70.2
	C (mM)	0.68	1.60
P_3	Area	18.7	81.3
	C (mM)	0.42	1.81

CD₃OD, 298K. a) I valori di area riportati vengono ottenuti dopo normalizzazione del totale a 100.

Una volta ottenute le concentrazioni di equilibrio, è possibile ottenere i valori di energia di stabilizzazione di ogni specie, riportati in tabella 3.4

Tabella 3.4: valori di energia di stabilizzazione ottenuti dalla libreria di immine.

	$P_xA + A^+ \leftrightarrow P_xA^+ + A$ ΔG° kJ/mol (298K) (K_{eq})
P_1	-0.2 (1.08)
P_2	-2.8 (3.10)
P_3	-4.3 (5.68)

3.6 Confronto delle stabilità termodinamiche

I valori di ΔG° che si ottengono da questi esperimenti possono dare informazioni sull'evento di riconoscimento molecolare e sull'entità della sua forza. In particolare l'energia di stabilizzazione, espressa da ΔG° fornisce il valore dell'interazione intramolecolare all'interno di ogni specie.

Occorre tuttavia precisare che le condizioni che sono state scelte per la formazione delle libreria non permettono un confronto diretto tra le specie originate da *scaffold* diversi: l'assunzione secondo cui gli equilibri sono indipendenti fra di loro da una parte semplifica notevolmente l'analisi del sistema all'equilibrio, dall'altra impedisce una competizione

diretta tra gli *scaffold* negli equilibri di scambio, non permettendo di ottenere valori di energia assoluti. Analogamente a quanto evidenziato dagli studi riportati nel capitolo 2, la scelta di un sistema di riferimento su cui calcolare l'energia risulta necessario e cruciale per la razionalizzazione dei risultati ottenuti: un buon sistema di riferimento è costituito da una specie in cui non sia presente alcuna interazione stabilizzante. Il livello energetico rappresentato da questa specie costituisce il riferimento per tutte le altre, facilitando il confronto tra i vari *scaffold*.

Alla luce di ciò risulta evidente che nessuna delle specie presenti nella libreria di idrazoni può essere utilizzata come riferimento: questo è una conseguenza dell'esistenza di un'interazione intermolecolare di tipo legame idrogeno tra il gruppo fosfonato e la parte ammidica dell'idrazone, ben evidenziato nel capitolo 2. Risulta pertanto necessario utilizzare un sistema di riferimento esterno, in cui questa interazione sia esclusa. Un buon riferimento è costituito dalle immine derivate da **A**, in cui non si evidenzia la presenza di alcuna interazione. I derivati **P1-4A** non mostrano alcun tipo di interazione con i gruppi presenti sullo *scaffold*, pertanto possono essere convenientemente usati come riferimento.

Occorre precisare infine come questi confronti vengano effettuati non sulle stabilità assolute delle molecole in esame, ma sulla stabilizzazione introdotta dal riconoscimento molecolare. Gli esperimenti non forniscono alcuna informazione riguardo alla stabilità assoluta delle molecole, ma possono evidenziare differenze nella stabilità indotta dalla presenza di determinati gruppi sullo *scaffold*.

L'utilizzo delle immine come riferimento prevede la misura della stabilità relativa delle coppie immina/idrazone. Questo dato non è ottenibile in modo diretto a causa della grande differenza di stabilità termodinamica relativa di queste specie, che impedisce di utilizzare condizioni sperimentali adatte alla formazione di una libreria dinamica contenente tutte le specie. Per questo motivo la stabilità relativa di immine e idrazoni è stata studiata separatamente per ogni *scaffold*, tramite degli esperimenti di scambio a coppie.

3.6.1 Scambio a coppie

Questi esperimenti prevedono la misura della costante di equilibrio relativa allo scambio misto idrazone/immina rappresentato in figura 3.17. Esso viene effettuato separatamente per ogni *scaffold*, utilizzando condizioni adatte a favorire la formazione delle immine termodinamicamente sfavorite rispetto al corrispondente idrazone. Le misure vengono

effettuate utilizzando le molecole marcate per gli *scaffold* **P1-3**, mentre a causa di una scarsa quantità di molecola marcata **P4** si preferisce utilizzare l'analogo non marcato.

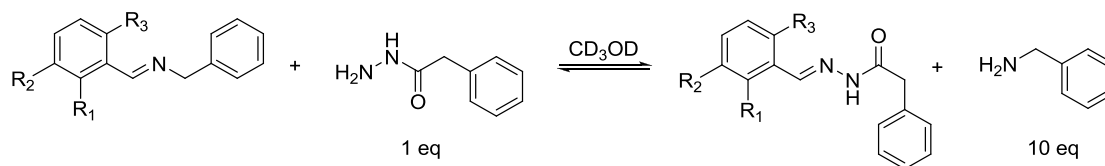


Figura 3.17: Equilibrio di scambio misto immina/idrazone.

Ogni *scaffold* viene aggiunto a un tubo NMR in concentrazione esattamente determinata tramite calibrazione con ^{13}C DMF pari a circa 2.5 mM, aggiungendo in ogni tubo 1 equivalente di **H** e 10 equivalenti di **A**. Lo scambio viene favorito scaldando la soluzione per 5 giorni e monitorando l'equilibrio con spettroscopia NMR. La composizione all'equilibrio, e di conseguenza la costante K_{eq} e il valore di ΔG° , vengono ottenuti dall'analisi della miscela all'equilibrio per integrazione dei picchi relativi a ogni segnale. Per lo *scaffold* **P4** viene studiato anche l'equilibrio di scambio tra **H** e **A+**, che fornisce il valore di stabilizzazione introdotto dalla presenza di gruppo ammonio sull'ammina. Questo risultato non era stato ottenuto dall'analisi della libreria di ammine a causa di una degradazione della specie nelle condizioni utilizzate. Le Tabelle 3.5 e 3.6 presentano i risultati ottenuti.

		P_xH	P_xA	Somma	$P_xA + H \rightarrow P_xH + A$ ΔG° (298K) kJ/mol (K_{eq})
P₁	Area ^a C (mM)	81.8 2.70	18.2 0.60	100 3.30	-13.6 (244)
P₂	Area ^a C (mM)	90.0 4.05	10.0 0.45	100 4.50	-16.8 (902)
P₃	Area ^a C (mM)	95.6 4.01	4.4 0.18	100 4.20	-21.0 (4840)

Tabella 3.5: Risultati ottenuti dagli esperimenti di scambio a coppie. CD_3OD , 298K, $[\text{P1-3}] = 3$ mM circa, $[\text{H}] = 1$ eq, $[\text{A}] = 10$ eq. a) I valori di area ottenuti sono normalizzati a 100.

	$P_4A + H \rightarrow P_4H + A$		$P_4A^+ + H \rightarrow P_4H + A^+$	
	P4H	P4A	P4H	P4A+
Area ^a C (mM)	93.4 2.34	6.6 0.16	85.2 2.13	14.8 0.37
ΔG° kJ/mol (K_{eq})	-19.0 (2150)		-14.7 (382)	

Tabella 3.6: Risultati degli esperimenti di scambio a coppie che coinvolgono lo *scaffold* **P4**. CD_3OD , 298K. $[\text{P4}] = 3$ mM, $[\text{H}] = 3$ mM, $[\text{A}] = [\text{A}^+] = 30$ mM. a) I valori di area ottenuti sono normalizzati a 100.

Questi risultati permettono di correlare la libreria di idrazoni con quella di immine, disegnando il diagramma relativo all'energia di stabilizzazione di ogni membro (Figura 3.18)

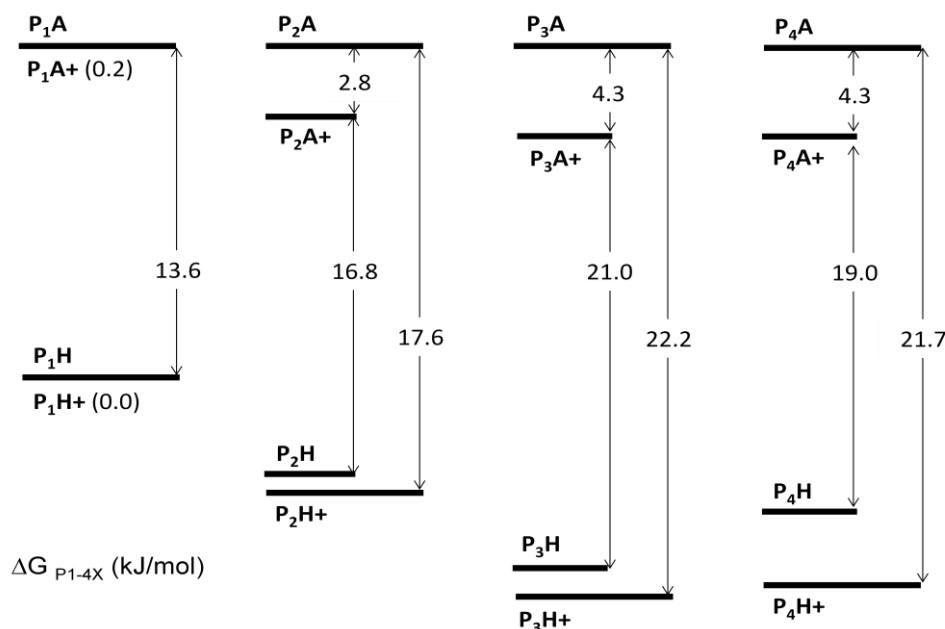


Figura 3.18: Confronto delle stabilità relative dei membri nelle librerie di idrazoni e immine. Il livello è stato normalizzato sulle immine **PxA** che non presentano interazioni stabilizzanti.

Il diagramma fornisce il valore dell'energia di stabilizzazione indotta dal riconoscimento molecolare per tutti i 16 membri della libreria (8 idrazoni + 8 immine). La normalizzazione sul livello delle immine **PxA** permette di confrontare in modo diretto i diversi *scaffold*, così da valutare l'effetto dell'inserzione di diversi gruppi chimici nella struttura aromatica.

L'inserzione del gruppo fosfonato dello *scaffold* **P2** provoca, come atteso, una stabilizzazione di 0.8 kJ/mol dell'idrazone contenente il gruppo ammonio, a seguito dell'interazione elettrostatica tra i due gruppi carichi presenti nella molecola. La stessa stabilizzazione si ritrova anche nelle corrispondenti immine, in cui la carica introduce una stabilizzazione di 2.6 kJ/mol rispetto alla coppia **P1A/P1A+**. Questo risultato è in accordo con quanto emerso in esperimenti precedenti, in cui la maggiore stabilità indotta dalla carica nelle ammine rispetto agli idrazoni corrispondenti era attribuita alla minore distanza tra gruppi carichi. La maggior stabilizzazione di **P2H** rispetto a **P1H** (3.2 kJ/mol) è attribuibile all'interazione di tipo legame idrogeno già discussa: l'esperimento indica che la presenza del legame idrogeno è l'effetto che contribuisce in modo maggioritario

alla stabilizzazione di **P2H+**: l'effetto della carica, quantificato in 0.8 kJ/mol, risulta minoritario.

L'inserzione di un gruppo metile nello *scaffold* **P3** aumenta la stabilizzazione dovuta all'introduzione della carica che passa da un valore di 0.8 kJ/mol a 1.2 kJ/mol per gli idrazoni e da 2.6 kJ/mol a 4.1 kJ/mol per le immine: la causa è stata attribuita a un effetto sterico del gruppo metile che riesce a orientare il gruppo fosfonato verso il gruppo ammonio, diminuendo la distanza tra i gruppi interagenti. In particolare tale effetto potrebbe avere origini entropiche: la presenza del gruppo metile limita i gradi di libertà rotazionale relativi al legame C_{aromatico}-O legame del fosfonato e lo orienta in modo da avvicinarlo al gruppo ammonio, aumentando in tal modo l'interazione. Lo stesso effetto è evidente anche per il legame idrogeno presente negli idrazoni grazie a cui **P3H** viene stabilizzato rispetto a **P2H** di 4.2 kJ/mol.

L'introduzione di un gruppo metossido in **P4** non sembra influire in modo importante nella stabilizzazione indotta dalla carica: questo è evidente confrontando le stabilità relative delle specie **P3A+** e **P4A+** che risultano praticamente identiche. Anche nel caso degli idrazoni l'effetto è sicuramente molto marginale, addirittura il gruppo metossido sembra sfavorire leggermente la stabilità di **P4H+** rispetto a **P3H+**. L'effetto più evidente dell'introduzione del gruppo metossido si esprime sulla forza del legame idrogeno che viene sensibilmente diminuita, destabilizzando **P4H** rispetto a **P3H** di circa 2 kJ/mol.

Questa prima parte dell'analisi non ha tenuto conto della presenza dell'equilibrio di isomeria che coinvolge gli idrazoni: considerando ogni isomero come una specie a se stante, il numero di membri della libreria passa da 16 a 26 complicando notevolmente il quadro di stabilità.

Nel diagramma di stabilità riportato in figura 3.18 gli isomeri vengono considerati come un'unica specie e i livelli ottenuti rappresentano la media pesata della stabilità di ogni conformazione isomerica. Dai dati ottenuti dagli esperimenti DEPT è possibile ottenere informazioni sulla stabilità relativa dei diversi isomeri, considerandoli come specie separate. In questo caso si deve introdurre nel sistema un ulteriore equilibrio relativo all'isomeria di ogni specie, riportato in figura 3.19.

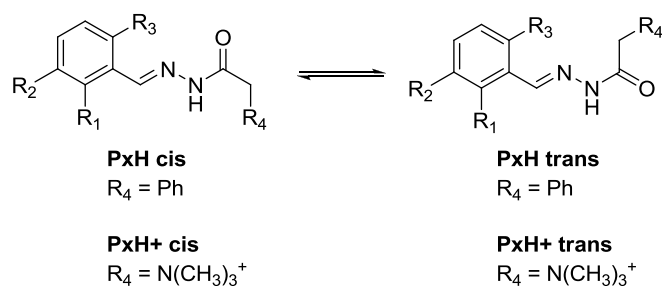


Figura 3.19 : Equilibrio di isomeria cis-trans presente negli idrazoni analizzati.

In questo modo è possibile ottenere il quadro completo della stabilità di ogni specie presente nel sistema: il diagramma riportato in figura 3.20 presenta il confronto tra tutti i membri della libreria, compresi gli isomeri degli idrazoni, normalizzando il livello di energia sull'immina **PxA**.

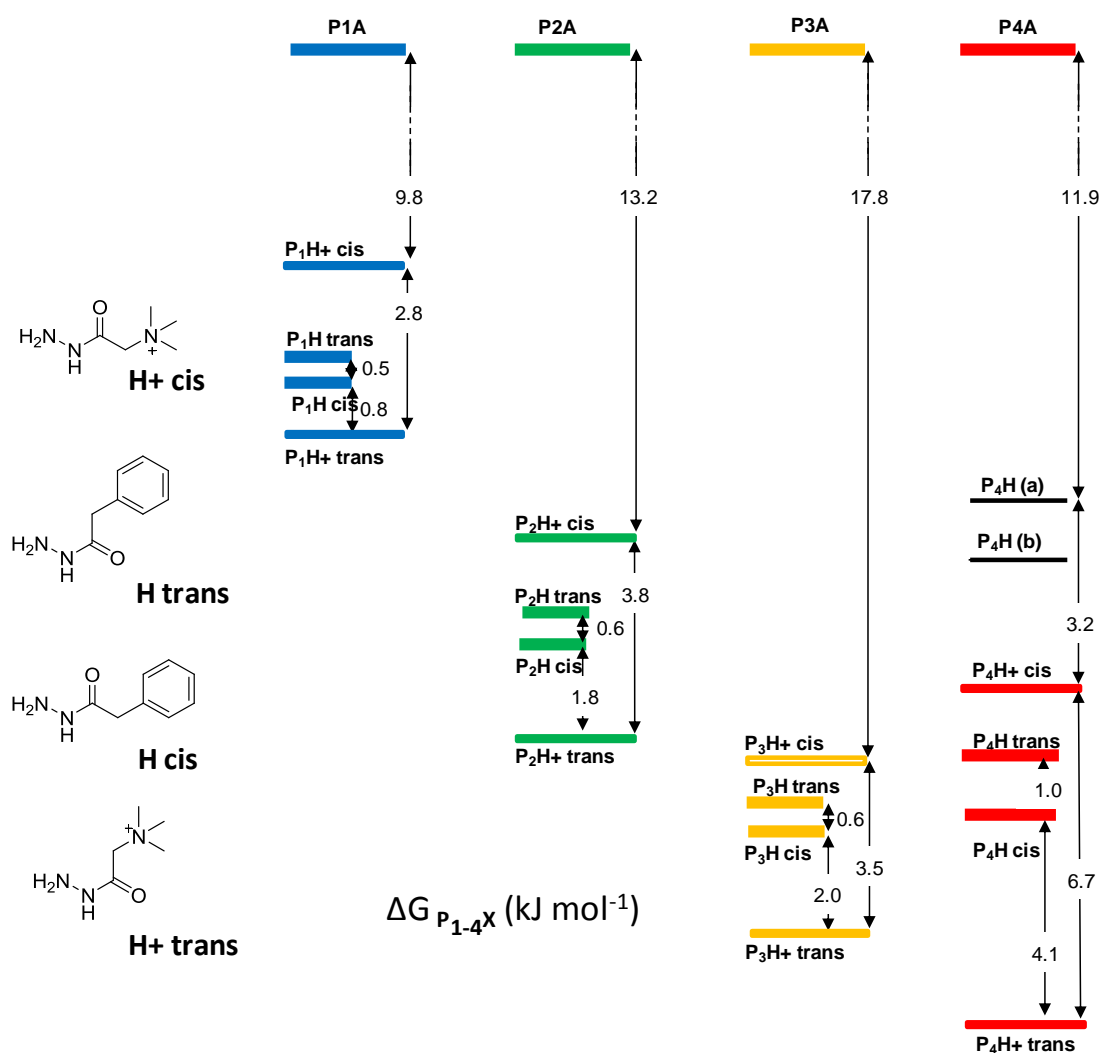


Figura 3.20 Schema globale delle stabilità relative nella libreria. Per chiarezza i livelli delle specie **PxA+** non sono riportati.

In questo caso gli effetti del cambiamento strutturale degli *scaffold* diventano evidenti anche sull'equilibrio di isomeria relativo agli idrazoni. Il cambiamento maggiore si registra per gli idrazoni derivati dallo *scaffold* **P4**, in cui il rapporto isomerico risulta sensibilmente variato rispetto alle altre specie, con l'introduzione di un'ulteriore isomeria (**P4Ha** e **P4Hb**).

Infine, le potenzialità di sensibilità dell'analisi sono evidenziate dalla possibilità di distinguere tutti i 26 membri della libreria ottenuti da una miscela contenente i 4 *scaffold*, le due idrazidi **H** e **H+** e le due ammine **A** e **A+**. Questo è realizzato dopo 12 ore di acquisizione, ottenendo uno spettro in cui ogni segnale risulta ben integrabile, con la possibilità di quantificare specie presenti in concentrazione al di sotto di 0.1 mM. Questo risultato non è raggiungibile con una tecnica basata sull' ^1H NMR, come mostra il confronto degli spettri della miscela ottenuti con ^1H NMR e DEPT90 riportato in figura 3.21.

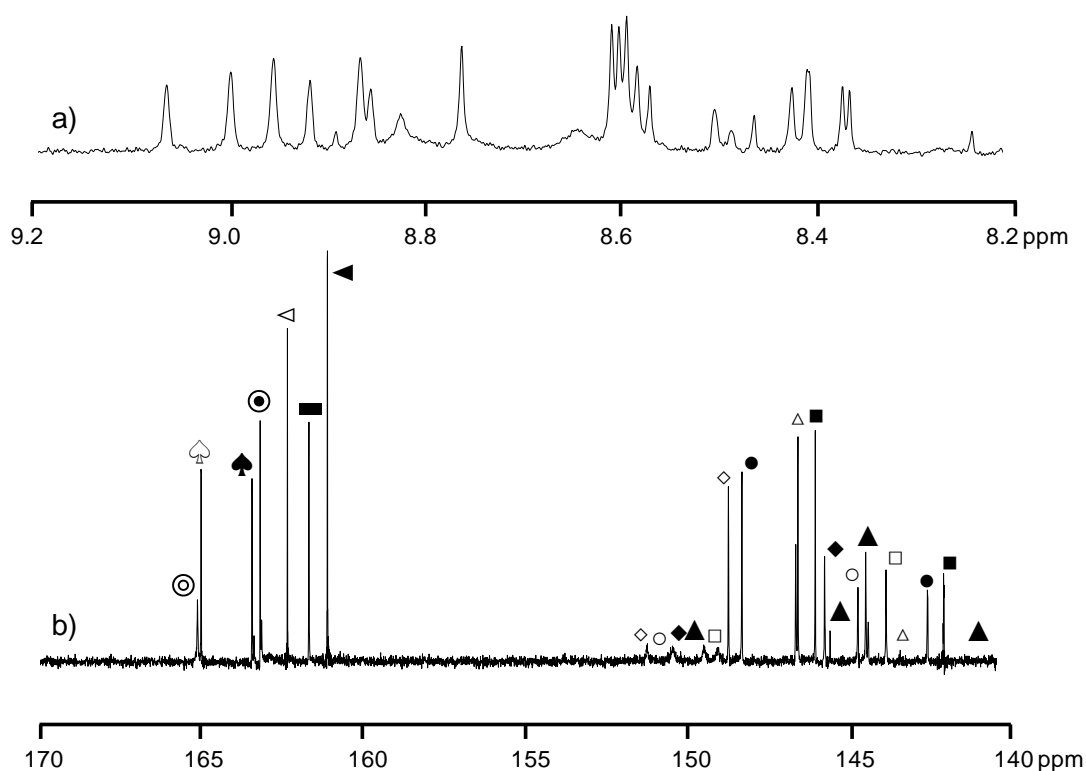


Figura 3.21 : Spettri relativi alla miscela contenente $[\text{P1-4}] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{H}] = [\text{H}+] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{A}] = [\text{A}+] = 25 \text{ mM}$, CD_3OD , 298K. a) Spettro ^1H NMR, b) Spettro DEPT90 con assegnazione di ogni segnale.

Alla luce di quanto discusso nel paragrafo 3.3, occorre precisare che questo esperimento non fornisce informazioni utili all'analisi termodinamica della miscela: la

difficoltà nello studio di una libreria composta da idrazoni e immine non deriva da una limitazione relativa alla tecnica analitica utilizzata, ma è una conseguenza della scelta del sistema, in cui i membri presentano stabilità termodinamiche molto diverse tra loro.

3.7 Conclusioni

Il lavoro presentato in questo capitolo ha proposto una nuova metodologia analitica per lo studio di librerie dinamiche in soluzione. La strategia si basa sul *labelling* ^{13}C della posizione aldeidica di un *set* di composti *scaffold*, che vengono fatti equilibrare in presenza di una serie di idrazidi e ammine per ottenere una libreria dinamica composta rispettivamente da idrazoni o immine. L'evoluzione del sistema e la composizione della miscela all'equilibrio è stata seguita tramite spettroscopia ^{13}C NMR, utilizzando una sequenza DEPT90 ottimizzata in modo da poter utilizzare gli spettri per ottenere informazioni quantitative sulla composizione della miscela.

Lo studio è stato rivolto alla comprensione dei processi di riconoscimento molecolare nelle specie utilizzate, con particolare riferimento all'effetto di gruppi spettatori inseriti sull'anello aromatico dello *scaffold*. Lo studio è stato svolto separatamente per idrazoni e immine in quanto la grande differenza di stabilità termodinamica tra queste specie ha impedito l'utilizzo di condizioni di concentrazione adatte alla formazione della libreria. Tuttavia, le stabilità relative di idrazoni e immine sono state ricavate da esperimenti separati, in cui è stata studiata la competizione diretta tra idrazidi e ammine nell'equilibrio di scambio.

Questi esperimenti hanno permesso di valutare in modo globale gli effetti apportati dai gruppi spettatori che si esprimono non solo sulla forza dell'interazione elettrostatica, ma soprattutto sul valore dell'interazione attribuita al legame idrogeno presente in tutti gli idrazoni che portano il gruppo fosfonato. Queste osservazioni hanno permesso di stabilire l'importanza della scelta di un corretto sistema di riferimento che non presenti interazioni stabilizzanti: la scelta di utilizzare le immine derivate dalla benzilammina (**PxA**) come riferimento ha permesso di attribuire con sicurezza l'effetto stabilizzante sulla reazione di scambio a un riconoscimento molecolare tra i membri della libreria, che viene modulato dai gruppi spettatori sullo *scaffold*. Un'ulteriore analisi ha riguardato l'equilibrio di isomeria che coinvolge gli idrazoni, permettendo di determinare la stabilità relativa dei diversi isomeri. Questa possibilità è preclusa con l'utilizzo di una normale

tecnica HPLC che non permette di separare i due isomeri, impedendone la quantificazione.

3.8 Parte sperimentale

3.8.1 Strumentazione e materiali

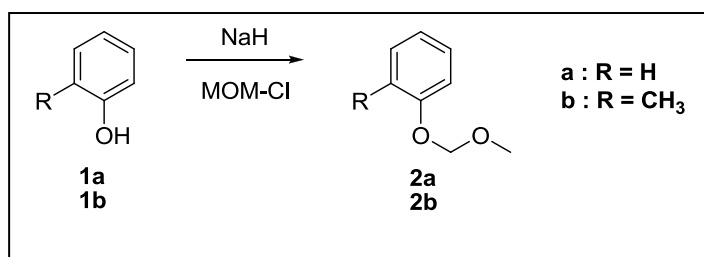
Per la descrizione dettagliata di tutta la strumentazione e dei materiali utilizzati si rimanda al capitolo 2.

Spettri NMR

Per gli esperimenti di scambio, tutti gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian operante a 400 MHz o su uno spettrometro Bruker DMX operante a 600 MHz.

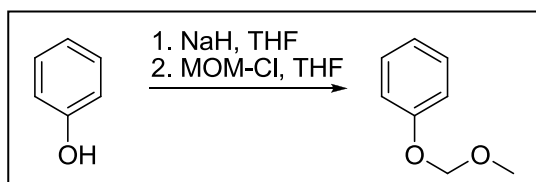
3.8.2 Sintesi e caratterizzazioni

Schema generale per la sintesi dei composti 2



Una sospensione di NaH (60% in olio minerale, 1.5 eq) in THF dry (10 mL) è raffreddata a 0°C, dopodiché si aggiunge goccia a goccia una soluzione del corrispondente fenolo (1eq, in 3 mL). La miscela è mantenuta sotto agitazione per 15 minuti a 0°C, quindi è lasciata raggiungere temperatura ambiente, mantenendo l'agitazione per altri 30 min. Dopo aver raffreddato nuovamente a 0°C, MOM-Cl (1.8 eq) è aggiunto goccia a goccia, mantenendo l'agitazione per altre 3 ore. La miscela è lavata con NH₄Cl (3 x 25 mL) ed estratta con EtOAc (3 x 25 mL). Le fasi organiche vengono raccolte e anidificate su Na₂SO₄. Il solvente è rimosso per evaporazione ridotta ottenendo un olio giallo che viene purificato con cromatografia flash, per ottenere un olio incolore.

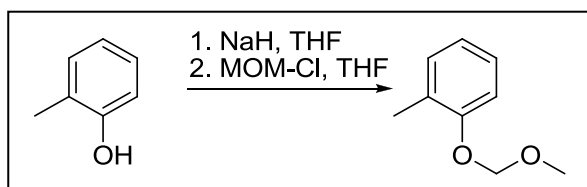
Composto 2a (Resa 57%)



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.69 (s, 3H), 5.38 (s, 2H), 7.35 (m, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 55.95, 94.63, 116.21, 121.85, 129.44, 157.18

Composto 2b (Resa: 62%)

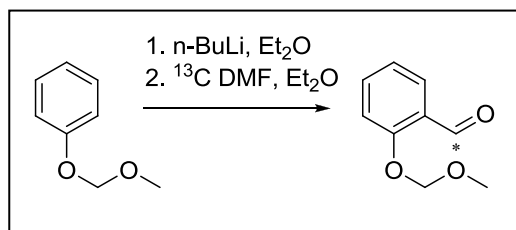


$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.38 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 7.18 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 16.25, 55.95, 94.46, 113.86, 121.57, 126.8, 127.36, 130.78, 155.38

Schema generale per la sintesi dei composti 3

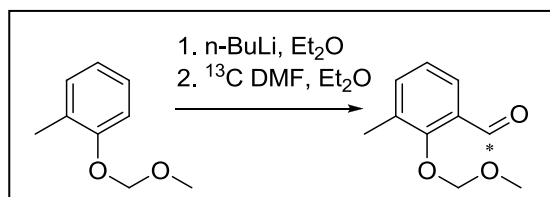
n-BuLi (1.2 eq) è aggiunto goccia a goccia a una soluzione di **2** in etere anidro (20 mL) a temperatura ambiente. La soluzione così ottenuta è mantenuta sotto agitazione per 1 ora, dopodiché ^{13}C DMF (1.2 eq) viene aggiunta goccia a goccia. L'agitazione viene mantenuta per 1 ora, quindi la miscela è lavata con NH_4Cl (3 x 25 mL) ed estratta con etere etilico (3 x 25 mL). Le fasi organiche vengono riunite e anidificate su Na_2SO_4 , il solvente è rimosso per evaporazione a pressione ridotta fino a ottenere un residuo giallo. Dopo purificazione con cromatografia flash (SiO_2 , etere di petrolio/ EtOAc 95/5) il composto **3** è ottenuto come olio giallo.

Composto 3a (Resa 57%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) 3.55 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 7.35 (m, 3H), 7.87 (ddd, 1H, J=1.8Hz, J=4.2Hz, J=7.7Hz), 10.53 (d, 1H, J=181.1Hz)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 189.70

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): *m/z* 190.3 [M+Na]⁺, calcd: 190.2, 206.2 [M+K]⁺, calcd: 206.2

Composto 3b (Resa 63%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.35 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 5.07 (s, 2H), 7.16 (t, 1H, J=7.6Hz), 7.45 (d, 1H, J=7.5Hz), 7.69 (ddd, 1H, J=1.6Hz, J=4.3Hz, J=6.4Hz), 10.32 (d, 1H, J=180.0Hz)

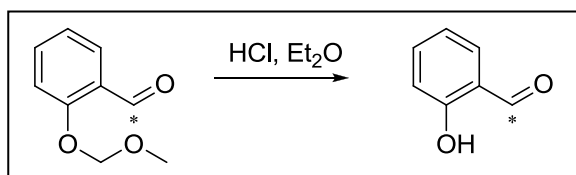
¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 191.01

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): *m/z* 204.2 [M+Na]⁺, calcd: 204.2

Schema generale per la sintesi dei composti 4

Il composto **3** è sciolto in una soluzione di HCl in etere (1M, 2 mL), mantenendo l'agitazione per 24 ore. Il solvente viene rimosso per evaporazione a pressione ridotta, ottenendo un residuo rosso che viene purificato via cromatografia flash (SiO₂, CH₂Cl₂) per ottenere **4** come olio incolore.

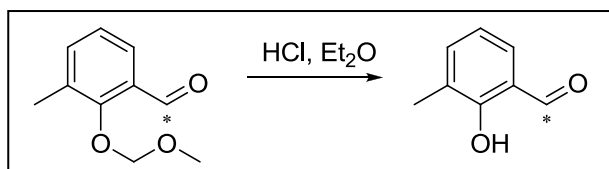
Composto 4a (Resa 87%)



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm), 6.98-7.05 (m, 2H), 7.50-7.59 (m, 2H), 9.90 (d, 1H, J=176.3Hz), 11.03 (s, 1H)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 196.49

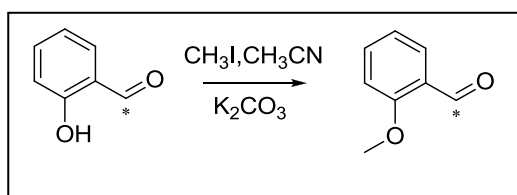
Composto 4b (Resa 90%)



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.27 (s, 3H), 6.93 (t, 1H, 7.5 Hz), 7.38-7.43 (m, 2H), 9.87 (d, 1H, J=175.9Hz), 11.27 (s, 1H)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 196.73

Sintesi del composto P1 (2-metossi benz ¹³C aldeide)



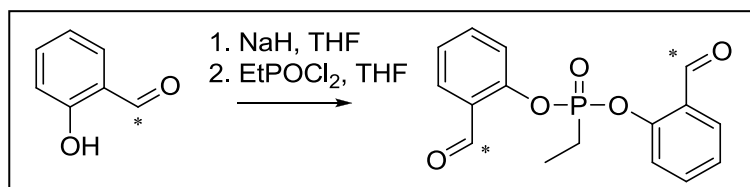
Il composto **4a** (20 mg, 0.15 mmol) è sciolto in CH₃CN (2mL) in una *vial* di Pyrex munita tappo a vite. Metil ioduro (300 uL, 4.8 mmol, 1.2 eq) e K₂CO₃ (eccesso) sono aggiunti alla soluzione e la miscela viene mantenuta sotto agitazione per 7 ore a 40°C. Il solvente viene rimosso per evaporazione sotto vuoto e il residuo ottenuto è ripreso in CH₂Cl₂ e filtrato su cotone. Recuperata la soluzione, il solvente viene rimosso sotto vuoto e **P1** viene ottenuto come solido giallo che viene utilizzato senza ulteriore purificazione. 11.5 mg, 57% resa

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.93 (s, 3H), 7.32 (m, 3H), 7.83 (m, 1H), 10.47 (d, 1H, J=180.5Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 189.81

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): m/z 176.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$, calcd: 176.2

Sintesi di bis(2- ^{13}C formilfenil) etilfosfonato (5)



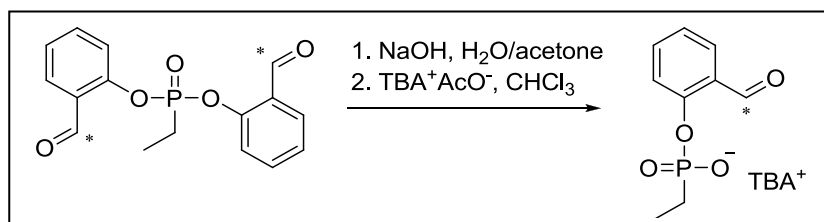
Una sospensione di NaH (60% in olio minerale, 33.6 mg, 0.84 mmol) in THF anidro è raffreddata a 0°C , dopodiché è aggiunta goccia a goccia una soluzione del composto **4a** (70 mg, 0.57 mmol) in THF (3 mL). La soluzione così ottenuta è mantenuta sotto agitazione per 2 ore a temperatura ambiente, quindi è raffreddata nuovamente a 0°C . EtPOCl_2 (31 μL , 0.29 mmol, 0.5 eq) è aggiunto goccia a goccia e la miscela è mantenuta a temperatura ambiente 12 ore. La miscela di reazione è lavata con H_2O (3 x 25 mL), estratta con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL), quindi le frazioni organiche vengono raccolte e anidificate su Na_2SO_4 . Per evaporazione del solvente a pressione ridotta si ottiene un residuo solido giallo che viene ricristallizzato da CH_3CN ottenendo il prodotto come solido bianco (46 mg, 50% resa).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 1.30 (td, 3H, $J=7.7\text{Hz}$, $J=22.0\text{Hz}$), 2.19 (qd, 2H, $J=7.6\text{Hz}$, $J=18.2\text{Hz}$), 7.15-7.76 (m, 8H), 10.17 (d, 2H, $J=181.2\text{Hz}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 188.01

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CDCl_3) proton decoupled δ (ppm): 28.94

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): m/z 198.3 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2]^+$, calcd: 198.2, 321.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd: 321.2, 343.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd: 343.2

Sintesi del composto P2 (2-¹³C formilfenil etilfosfonato)

Il composto **5** (46 mg, 0.14 mmol) è sciolto in acetone (3 mL) e la soluzione è raffreddata a 0°C. Una soluzione di NaOH (0.1 N, 1.43 mL, 0.143 mmol) è quindi aggiunta e la soluzione è mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 10 ore. Si aggiunge quindi H₂O MilliQ (3 mL) e si estrae con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). Raccolta la frazione acquosa, si liofilizza ottenendo un solido bianco (13 mg, 38% resa). Il composto viene sciolto in H₂O MilliQ (3 mL), quindi si aggiunge una soluzione di tetrabuttilammonio acetato (16.2 mg, 0.05 mmol) in CHCl₃ ottenendo una miscela che viene mantenuta sotto agitazione per 12 ore. Le frazioni vengono separate e quella acquosa è liofilizzata ottenendo un residuo scuro che viene ripreso in CH₂Cl₂ e filtrato. Il solvente è rimosso su rotovapor ottenendo un solido igroscopico che viene conservato in atmosfera inerte (20.0 mg, 85% resa).

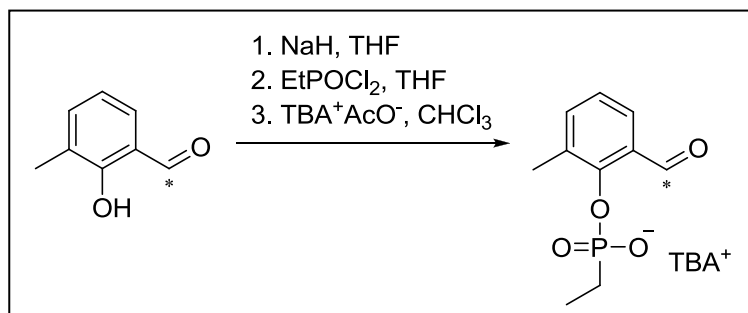
¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN) δ (ppm) 0.96 (t, 12H, J=7.3Hz), 1.08 (td, 3H, J=7.5Hz, J=18.7Hz), 1.34 (qd, 8H, J=7.3Hz, J=14.5Hz), 1.41-1.66 (m, 10H), 3.06-3.13 (m, 8H), 7.05 (t, 1H, 7.0 Hz), 7.46-7.55 (m, 2H), 7.68-7.71 (m, 1H), 9.88 (d, 1H, J=93.7Hz)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 191.62

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 34.43

UHPLC (Zorbax RRHP Eclipse Plus C18 2.1 x 100 mm, 1.8 μL, flow 0.2 mL/min, eluenti: H₂O + 0.1% HCOOH (A), CH₃CN + 0.1% HCOOH (B), gradiente: 0-5 min 10-90% B): 2.7 min

ESI-MS: (-, ACN): *m/z* 214.3 [M]⁻.calcd: 214.1

Sintesi del composto P3 (2-¹³C formil 6-metilfenil etilfosfonato)

Una sospensione di NaH (60% in olio minerale, 54 mg, 1.35 mmol, 1.4 eq) in THF anidro è raffreddata a 0°, quindi una soluzione di **4b** (133 mg, 0.97 mmol, 1 eq) in THF anidro (1 mL) viene aggiunta goccia a goccia. La miscela viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, quindi viene nuovamente raffreddata a 0°C. EtPOCl₂ (165 μ L, 1.54 mmol, 1.6 eq) viene aggiunto goccia a goccia, mantenendo l'agitazione per altre 2 ore. La miscela è lavata con H₂O (3 mL), dopodichè viene concentrata tramite centrifugazione sottovuoto ottenendo un residuo purificato tramite HPLC preparativo (Jupiter Proteo 4u 90A 250 x 21.20 mm, 4 μ m, flow: 17 mL/min, eluenti: H₂O + 0.1% HCOOH (A), CH₃CN + 0.1% HCOOH (B), gradiente: 0-15 min 10-90% B, λ = 280 nm: 10.03 min). Dopo liofilizzazione delle frazioni raccolte si ottiene un solido bianco (11.3 mg, 0.05 mmol, 54% resa calcolata sulla conversione). Il prodotto viene così sciolto in H₂O (3 mL) e una soluzione di NaOH (0.1 N, 0.5 mL, 1 eq) viene aggiunta per ottenere il derivato come sale sodico. Una soluzione di tetrabuttilammonio acetato (1 eq) in CHCl₃ (2.3 mL) è aggiunta e la sospensione risultante è mantenuta sotto agitazione per 12 ore. La miscela viene filtrata e il solvente viene rimosso per evaporazione sotto vuoto ottenendo il prodotto desiderato come solido igroscopico che viene conservato in atmosfera inerte (22.8 mg, 94% resa).

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN) δ (ppm) 0.95 (t, 12H, J=7.3Hz), 1.14 (td, 3H, J=7.6Hz, J=18.5Hz), 1.34 (qd, 8H, J=7.3Hz, J=14.6Hz), 1.60 (m, 10H), 2.36 (s, 3H), 3.07 (dd, 8H, J=7.1Hz, J=9.9Hz), 7.05 (t, 1H, J=7.6Hz), 7.43 (d, 1H, J=7.3Hz), 7.56-7.59 (m, 1H), 10.38 (d, 1H, J=184.9Hz)

¹³C-NMR (62.5MHz, CDCl₃) δ (ppm) 189.41

³¹P-NMR (122 MHz, CD₃CN) proton decoupled δ (ppm): 24.19

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): m/z 230.1 [M+2H]⁺, calcd: 230.1, 252.3 [M+Na+H]⁺, calcd: 252.1

Sintesi del composto 2,6-dimetossi 3-metil benz ¹³C-aldeide (7)



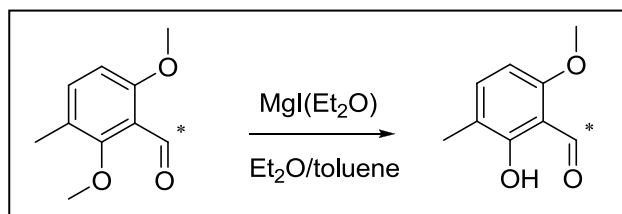
Una soluzione di n-BuLi (1.6 M in esano, 4.8 mmol, 1.6 eq) è aggiunta goccia a goccia a una soluzione di 2,4 dimetossitoluene (**6**) commercialmente disponibile (627 mg, 4.12 mmol, 1 eq) in etere etilico anidro (10 mL). La miscela viene posta sotto agitazione per 2 ore dopodiché ¹³C DMF (390 uL, 4.8 mmol, 1.2 eq) è aggiunta goccia a goccia. La soluzione viene posta sotto agitazione per altre 2 ore, quindi viene lavata con una soluzione satura di NH₄Cl (3 x 20 mL). Si raccolgono le frazioni organiche che vengono anidificate su Na₂SO₄. Il solvente è rimosso su rotovapor ottenendo un olio giallo che viene purificato tramite cromatografia flash (SiO₂, CH₂Cl₂) ottenendo il prodotto come olio giallo (391 mg, 52% resa).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.22 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.66 (dd, 1H, J=1.3Hz, J=8.6Hz), 7.33 (d, 1H, J=8.6Hz), 10.45 (d, 1H, J=181.5Hz)

¹³C-NMR (62.5MHz, CDCl₃) δ (ppm) 189.72

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): *m/z* 182.2 [M+H]⁺, calcd: 182.2, 204.1 [M+Na]⁺, calcd: 204.2

Sintesi del composto 2-idrossi 3-metil 6-metossi benz ¹³C aldeide (8)



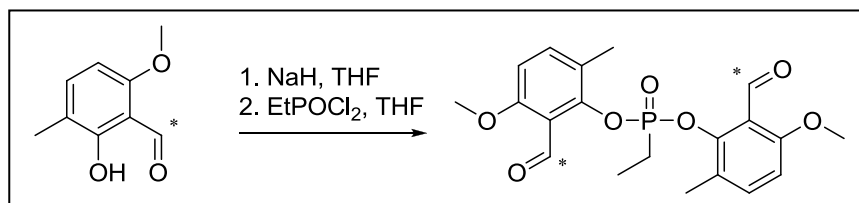
A una soluzione di magnesio ioduro eterato, preparata aggiungendo magnesio metallico (156 mg, 6.48 mmol) e cristalli di iodio (666 mg, 2.62 mmol) in una miscela 4/6 di etere etilico e toluene anidri, viene aggiunto il composto **7** (391.2 mg, 2.16 mmol). La miscela viene mantenuta sotto agitazione a 60°C per 12 ore, quindi, dopo averla lasciata raffreddare a temperatura ambiente, si aggiunge una soluzione acquosa di HCl al 10%. La miscela viene estratta con etere etilico (3 x 25 mL) raccogliendo la fase organica. Il

solvente è rimosso su rotavapor ottenendo un residuo scuro che viene trattato con una soluzione acquosa di sodio tiosolfato (0.1 M, 4 x 25 mL) per rimuovere lo iodio residuo. La miscela è nuovamente estratta con etere etilico (3 x 25 mL), la fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente è rimosso su rotavapor ottenendo un solido giallo. Dopo purificazione su cromatografia flash (SiO₂, etere di petrolio/CH₂Cl₂ 7/3) si ottiene il prodotto **8** come solido giallo (166.3 mg, 46% resa).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.15 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.28 (dd, 1H, J=1.7Hz, J=8.4Hz), 7.26 (d, 1H, J=8.3Hz), 10.33 (d, 1H, J=182.8Hz), 12.22 (s, 1H)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 194.49

Sintesi di bis(2-¹³C formil 3 metossi 6 metilfenil) etilfosfonato

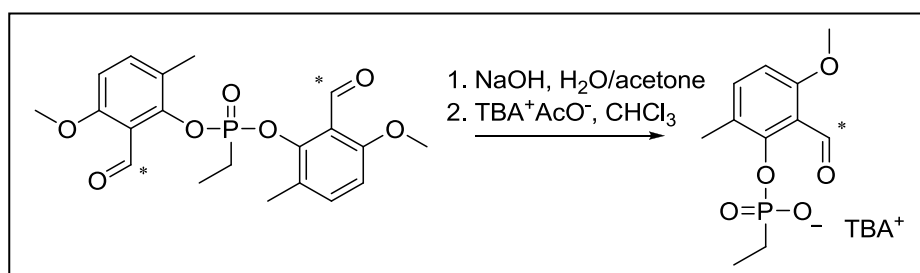


Una sospensione di NaH (60% in olio minerale, 24.6 mg, 0.62 mmol, 1.1eq) in THF anidro è raffreddata a 0°C, quindi si aggiunge goccia a goccia una soluzione del composto **8** (92.0 mg, 0.55 mmol, 1 eq) in THF anidro. La miscela viene posta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, quindi, raffreddata nuovamente a 0°C, si aggiunge EtPOCl₂ (30 uL, 0.31 mmol, 0.5 eq). La miscela è mantenuta sotto agitazione per 12 ore, dopodiché viene aggiunta H₂O (15 mL). La miscela è estratta con EtOAc (4 x 25 mL), le fasi organiche vengono raccolte e anidificate su Na₂SO₄. Il solvente rimosso su rotavapor e il residuo ottenuto è trattato con una miscela di CHCl₃/esano ottenendo il prodotto in forma cristallina (19.6 mg, 16% resa).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.31 (td, 3H, J=7.7Hz, J=22.0Hz), 2.11-2.36 (m, 8H), 3.86 (s, 6H), 6.74 (d, 2H, J=8.7Hz), 7.32 (d, 2H, J=8.6Hz), 10.38 (d, 2H, J=184.8Hz)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 189.07

ESI-MS (+, ACN (0.1% HCOOH)): *m/z* 431.4 [M+Na]⁺, calcd: 431.4

Sintesi del composto P4 (2-¹³C formil 3-metil 6-metossi etilfosfonato)

Il composto **9** (20.0 mg, 0.048 mmol) viene sciolto in acetone (4 mL) e il sistema è raffreddato a 0°C. Si aggiunge una soluzione di NaOH (0.1 N, 0.48 mL, 0.048 mmol, 1 eq) mantenendo l'agitazione a temperatura ambiente per 10 ore. Si aggiunge quindi H₂O distillata (5 mL) e la miscela viene estratta con CH₂Cl₂ (5 x 15 mL). La fase acquosa è liofilizzata ottenendo il prodotto come sale sodico. Il solido ottenuto è sospeso in CHCl₃ (5 mL), si aggiunge una soluzione di tetrabutylammonio acetato (14.4 mg, 0.048 mmol) in CHCl₃. La miscela è mantenuta sotto agitazione per 12 ore, filtrata, e il solvente viene rimosso su rotovapor e pompa meccanica ottenendo un olio giallo pallido (15 mg, 62% resa).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN) δ (ppm) 0.97 (t, 12H, J=7.3Hz), 1.11 (td, 3H, J=7.6Hz, J=17.8Hz), 1.35 (qd, 8H, J=7.3Hz, J=14.4Hz), 1.56 (m, 10H), 2.28 (s, 3H), 3.08 (m, 8H), 3.77 (s, 3H), 6.62 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.27 (d, 1H, J=8.5Hz), 10.37 (d, 1H, J=184.0Hz)

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 190.67

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃) proton decoupled δ (ppm): 29.28

ESI-MS (-, CH₃CN): *m/z* 258.2 [M]⁻, calcd: 258.2

3.8.2 Procedura sperimentale utilizzata per gli esperimenti di assegnazione dei segnali

Le soluzioni madre degli *scaffold* **P1-4** sono state preparate in acetonitrile in un *range* di concentrazioni compreso tra 30 e 70 mM. La concentrazioni esatta viene determinata utilizzando ¹³C DMF come standard interno. Le soluzioni di idrazide/ammina vengono preparate in CD₃OD in concentrazione nota di circa 200 mM.

La soluzione madre di idrazide/ammina è aggiunta in un tubo NMR. Una a una vengono aggiunte le soluzioni di ciascuno *scaffold*, con formazione immediata del corrispondente idrazone/immina. Lo spettro DEPT è registrato dopo ogni aggiunta su uno spettrometro

Varian a 400 MHz a 298K. Dopo aver aggiunto tutti gli *scaffold*, la soluzione è portata a volume con CD₃OD per raggiungere un volume finale di 600 uL. Alla fine di tutte le aggiunte, gli idrazoni/immine sono presenti in concentrazione pari a 2.5 mM ciascuno, a seconda dell'esatta quantità di *scaffold* aggiunta (**P1**: 2.22 mM, **P2** 2.28 mM, **P3** 2.23 mM, **P4** 2.24 mM). La concentrazione finale di idrazide/ammina presente nel tubo è 25 mM.

3.8.3 Procedura generale per gli esperimenti di scambio tra idrazidi H/H+ o ammine A/A+.

In un tubo NMR vengono aggiunti uguali volumi delle librerie di idrazoni/immine (vedi paragrafo precedente) per formare una soluzione contenente tutti gli *scaffold* **P1-4** e la coppia **H/H+** oppure **A/A+**. In questo modo, la concentrazione di ogni *scaffold* risulta pari a quella utilizzata negli esperimenti di assegnazione, mentre la concentrazione delle rispettive idrazidi o immine risulta 12.5 mM. La concentrazione degli idrazidi/ammine viene corretta a 25 mM, quindi le miscele sono incubate a 50°C fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico, monitorato tramite spettroscopia NMR (2 giorni per gli idrazoni, 8 giorni per le immine). Raggiunto l'equilibrio, lo spettro DEPT viene registrato su uno spettrometro Bruker 600 MHz. La concentrazione di ogni specie viene valutata dall'integrazione del segnale relativo. La costante di equilibrio K_{eq} e il valore di $\Delta G^\circ(T=298K)$ sono valutati separatamente per ogni *scaffold*.

3.8.4 Procedura generale per gli esperimenti di scambio tra l'ammina A e l'idrazide H.

Prima di ogni esperimento la concentrazione di ogni soluzione madre (20-50 mM in CD₃CN) è controllata usando ¹³C DMF come standard interno. Le soluzioni di **H** (30 mM in CD₃OD) e **A** (580 mM in CD₃OD) vengono aggiunte in un tubo NMR per ottenere una soluzione contenente lo *scaffold* in esame (circa 3 mM), 1 eq di **H** e 10 eq di **A**, con un volume finale pari a 600 uL. Le soluzioni sono mantenute a 50°C per 5 giorni, durante i quali l'equilibrio viene monitorato tramite ¹³C NMR. La costante di equilibrio è determinata dall'integrazione dei segnali relativi a ogni coppia di composti. Per lo *scaffold* **P4**, a causa della scarsa quantità di prodotto a disposizione, viene utilizzata la molecola non marcata. In questo caso il rapporto di equilibrio viene determinato con spettroscopia ¹H NMR.

3.9 Bibliografia

1. Stern, R.; English, J.; Cassidy, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 79, 5792-5797.
2. Townsend, C. A.; Bloom, L. M., *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3924-3925.
3. Christensen, H., *Synth. Comm.* **1975**, 5, 65.
4. Yamaguchi, S.; Nedachi, M.; Yokoyama, H.; Hirai, Y., *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7363-7365.

4. Studio dello stato di transizione di una reazione modello

La ricerca verso il *design* e lo sviluppo di nuovi catalizzatori costituisce uno dei temi principali della ricerca chimica. Il grande interesse verso questo tipo di studi emerge dalla crescente necessità di catalizzatori in grado di promuovere reazioni utilizzando condizioni sostenibili dal punto di vista energetico e ambientale, in modo efficiente e altamente selettivo.¹ Un catalizzatore è definito come una specie in grado di abbassare l'energia relativa allo stato di transizione della reazione in esame, eventualmente aprendo cammini di reazione alternativi: ne risulta che la ricerca nell'ambito della scoperta di nuovi catalizzatori riguarda essenzialmente lo studio delle interazioni all'interno dello stato di transizione. Ottenere queste informazioni può risultare difficile, in quanto lo stato di transizione è per definizione una specie labile e transiente che non può essere isolata e caratterizzata con tecniche spettroscopiche di uso comune. Uno degli approcci per questo tipo di studi consiste nell'utilizzo di analoghi dello stato di transizione (*Transition State Analogue*, TSA) che siano in grado di mimare le caratteristiche geometriche ed elettroniche dello stato di transizione della reazione in esame, risultando però sinteticamente accessibili (Figura 4.1).

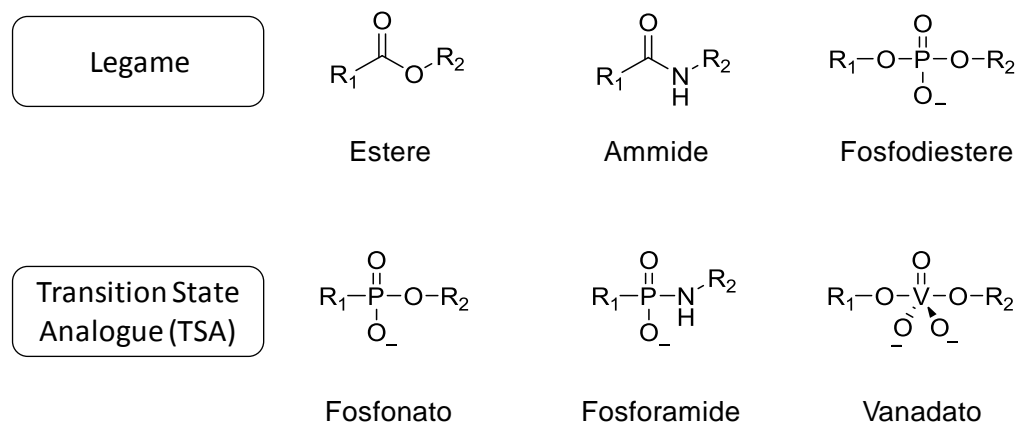


Figura 4.1: Esempi di TSA di diversi legami chimici relativi a una reazione di idrolisi.

L'utilizzo di TSA ha permesso l'applicazione di approcci di tipo combinatori nell'ambito della ricerca di nuovi catalizzatori: nonostante l'enorme potenzialità di questi tipi di metodologie, gli esempi in questo campo rimangono piuttosto limitati, evidenziando le difficoltà correlate a questi studi.^{2,3} I problemi emergono in parte dalla necessità di

ottenere informazioni riguardo la natura dello stato di transizione in esame, in parte dalle difficoltà correlate allo studio della complessa rete di interazioni che si instaurano tra substrato e catalizzatore nello stato di transizione determinando la comparsa dell'evento catalitico.

I capitoli precedenti hanno presentato un metodo conveniente per lo studio sistematico delle interazioni non covalenti tra gruppi chimici in soluzione: l'ultima parte del lavoro riguarderà l'applicazione di queste metodologie allo studio dello stato di transizione di una reazione modello, con lo scopo di ottenere informazioni riguardo alla sua natura e alle interazioni non covalenti che possono determinarne la stabilizzazione.

4.1 Strategia

La reazione modello utilizzata negli studi è la reazione di transesterificazione di un estere fenilico. Studi precedenti svolti nel gruppo di ricerca hanno già previsto l'utilizzo di questa reazione il cui meccanismo ben noto è rappresentato in figura 4.2.

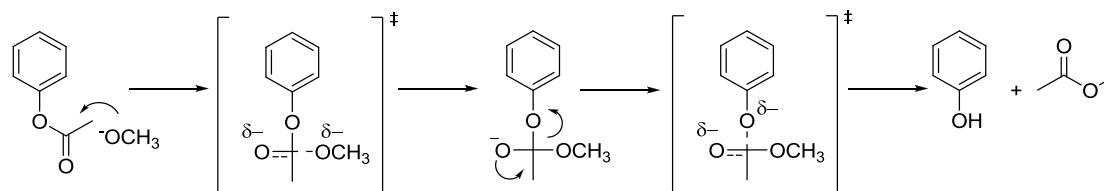


Figura 4.2. Meccanismo di reazione di transesterificazione di un estere fenilico.

La reazione prevede la formazione di un intermedio tetraedrico carico negativamente formato a seguito dell'attacco del gruppo metossido al carbonio carbonilico del reagente. Il gruppo fosfonato si è dimostrato adatto a essere utilizzato come analogo dello stato di transizione per questa reazione: uno studio precedente svolto in questo gruppo di ricerca ha mostrato come uno *screening* eseguito su una libreria che utilizza il fosfonato come *target* possa portare alla selezione di unità catalitiche per la reazione di transesterificazione da una libreria combinatoria.⁴ Una discussione più approfondita dei risultati è presente nel capitolo 1, paragrafo 1.8.

L'effetto che sta alla base di questa osservazione è la stabilizzazione dello stato di transizione indotta dalla presenza di un'interazione non covalente con le unità selezionate tramite lo *screening*. Il legame tra la stabilizzazione dello stato di transizione e l'effetto catalitico è dato dalla relazione di Arrhenius: la conoscenza della differenza di energia di attivazione della reazione catalizzata ($E_{a,cat}$) rispetto a quella non catalizzata ($E_{a,uncat}$) determina il rapporto delle costanti cinetiche nelle due reazioni.

$$\frac{k_{cat}}{k_{uncat}} = \exp\left(-\frac{E_{a,cat} - E_{a,uncat}}{RT}\right) \quad (1)$$

L'efficienza della catalisi, espressa dal rapporto k_{cat}/k_{uncat} , dipende dalla differenza di energia ΔE_a , la cui misura diretta è difficilmente accessibile sperimentalmente a causa della natura elusiva dello stato di transizione. L'utilizzo di un TSA che mima lo stato di transizione della reazione catalizzata ($TS_{1,cat}$) e di quella non catalizzata ($TS_{1,uncat}$) permette in principio di avere accesso a questa informazione: la stabilità relativa dei due TSA ($\Delta\Delta G_{TSA}$) può essere correlata con la differenza tra le energie di attivazione della reazione ΔE_a . (Figura 4.3).

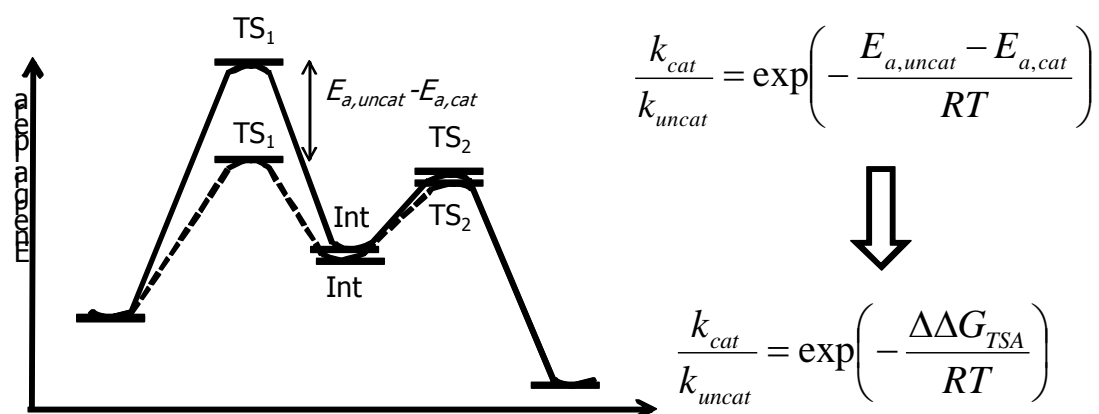


Figura 4.3: Andamento di energia libera relativo alla reazione di transesterificazione di un estere (sinistra). La reazione non catalizzata (linea continua) presenta un'energia di attivazione maggiore rispetto a quella catalizzata (linea tratteggiata). La differenza tra i valori delle due energie di attivazione è ottenibile dalla misura della stabilità termodinamica relativa dei rispettivi TSA (destra).

Gli esperimenti presentati nei capitoli precedenti hanno mostrato che la presenza di gruppi vicinali al fosfonato determina la formazione di un'interazione non covalente intramolecolare che influenza profondamente la stabilità termodinamica della specie. L'approccio introdotto consiste di misurare tale interazione, ottenendo sperimentalmente il valore di $\Delta\Delta G$, riferito alla specie in cui l'interazione intramolecolare non è presente.

Dal momento che il gruppo fosfonato può essere utilizzato come TSA per la transesterificazione di un estere, lo scopo di questo capitolo è determinare l'esistenza una correlazione quantitativa tra la stabilizzazione indotta dai gruppi vicinali osservata precedentemente e l'effetto catalitico degli stessi gruppi sulla reazione di transesterificazione.

Gli studi di correlazione tra stabilità e attività catalitica hanno previsto la sintesi dei derivati acetilati delle molecole utilizzate negli studi precedenti, le quali sono state successivamente utilizzate in studi cinetici di transesterificazione.

I derivati acetilati degli idrazoni e delle ammine precedentemente presentati sono stati sottoposti a reazione di transesterificazione con sodio metossido, monitorando la velocità della reazione tramite spettroscopia UV-Vis misurando la formazione del derivato fenolico prodotto nella reazione. È stato utilizzato un eccesso di sodio metossido rispetto alla concentrazione di estere in modo da poter utilizzare una legge di pseudo-primo ordine per il *fitting* dei dati, ottenendo il valore di k_{obs} [s^{-1}] da cui risulta facilmente ottenibile la costante di secondo ordine k_2 [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$].

4.2 Idrazoni

Inizialmente lo studio si è rivolto all'analisi degli idrazoni: le molecole utilizzate durante gli esperimenti cinetici sono rappresentate in figura 4.4

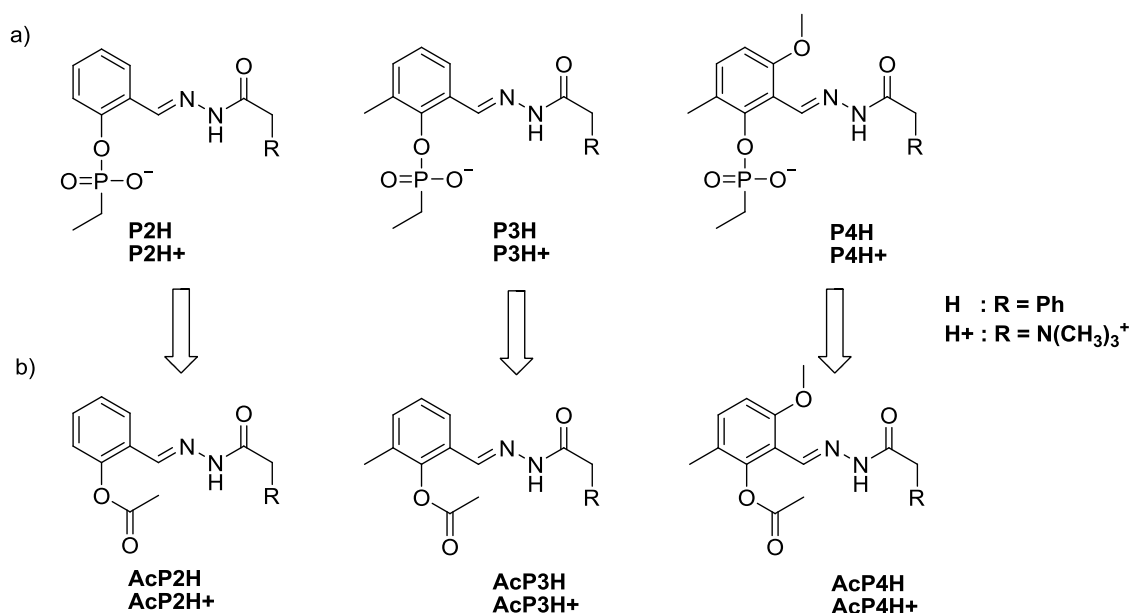


Figura 4.4: Molecole utilizzate a) negli studi di stabilità; b) durante gli studi cinetici.

Esse sono analoghe agli idrazoni utilizzati negli esperimenti di stabilità, ma il gruppo fosfonato è stato sostituito da un gruppo acetile. L'effetto catalitico osservato deriva dalla formazione di un'interazione non covalente tra il gruppo laterale dell'idrazone e lo stato di transizione relativo alla transesterificazione del gruppo estereo. Occorre precisare che questi sistemi non sono veri e propri catalizzatori in quanto non presentano *turnover*: l'idrazone "assiste" la formazione dello stato di transizione determinando un aumento della velocità.

Prima di effettuare gli esperimenti cinetici è stata testata la stabilità del legame imminico alle condizioni in cui si svolge la reazione. Questo controllo è necessario per escludere la presenza di reazioni diverse dalla transesterificazione nel sistema. A questo scopo l'idrazone modello **P1H+** (vedi capitolo 2) è stato sciolto in CD₃OD in un tubo NMR. Successivamente è stata aggiunta una soluzione di NaOCD₃ preparata sciogliendo Na metallico in CD₃OD di modo da raggiungere una concentrazione nel tubo pari a 12 equivalenti rispetto alla concentrazione di idrazone. L'analisi ¹H NMR effettuata in tempi diversi mostra che il legame imminico è stabile nelle condizioni utilizzate per la cinetica, risultato che viene confermato anche dall'analisi ESI-MS effettuata sul campione.

Inizialmente lo studio è stato rivolto ai derivati esterei **AcP2H** e **AcP2H+** (Figura 4.4). La velocità di transesterificazione di questi composti è stata misurata in metanolo utilizzando un eccesso di sodio metossido. Una volta ottenute le costanti cinetiche di secondo ordine k_2 , è stato eseguito un confronto per valutare l'eventuale effetto del gruppo ammonio sulla velocità della reazione. Lo stesso studio viene poi esteso ad altre coppie di derivati: occorre precisare che il confronto avviene solo tra coppie di derivati che presentano come unica differenza il gruppo presente in catena laterale dell'idrazione (ammonio o fenile). Il confronto tra coppie diverse non è informativo per gli scopi proposti dato che la reattività intrinseca delle specie è differente, in quanto risulta influenzata dai sostituenti presenti sull'anello.

La scelta di un tecnica UV-Vis per la misura della cinetica di transesterificazione prevede innanzitutto la determinazione della lunghezza d'onda migliore alla quale registrare la cinetica. A questo scopo sono stati registrati gli spettri UV-Vis delle specie **AcP2H** e **AcP2H+** e dei relativi fenati non acetilati, ottenuti aggiungendo un eccesso di sodio metossido ai rispettivi fenoli **OP2H** e **OP2H+** (Figura 4.5).

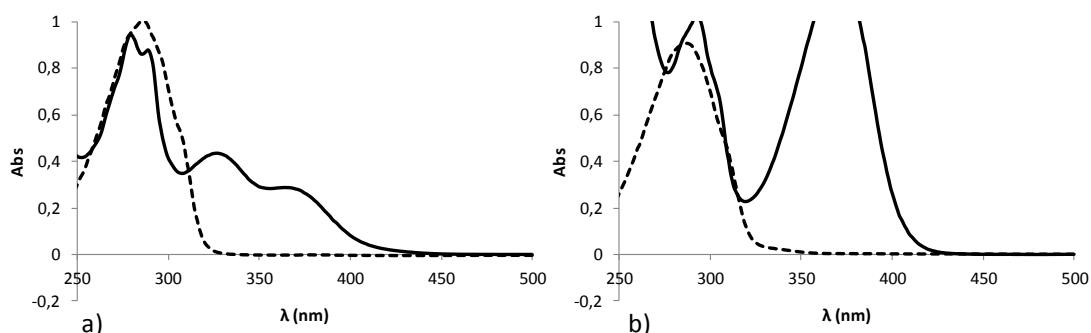


Figura 4.5: Spettri di assorbimento UV-Vis registrati in MeOH, 25°C. a) [**AcP2H**] = 0.05 mM, linea tratteggiata, [**OP2H**] = 0.05 mM + 10 eq NaOMe linea continua; b) [**AcP2H+**] = 0.05 mM, linea tratteggiata, [**OP2H+**] = 0.05 mM + 10 eq NaOMe linea continua.

La lunghezza d'onda alla quale effettuare l'esperimento è stata scelta sulla base della massima differenza di assorbanza tra il derivato acetilato e il rispettivo fenato, e risulta essere di 360 nm per la specie **AcP2H** e 400 nm per **AcP2H+**. Gli esperimenti cinetici sono stati svolti in metanolo, in modo da utilizzare condizioni più simili possibile a quelle utilizzate negli esperimenti di stabilità.

Il risultato degli esperimenti cinetici risulta molto diverso da quanto atteso in base agli esperimenti di stabilità dei rispettivi TSA: la reazione di transesterificazione di **AcP2H+** risulta più lenta di quella di **AcP2H** di circa 2 volte (Figura 4.6). L'analisi ESI-MS svolta sui campioni prima dell'inizio della reazione e alla fine della cinetica confermano

l'avvenuta deacetilazione per entrambi i composti, mentre un'analisi UHPLC e delle miscele esclude la presenza di reazioni secondarie. La tabella 4.1 riporta i risultati di k_{obs} e k_2 ottenuti.

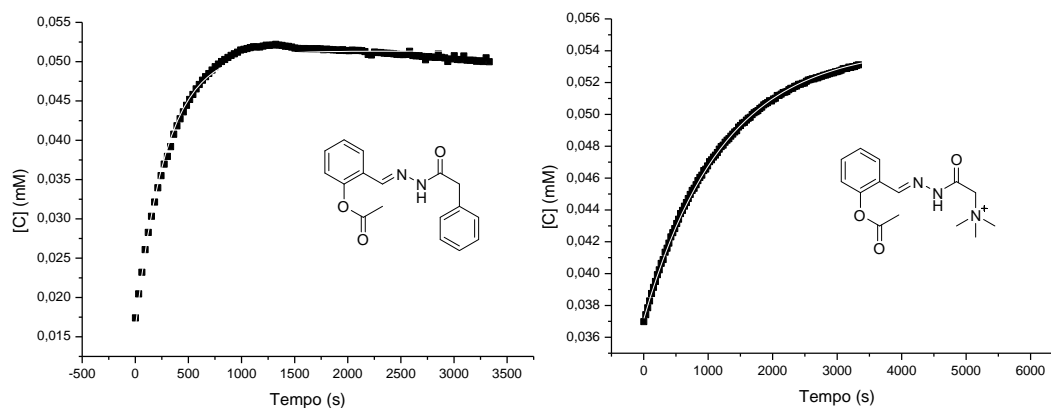


Figura 4.6: Cinetiche di deacetilazione seguite con UV-Vis, MeOH, 25°C. a) $[\text{Ac2H}]_0 = 0.05$ mM, $[\text{NaOMe}] = 0.5$ mM, 360 nm; b) $[\text{AcP2H+}]_0 = 0.05$ mM, $[\text{NaOMe}] = 0.95$ mM, 400 nm.

Tabella 4.1 : Costanti ricavate dagli esperimenti cinetici per **AcP2H** e **AcP2H+**

	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-3}$	$k_2 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
AcP2H	3.48	3.64
AcP2H+	0.82	1.72

UV-Vis, MeOH, 25°C. a) $[\text{Ac2H}]_0 = 0.05$ mM, $[\text{NaOMe}] = 0.5$ mM, 360 nm; b) $[\text{AcP2H+}]_0 = 0.05$ mM, $[\text{NaOMe}] = 0.95$ mM, 400 nm.

Preso atto del risultato inaspettato, lo stesso esperimento di deacetilazione è stato ripetuto anche sulle altre coppie di derivati acetilati **AcP3H/AcP3H+** e **AcP4H/AcP4H+**. L'esperimento di deacetilazione è stato svolto utilizzando la stessa procedura, verificando l'avvenuta deacetilazione con ESI-MS o UHPLC sulle miscele dopo la reazione. Sorprendentemente, per tutte le coppie di composti considerate, la reattività del derivato che presenta il gruppo ammonio è minore di quella che presenta il derivato che porta il fenile (Figura 4.7). La tabella 4.2 riassume i risultati ottenuti.

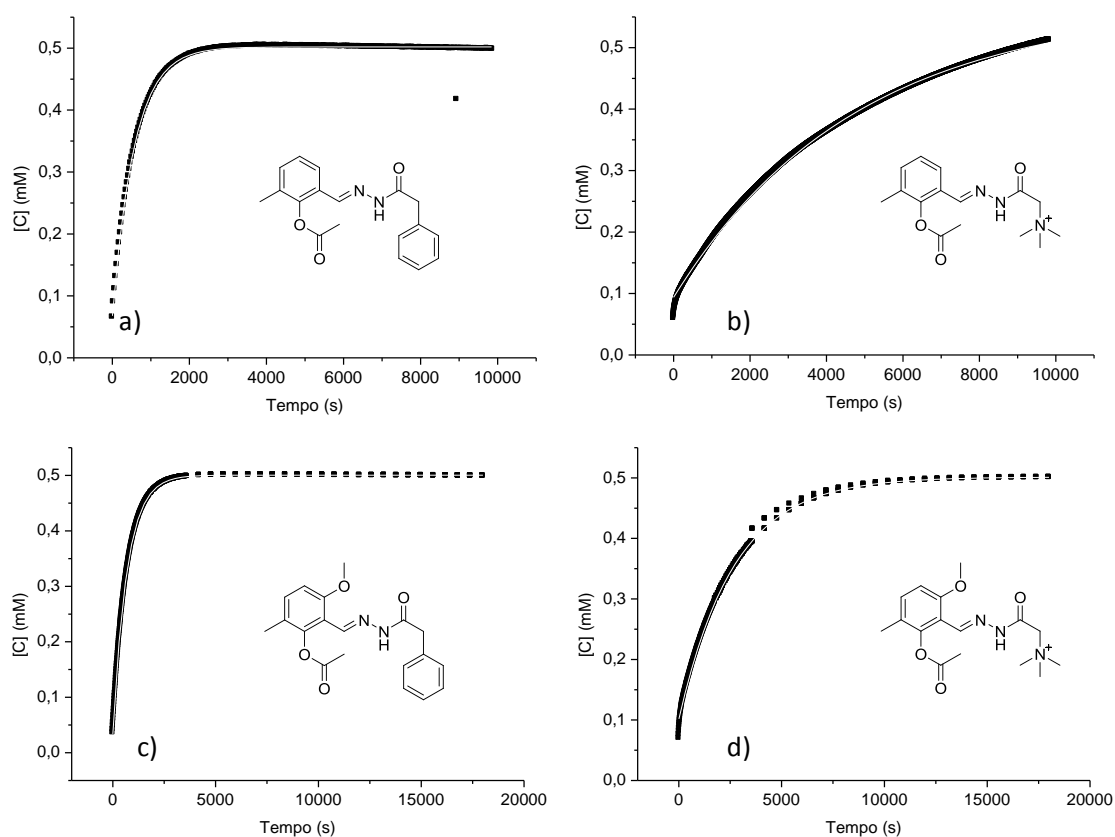


Figura 4.7 : Cinetiche di transesterificazione, MeOH, 25°C relative alle specie a) $[\text{AcP3H}] = 0.5$ mM, $[\text{NaOMe}] = 5$ mM; b) $[\text{AcP3H}^+] = 0.5$ mM, $[\text{NaOMe}] = 5$ mM; c) $[\text{AcP4H}] = 0.5$ mM $[\text{NaOMe}] = 25$ mM; d) $[\text{AcP3H}^+] = 0.5$ mM, $[\text{NaOMe}] = 25$ mM.

Tabella 4.2 : Costanti ricavate dagli esperimenti cinetici

	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-3}$	$k_2 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
AcP3H	1.74	0.34
AcP3H⁺	0.21	0.042
AcP4H	1.44	0.058
AcP4H⁺	0.37	0.015

MeOH, 25°C $[\text{AcP3H}] = 0.5$ mM, $[\text{NaOMe}] = 5$ mM; $[\text{AcP3H}^+] = 0.5$ mM, $[\text{NaOMe}] = 5$ mM $[\text{AcP4H}] = 0.5$ mM $[\text{NaOMe}] = 25$ mM; $[\text{AcP3H}^+] = 0.5$ mM, $[\text{NaOMe}] = 25$ mM.

In entrambi i casi i risultati mostrano chiaramente che il derivato contenente il gruppo ammonio viene deacetilato più lentamente del rispettivo idrazone in cui l'ammonio è sostituito dal gruppo fenile. Questo risultato è totalmente in disaccordo rispetto a quanto atteso dagli esperimenti di stabilità dei relativi TSA, in cui entrambe le specie contenenti il gruppo ammonio presentavano una stabilità maggiore rispetto agli omologhi fenilici. L'effetto non atteso ha portato alla necessità di riesaminare il sistema, riconsiderando attentamente l'effetto del gruppo ammonio sullo stato di transizione.

Il meccanismo della reazione utilizzata come modello prevede la formazione di un intermedio tetraedrico, con il passaggio attraverso due stati di transizione diversi: il primo relativo all'attacco dell'alcolato al carbonile dell'estere, il secondo relativo all'uscita del fenato con formazione del nuovo estere metilico (Figura 4.8).

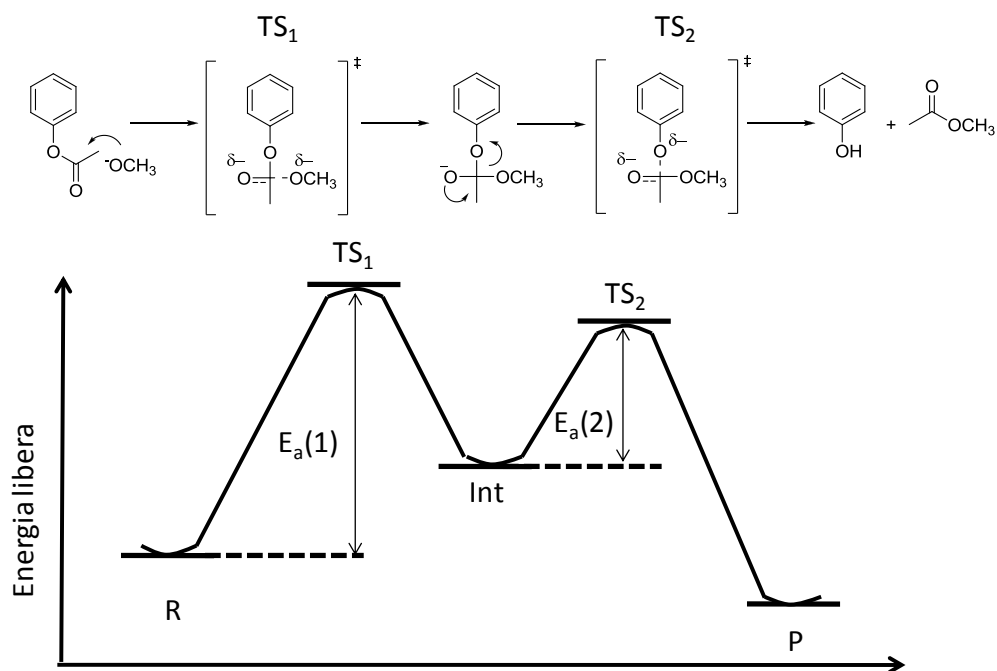
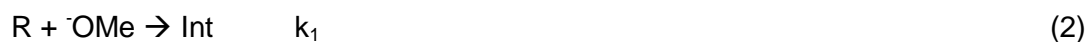


Figura 4.8: Andamento dell'energia libera rispetto alla coordinata di reazione ipotizzata per la reazione modello. $E_a(1)$ e $E_a(2)$ sono le energie di attivazione relative alla formazione rispettivamente del primo e del secondo stato di transizione (rispettivamente TS_1 e TS_2).

In questo modo l'intero processo può essere descritto da due reazioni elementari:



in cui R rappresenta l'estere fenilico di partenza, Int l'intermedio e P il prodotto. A ognuna compete una costante cinetica diversa, descritta rispettivamente da k_1 e k_2 . La relazione di Arrhenius, descritta dall'equazione (4), associa a ogni costante il valore di energia di attivazione relativo alla formazione dello stato di transizione:

$$k = A \exp \frac{-E_a}{RT} \quad (4)$$

La velocità della reazione globale è determinata dal processo al quale compete l'energia di attivazione maggiore, che viene definito *Rate Determining Step* (RDS) della reazione. L'effetto catalitico si esprime solamente se viene abbassata l'energia di attivazione del

RDS, mentre la stabilizzazione di stati di transizione che non costituiscono il RDS non contribuiscono in alcun modo a un aumento della velocità di reazione.

Il gruppo fosfonato utilizzato negli esperimenti di stabilità è l'analogo del primo stato di transizione, ma se questo non costituisse il RDS della reazione, viene persa la correlazione tra gli studi di amplificazione e quelli di catalisi. Infatti le strutture relative ai due stati di transizione presentano caratteristiche strutturali ed elettroniche diverse, pertanto il gruppo fosfonato potrebbe rappresentare il primo, senza mimare altrettanto bene il secondo. Gli esperimenti effettuati finora non consentono di stabilire quale dei due stati di transizione costituisca il RDS della reazione: tale informazione è ricavabile da una misurazione dell'ordine della reazione rispetto al metossido.

Nell'ipotesi in cui il RDS sia costituito dall'attacco del metossido, la velocità globale della reazione verrebbe descritta dalla costante di secondo ordine k_2 , secondo la relazione ricavata da (2):

$$v = k_2 [R][^-\text{OMe}] \quad (5)$$

in cui v è la velocità globale di reazione, $[R]$ è la concentrazione di estere e $[^-\text{OMe}]$ è la concentrazione di metossido. Se questo processo costituisce il RDS, allora la velocità v presenterà ordine 1 rispetto alla concentrazione di metossido $[^-\text{OMe}]$. Al contrario se il RDS è costituito dal secondo processo, la legge di velocità risulta:

$$v = k_1 [\text{Int}] \quad (6)$$

in cui $[\text{Int}]$ è la concentrazione di intermedio formato nella reazione e k_1 è la costante cinetica di primo ordine. In questo caso l'ordine di reazione rispetto al metossido è zero.

Il calcolo dell'ordine di reazione rispetto al metossido prevede la misura della velocità iniziale v_0 , ottenibile in condizioni in cui la concentrazione dei reagenti può essere approssimata alla loro concentrazione prima dell'inizio della reazione. Essa si ottiene dalla pendenza della retta di *fitting* che descrive la formazione del prodotto (o la scomparsa del reagente) nella parte iniziale della reazione. Se l'attacco del metossido costituisce il RDS, la velocità iniziale è descritta da:

$$v_0 = k [R]_0 [^-\text{OMe}]_0 \quad (7)$$

in cui $[R]_0$ e $[^-\text{OMe}]_0$ sono le concentrazioni iniziali di reagente e metossido prima dell'inizio della reazione. La velocità iniziale viene calcolata utilizzando diverse concentrazioni iniziali di $[^-\text{OMe}]_0$, quindi si riporta in grafico il logaritmo di v_0 contro il logaritmo di $[^-\text{OMe}]_0$: la pendenza della retta ottenuta indica il valore dell'ordine di

reazione rispetto al metossido ed ha valore unitario solo nel caso in cui il RDS sia costituito dalla formazione del primo stato di transizione.

4.2.1 Calcolo dell'ordine di reazione e esperimenti cinetici

È stata presa in esame la reazione di transesterificazione delle specie **AcP2H** e **AcP2H+**. Lo studio è stato effettuato nelle stesse condizioni utilizzate negli esperimenti precedenti, misurando la velocità iniziale a diverse concentrazioni iniziali di metossido. Il *fitting* lineare del logaritmo della velocità iniziale rispetto al logaritmo della concentrazione di metossido ha fornito il valore dell'ordine di reazione (Figura 4.9): è stato ottenuto un valore di 1.5 per **AcP2H** e di 0.2 per **AcP2H+**.

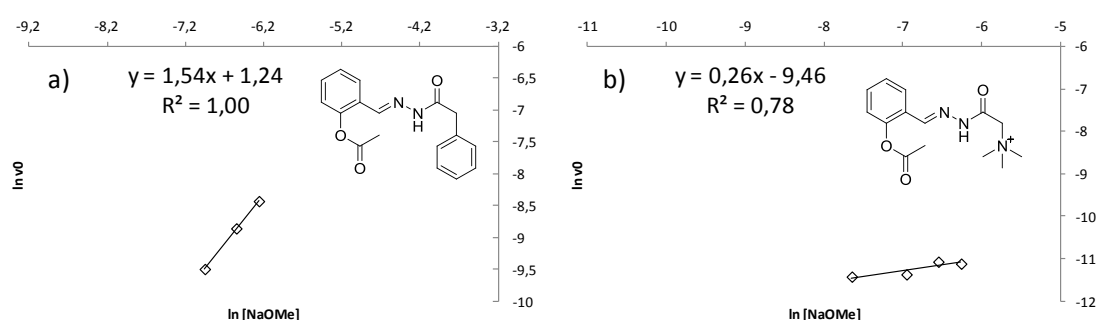


Figura 4.9: Plot per il calcolo dell'ordine di reazione rispetto a NaOMe. a) [**AcP2H**] = 0.05 mM, MeOH; b) [**AcP2H+**] = 0.05 mM, MeOH.

Questo risultato mostra come nel caso di **AcP2H** il RDS sia costituito dall'attacco del metossido, mentre per **AcP2H+** esso è rappresentato dall'uscita del fenato. Questo potrebbe spiegare il mancato effetto catalitico a seguito dell'introduzione in catena laterale del gruppo ammonio: la velocità di transesterificazione di **AcP2H+** non è correlabile con la stabilità di **P2H+** dato che il RDS non è quello rappresentato dall'analogo.

I risultati ottenuti da questi esperimenti permettono comunque di formulare delle ipotesi riguardo all'effetto dell'introduzione del gruppo ammonio, che causa il cambiamento del RDS relativo alla reazione rispetto alla transesterificazione di **AcP2H**. I valori delle energie di attivazione derivano dal bilancio energetico tra le stabilità relative di reagenti, stati di transizione e intermedio. Si può supporre con buona sicurezza che la presenza di un gruppo ammonio carico positivamente in catena laterale possa determinare la formazione di interazioni non covalenti sia in entrambi gli stati di transizione sia nell'intermedio dato che in tutte queste situazioni viene formata una (parziale) carica

negativa. Il grado di stabilizzazione di queste specie indotto dalla presenza del gruppo ammonio determina quale sarà il RDS della reazione (Figura 4.10).

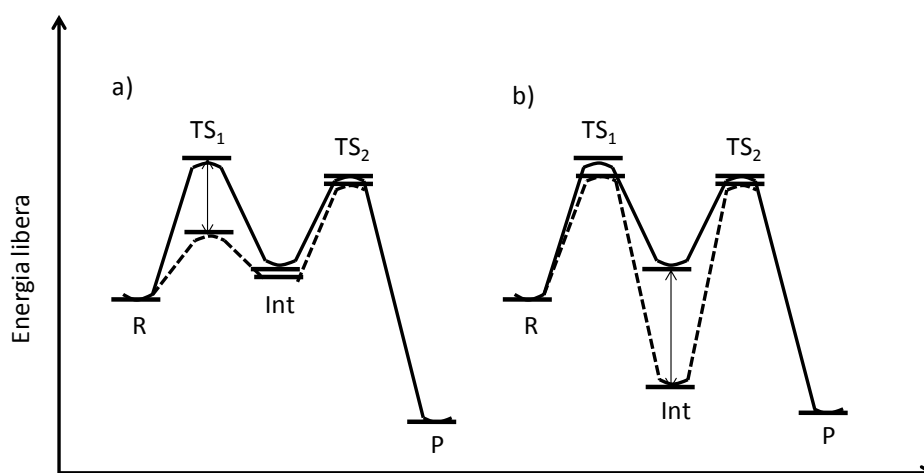


Figura 4.10: Schema dell'andamento dell'energia libera per la transesterificazione di **AcP2H** (linea continua) e di **AcP2H⁺** (linea tratteggiata). Mentre per **AcP2H** il RDS è l'attacco dell'alcolato, nel caso di **AcP2H⁺** il RDS è l'uscita del fenato. a) la presenza di un gruppo ammonio stabilizza maggiormente TS₁ rispetto a TS₂; b) la stabilizzazione maggiore si osserva per l'intermedio.

A seconda della specie che meglio viene stabilizzata è possibile distinguere due situazioni:

- i) il primo stato di transizione viene stabilizzato molto più del secondo, di modo che il RDS passa dall'attacco del metossido all'uscita del fenato (Figura 4.8a);
- ii) la stabilizzazione maggiore si osserva per l'intermedio, determinando un aumento dell'energia di attivazione del processo di uscita del fenato (figura 4.8b).

E' difficile stabilire a priori quale sia la situazione che meglio rappresenta il sistema, in ogni caso il risultato macroscopico che si ottiene è una cinetica di transesterificazione più lenta di **AcP2H⁺** rispetto a **AcP2H**.

La validità dell'approccio che prevede la presenza di un effetto catalitico per stabilizzazione del RDS attraverso interazioni non covalenti può comunque essere dimostrata. Sono stati effettuati gli stessi esperimenti di misura dell'ordine di reazione cambiando la natura del solvente e dell'alcolato che dà l'attacco.

In particolare la misura dell'ordine di reazione è stata eseguita in terbutanolo utilizzando come alcolato il potassio terbutossido. Questo alcolato è stato scelto in virtù del suo maggiore ingombro sterico che dovrebbe sfavorire l'attacco rispetto al metossido, in

modo tale che l'attacco nucleofilo possa costituire il RDS per entrambe le specie. Il calcolo dell'ordine di reazione mostra che per entrambe le specie l'ordine di reazione è unitario, portando a concludere che il RDS è costituito in entrambi i casi dall'attacco nucleofilo (Figura 4.11).

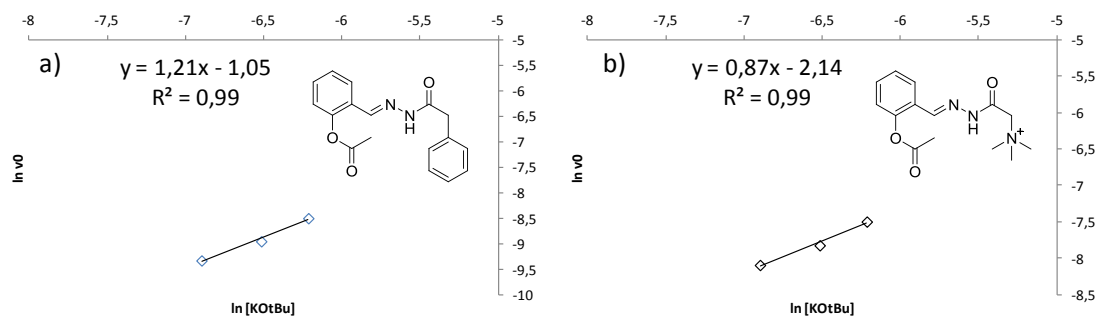


Figura 4.11: Plot per il calcolo dell'ordine di reazione rispetto all'alcolato. a) $[\text{AcP2H}] = 0.1$ mM, tBuOH; b) $[\text{AcP2H}^+] = 0.1$ mM, tBuOH.

A differenza di quanto accade in metanolo, le cinetiche di transesterificazione svolte in terbutanolo mostrano chiaramente una reattività maggiore di **AcP2H⁺** rispetto a **AcP2H** (Figura 4.12). Questo risultato è perfettamente in accordo con quanto ipotizzato: dal momento che il RDS è costituito dall'attacco dell'alcolato, allora il TSA è rappresentativo dello stadio determinante: ne consegue che l'introduzione di un gruppo ammonio aumenta la velocità di reazione rispetto al relativo derivato fenilico.

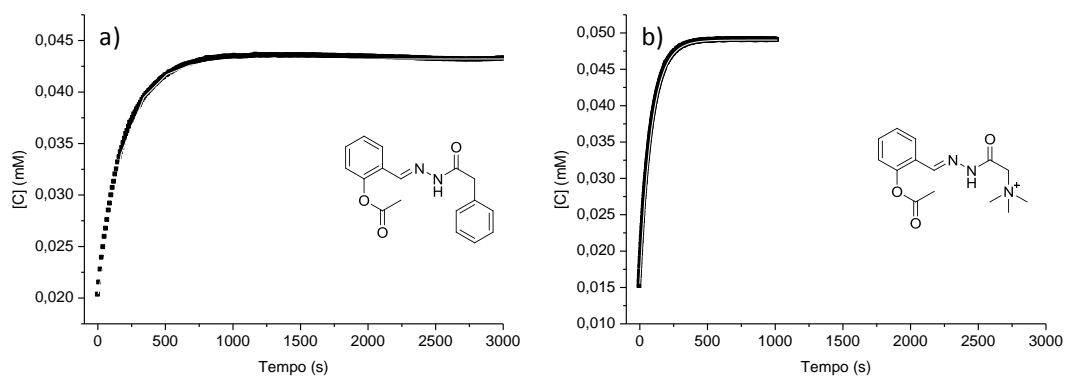


Figura 4.12: Cinetiche di transesterificazione in terbutanolo. a) $[\text{AcP2H}] = 0.05$ mM, $[\text{KOtBu}] = 0.95$ mM; b) $[\text{AcP2H}^+] = 0.05$ mM, $[\text{KOtBu}] = 0.95$ mM.

Tabella 4.3: Costanti ricavate dagli esperimenti cinetici

	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-3}$	$k_2 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
AcP2H	5.36	5.64
AcP2H+	11.5	12.1

tBuOH, 25°C relative alle specie [AcP2H]=0.05 mM, [KOtBu] 0.95 mM; [AcP2H+]=0.05 mM, [KOtBu] 0.95mM

Gli stessi esperimenti sono stati ripetuti anche per la coppia **AcP3H** e **AcP3H+** che mostrava in metanolo un comportamento analogo a quello di **AcP2H** e **AcP2H+** (vedi Tabella 4.2). Anche in questo caso la minore reattività di **AcP3H+** rispetto a **AcP3H** può essere spiegata dall'osservazione secondo cui in metanolo il RDS per **AcP3H+** è costituito dall'uscita del fenato. Anche in questo caso infatti si ottiene un valore unitario per **AcP3H** (1.4), mentre il risulta 0.3 per **AcP3H+**. Allo stesso modo, in terbutanolo entrambe le specie mostrano un ordine di reazione unitario, confermando che in questo regime sperimentale l'attacco nucleofilo costituisce in RDS per entrambe le molecole.

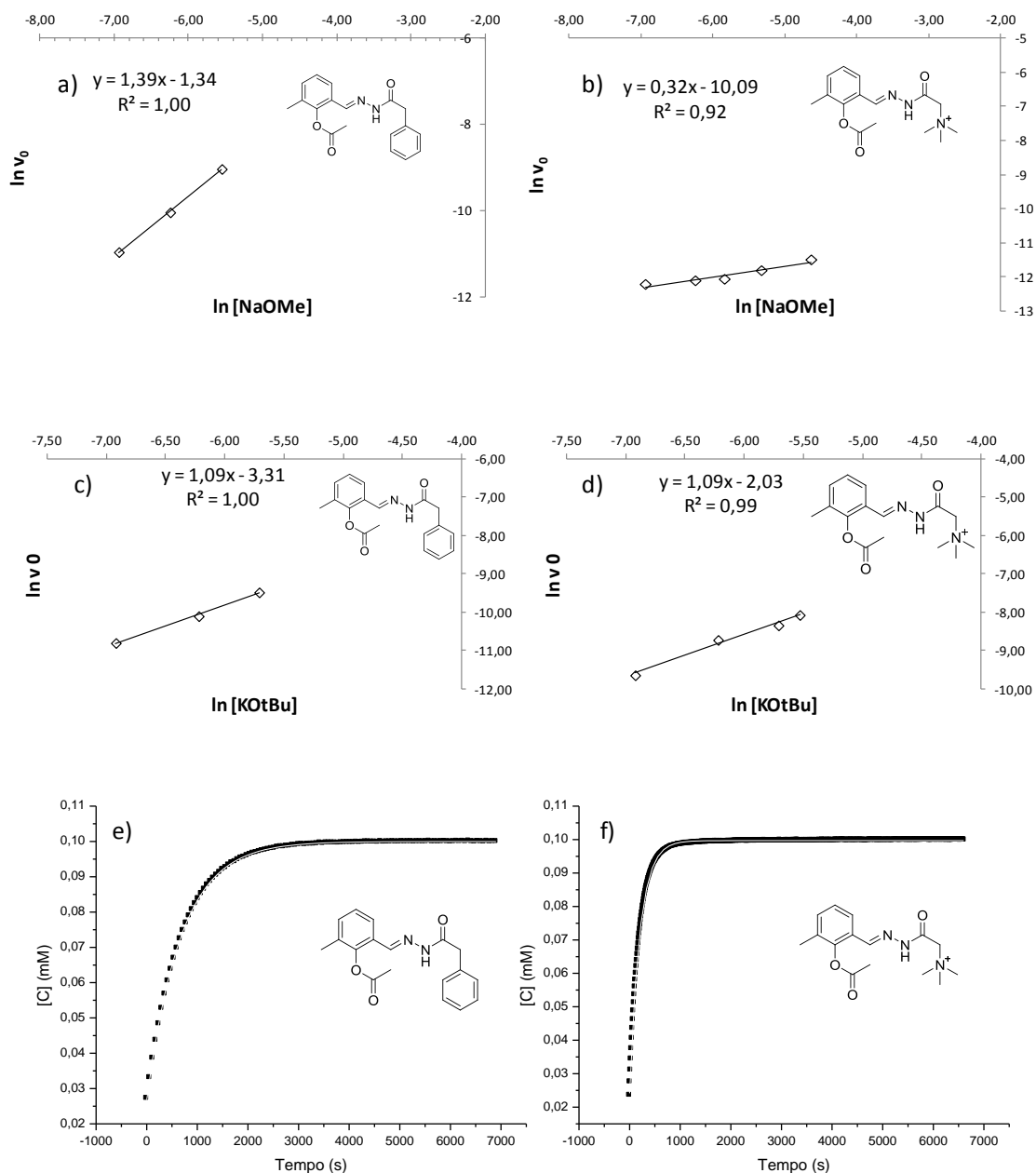


Figura 4.13. Calcolo dell'ordine di reazione e cinetiche di transesterificazione per la coppia **AcP3H/AcP3H+**. a) $[\text{AcP3H}] = 0,1 \text{ mM}$, MeOH; b) $[\text{AcP3H}^+] = 0,1 \text{ mM}$, MeOH; c) $[\text{AcP3H}] = 0,1 \text{ mM}$, tBuOH; d) $[\text{AcP3H}^+] = 0,1 \text{ mM}$, tBuOH; e) $[\text{AcP3H}] = 0,1 \text{ mM}$, $[\text{KOtBu}] 0,33 \text{ mM}$; f) $[\text{AcP3H}^+] = 0,1 \text{ mM}$, $[\text{KOtBu}] 0,33 \text{ mM}$.

Tabella 4.4 : Costanti ricavate dagli esperimenti cinetici

	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-3}$	$k_2 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
AcP3H	1.48	0.45
AcP3H+	4.95	1.5

[AcP3H]=0.1 mM, [KOtBu] 3.3 mM; [AcP3H+]=0.1 mM, [KOtBu] 3.3 mM, tBuOH, 25°C.

Occorre precisare che in nessuno dei due casi è possibile effettuare un confronto quantitativo accettabile tra i dati cinetici ottenuti e quelli di stabilità termodinamica dato che i due esperimenti sono stati svolti in condizioni sperimentali molto diverse. Vale comunque la pena di notare che l'introduzione di un gruppo ammonio ha un effetto maggiore nel caso della coppia **AcP3H/AcP3H+** di quanto avviene per gli omologhi **AcP2H/AcP2H+**: questo risultato è in linea con i dati di stabilità derivati dal confronto degli scaffold **P2** e **P3** (vedi capitolo 3), in cui la maggiore stabilizzazione introdotta dal gruppo ammonio in **P3H+** rispetto a **P2H+** era stata correlata con un effetto derivato dalla presenza in **P3** del gruppo metile in posizione 6, che si dimostrava in grado di orientare in modo favorevole i due gruppi interagenti.

Tabella 4.5: Confronto tra le reattività di **AcP2Hx** e **AcP3Hx**

	AcP2Hx	AcP3Hx
$k_{\text{H}^+} / k_{\text{H}}$	2.14	3.34

4.2.2 Effetto dell'isomeria

Nel caso degli idrazoni l'analisi del sistema è complicata anche dalla presenza dell'isomeria relativa al legame amminico. Infatti anche i derivati acetilati degli idrazoni presentano la stessa isomeria già osservata in precedenza, con la formazione di due specie distinte, facilmente distinguibili all' NMR.

I risultati ottenuti dagli esperimenti di stabilità hanno portato a concludere che l'effetto del riconoscimento molecolare tra fosfonato e ammonio non era sufficiente a determinare un cambiamento rilevabile del rapporto isomerico (vedi capitolo 2, paragrafo 2.4), tuttavia non si può escludere esso possa esprimersi nell'evento catalitico.

È stato osservato che il rapporto isomerico varia a seconda del gruppo presente in orto rispetto all'idrazone/immina: in particolare i derivati acetilati presentano un rapporto isomerico differente rispetto ai relativi fenoli e ai fosfonati. Risulta quindi possibile effettuare uno studio della variazione del rapporto isomerico lungo la coordinata di reazione, passando dai reagenti (derivati acetilati), allo stato di transizione (rappresentato dal derivato fosfonato), fino ai prodotti (derivati fenolici). È possibile

notare come il rapporto isomerico vari durante la reazione sia per le specie che presentano il fenile in catena laterale, sia per quelle in cui è presente il gruppo fosfonato.

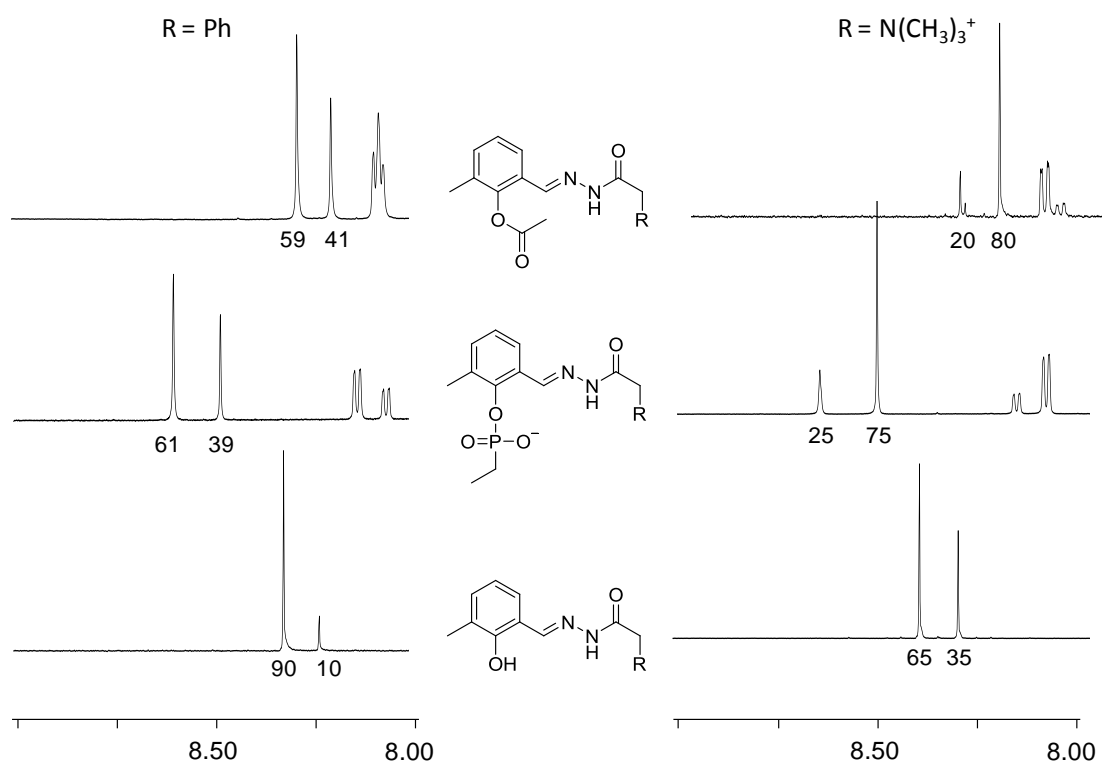


Figura 4.10: Porzione di spettro ^1H NMR relativo alla zona dei segnali imminici, CD_3OD , 25°C . Sotto ogni segnale è riportato il rapporto isomerico.

Il quadro risulta ulteriormente complicato dal fatto che l'equilibrio di isomerizzazione è influenzato sensibilmente dalla concentrazione di NaOMe presente in soluzione. Questa osservazione è stata verificata per la specie **P3H+** e per il relativo derivato ossidrilico **P3H+(OH)** presentati in figura 4.11, registrando gli spettri NMR relativi a ogni specie dopo l'aggiunta di diverse quantità di metossido di sodio e confrontando i segnali relativi a ogni isomero.

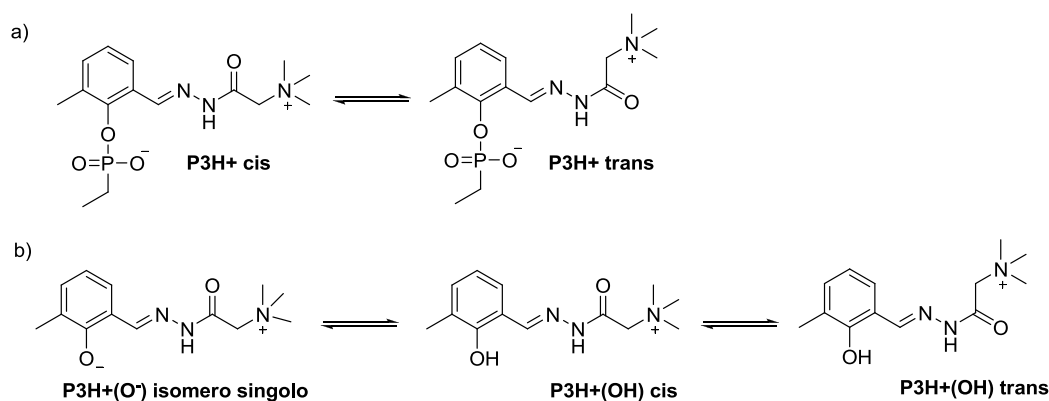


Figura 4.11: Equilibri di isomeria cis-trans. a) isomeria cis-trans relativa ai derivati che presentano il fosfonato; b) isomeria cis trans e equilibrio acido base dei derivati ossidrilici.

Nel caso di **P3H+** il rapporto isomerico cis:trans passa da 20:80 a 90:10 dopo l'aggiunta di 10 equivalenti di NaOMe. Per il corrispondente derivato ossidrilico occorre tenere conto anche della deprotonazione dell'ossidrilico ad opera della base metossido che forma il fenato corrispondente, presente come singolo isomero con *chemical shift* a 8.31 ppm. Le Tabelle 4.3 e 4.4 riportano i risultati ottenuti.

Tabella 4.3: Rapporto isomerico nell'idrazone **P3H+**

NaOCD ₃ Equivalenti	% isomero cis (<i>cs</i> , ppm)	% isomero trans (<i>cs</i> , ppm)
0	19 (8.24)	81 (8.54)
1	37 (8.75)	63 (8.54)
10	90 (8.69)	10 (8.52)

¹H NMR, [P3H+] 5 Mm, CD₃OD, 25°C.

Tabella 4.4: Rapporto isomerico nell'idrazone **P3H+(OH)**

NaOCD ₃ Equivalenti	% isomero cis (<i>cs</i> , ppm)	% isomero trans (<i>cs</i> , ppm)
0	35 (8.29)	65 (8.17)
0.33	59 (8.31)	41 (8.17)
0.66	65 (8.31)	35 (8.17)
0.99	71 (8.31)	29 (8.17)
5	95 (8.31)	5 (8.18)
10	99 (8.31)	<1 (8.19)

¹H NMR, CD₃OD, 25°C. [P3H+(OH)] 5 mM.

Queste osservazioni mostrano chiaramente l'esistenza di un equilibrio di isomerizzazione cis-trans che avviene durante la reazione di transesterificazione: gli isomeri originati hanno stabilità termodinamiche differenti che possono essere dedotte dal loro rapporto isomerico. I dati ricavati dagli esperimenti fanno dedurre che l'equilibrio di isomerizzazione sia rapido rispetto alla velocità con cui avviene la reazione di transesterificazione: in questo modo è possibile considerare gli isomeri come una specie unica, la cui energia libera è data dalla media pesata delle energie libere relative agli isomeri che la costituiscono. In questo modo, benché gli isomeri considerati come specie singole possano presentare reattività differenti rispetto alla transesterificazione, l'esistenza di un rapido equilibrio di interconversione cis:trans permette di poterli considerare come un'unica specie, la cui reattività deriva dal bilancio delle energie libere di reagenti, stati di transizione e intermedi. Questa ipotesi è confermata dalla cinetica di transesterificazione di **AcP3H+** seguita con spettroscopia ^1H NMR, che ha permesso di seguire separatamente la scomparsa dei due isomeri relativi al reagente. La cinetica mostra come la velocità di scomparsa dei due isomeri sia la stessa, corrispondente alla formazione del prodotto fenato, presente come singolo isomero. Questi risultati permettono di concludere che l'isomeria non influisce in modo determinante sulla reattività relativa dei composti in esame.

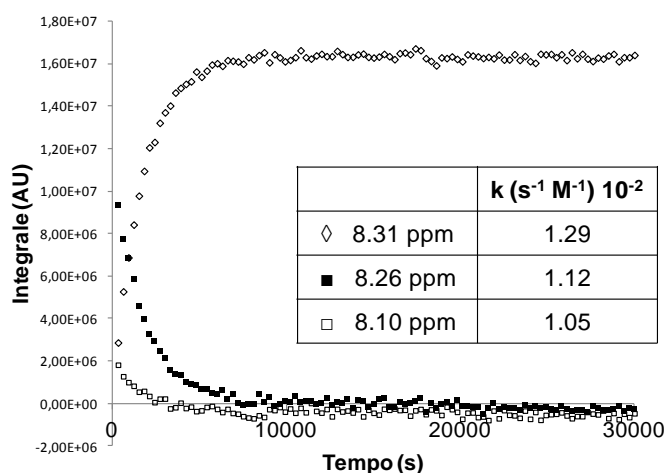


Figura 4.12: Cinetica di transesterificazione di **AcP3H+** seguita con ^1H NMR, CD_3OD , 298K. $[\text{AcP3H}^+] = 2.5 \text{ mM}$, $[\text{NaOCD}_3] = 25 \text{ mM}$. Il grafico riporta l'andamento dei segnali relativi al prodotto (◇, 8.31 ppm), all'isomero cis (■, 8.26 ppm) e all'isomero trans (□, 8.10 ppm).

4.3 Immine

Lo studio cinetico è stato esteso anche ai derivati imminici: anche in questo caso è stata dedicata un'attenzione particolare alla determinazione del RDS della reazione e all'effetto del gruppo ammonio sulla cinetica di reazione.

A differenza di quanto è avvenuto per i derivati esterei degli idrazoni, per le immine è stato necessario operare dei cambiamenti strutturali per poter effettuare gli studi. La scarsa stabilità dei derivati imminici rispetto agli idrazoni infatti ha impedito la sintesi di alcuni composti acetilati. Per gli idrazoni la formazione dei derivati acetilati ha previsto innanzitutto la sintesi dell'idrazone contenente la funzione ossidrilica, che viene successivamente acetilata attraverso il trattamento con anidride acetica in presenza di base. L'utilizzo della stessa strategia sintetica non ha permesso la sintesi dei derivati imminici acetilati all'ossidrilico, in quanto il legame imminico nella molecola contenente il gruppo ammonio si è rivelato instabile in tutte le condizioni utilizzate per l'acetilazione della funzione fenolica. Anche il tentativo di effettuare il *coupling* tra l'ammina e il derivato aldeidico preventivamente acetilato non ha portato a ottenere prodotto desiderato. Si è deciso pertanto di attuare dei cambiamenti strutturali sulle molecole, con lo scopo di renderle più stabili nelle condizioni utilizzate per l'acetilazione.

È stato deciso innanzitutto di ridurre il legame imminico, sostituendolo con un legame amminico molto più stabile. Un'ulteriore modifica strutturale ha riguardato la metilazione dell'ammina secondaria formata dopo la riduzione per evitare l'attacco intramolecolare sul gruppo estereo, ulteriormente favorita dalla formazione di un intermedio ciclico a sei membri. La figura 4.13 mostra i derivati imminici utilizzati durante gli esperimenti.

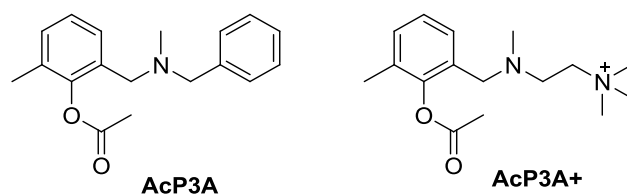


Figura 4.13: Derivati amminici utilizzati negli esperimenti cinetici.

Le nuove molecole così progettate mostrano caratteristiche strutturali molto simili alle immine di partenza. Rispetto ai risultati ottenuti con gli idrazoni si attende che l'utilizzo di un sistema più flessibile aumenti l'effetto indotto dall'introduzione dell'ammonio, analogamente a quanto avviene negli esperimenti di stabilità.

4.3.1 Stabilità in metanolo

Le prove di catalisi hanno evidenziato che i composti in esame, una volta sciolti in metanolo, presentano deacetilazione spontanea: il corrispondente fenolo viene formato anche senza l'aggiunta di un nucleofilo (Figura 4.14).

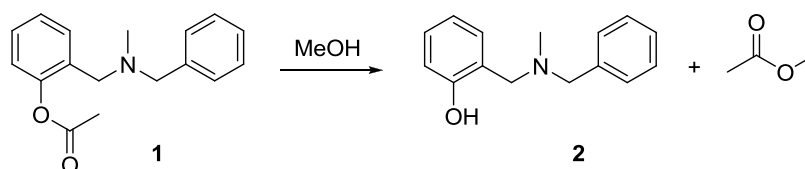


Figura 4.14: reazione di deacetilazione spontanea in metanolo evidenziata durante gli studi cinetici.

Vale la pena sottolineare che la velocità con cui avviene il processo di deacetilazione spontanea in metanolo è tutt'altro che trascurabile rispetto alla stessa reazione in presenza di un eccesso di sodio metossido, utilizzato come nucleofilo. La figura 4.15 riporta lo studio di deacetilazione in metanolo puro e in presenza di sodio metossido (12 equivalenti) per la molecola **1**.

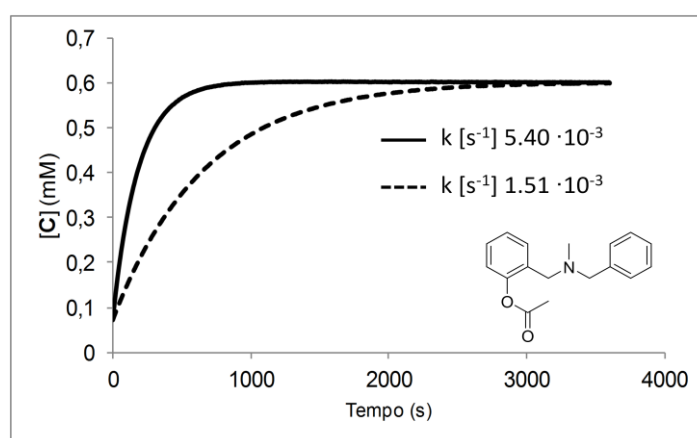


Figura 4.15: Cinetica di transesterificazione in MeOH, 25°C, 280 nm, [1] = 0.6 mM. Linea tratteggiata : MeOH; Linea continua: [NaOMe] 12eq.

L'avvenuta deacetilazione delle molecole viene valutata dal confronto dei relativi spettri UV-Vis prima e dopo la cinetica e viene confermata dall'analisi ESI-MS effettuata sul campione che mostra la scomparsa del segnale relativo al prodotto acetilato dopo la reazione e la comparsa del segnale relativo a **2**.

Dato che gli esperimenti svolti in precedenza sugli idrazoni non avevano evidenziato questa caratteristica, si è pensato che essa dovesse essere dovuta a un effetto

dell'ammina terziaria in orto rispetto al gruppo estereo. In particolare è stata ipotizzata un'attivazione del metanolo da parte dell'ammina terziaria verso l'attacco al carbonile dell'estere, con conseguente trasferimento del gruppo acetile presente sulla molecola al solvente (figura 4.16).

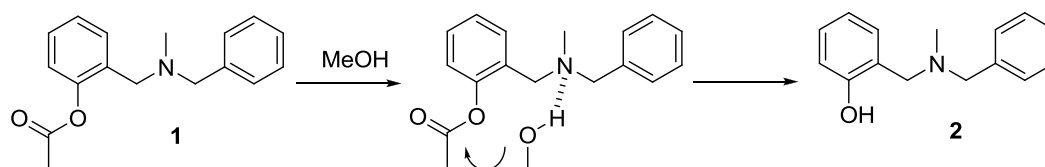


Figura 4.16: meccanismo ipotizzato per la reazione di deacetilazione spontanea.

L'effetto dell'ammina terziaria è evidente quando gli stessi esperimenti di deacetilazione vengono svolti in presenza di quantità stechiometriche di acido trifluoroacetico (TFA). L'acido protona l'ammina terziaria, impedendo l'attivazione del solvente verso l'attacco: il risultato è un'inibizione della reazione di deacetilazione spontanea, la cui velocità diminuisce di quattro volte in presenza di 1 equivalente di TFA e viene bloccata del tutto in presenza di 2 equivalenti (Figura 4.17)

I valori delle costanti di velocità calcolate dal *fitting* dei dati sono riportati in Tabella 4.5.

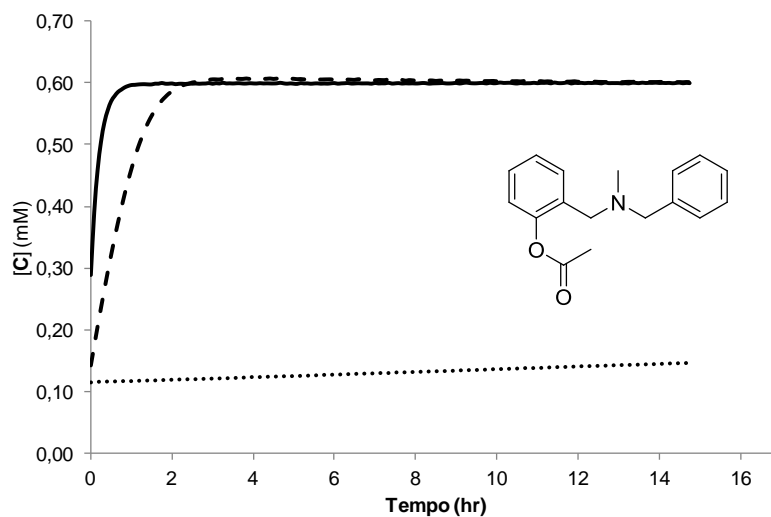


Figura 4.17: Cinetica di deacetilazione in MeOH al variare della concentrazione di TFA, 25°C, MeOH, 280 nm. [1] 0.6 mM in MeOH (linea continua); [1] 0.6 mM + 1 eq TFA (linea tratteggiata); [1] + 2 eq TFA (linea a punti).

Tabella 4.5: Valori della costante di velocità per la reazione di deacetilazione

	$k \text{ (s}^{-1}\text{)} \cdot 10^{-3}$
1 in MeOH	1.31
1 + 1eq TFA	0.36
1 + 2eq TFA	no reazione

[1] = 0.6 mM, MeOH, 25°C, 280 nm.

Questo effetto viene descritto anche in articoli di letteratura in cui viene riportato l'utilizzo di β ammino alcoli (alcoli sostituiti in posizione β da ammine terziarie) come potenziali catalizzatori per la reazione di deacetilazione di esteri (figura 4.18).⁵

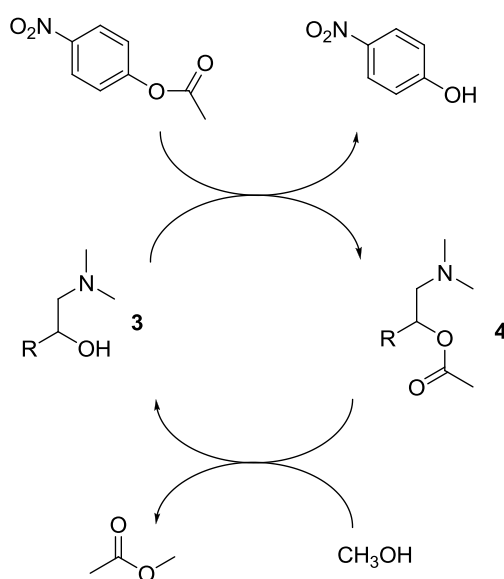


Figura 4.14: Ciclo catalitico relativo all'utilizzo di β ammino alcol nella reazione di deacetilazione del p-nitro fenil acetato.

Negli esempi riportati il β ammino alcol **3** dà attacco nucleofilo al carbonile del substrato estereo (p-nitrofenilacetato) con formazione di un intermedio in cui il gruppo acetile viene trasferito al catalizzatore. A questo punto avviene la deacetilazione spontanea del catalizzatore, assistita dall'ammina terziaria vicinale che porta alla rigenerazione del catalizzatore iniziale.⁶

Preso atto della reattività degli orto ammino esteri evidenziata negli esperimenti precedenti, la legge cinetica che descrive la velocità globale della reazione deve essere riscritta tenendo conto del contributo dovuto alla deacetilazione spontanea. In questo modo è possibile descrivere la velocità della reazione globale v_{tot} come somma di due contributi:

$$v_{\text{tot}} = k_2 [\text{OMe}][\text{estere}] + k_{\text{back}} [\text{MeOH}][\text{estere}] \quad (\text{M s}^{-1}) \quad (8)$$

$$v_{\text{tot}} = k_{\text{obs},2} [\text{estere}] + k_{\text{obs,back}} [\text{estere}] = (k_{\text{obs},2} + k_{\text{obs,back}}) [\text{estere}] \quad (9)$$

dove k_2 è la costante relativa all'attacco del metossido e k_{back} si riferisce alla reazione di *background* costituita dalla deacetilazione spontanea. È possibile calcolare separatamente i contributi della relazione (8), ottenendo per differenza il contributo dovuto all'attacco del metossido (9). Il valore di $k_{obs,back}$ si ottiene dal *fitting* dei dati della reazione in presenza di solo metanolo. Una volta ottenuto per differenza $k_{obs,2}$, il valore di k_2 si ottiene dalla relazione:

$$k_2 = k_{obs,2} / [OMe] \quad (10)$$

Anche nel calcolo dell'ordine di reazione occorre tenere conto della reazione di *background*: la velocità iniziale della reazione globale $v_{0,tot}$ è data dalla somma delle velocità iniziali relative ai due contributi:

$$v_{0,tot} = v_{0,2} + v_{0,back} \quad (11)$$

Da cui:

$$(v_{0,tot} - v_{0,back}) = v_{0,2} = k_2 [OMe]_0 [estere]_0 \quad (12)$$

Applicando il logaritmo a entrambi i contributi nella relazione (12) si ottiene che un *plot* di $\ln (v_{0,tot} - v_{0,back})$ contro $\ln [OMe]_0$ fornisce una retta di pendenza unitaria nel caso in cui l'ordine di reazione sia 1.

$$\ln (v_{0,tot} - v_{0,b}) = \ln [OMe]_0 + \ln k_1 [estere] \quad (13)$$

4.3.2 Calcolo dell'ordine di reazione ed esperimenti cinetici

Gli studi di transesterificazione svolti in metanolo indicano che solo la specie **AcP3H** presenta deacetilazione spontanea in metanolo. L'attivazione del metanolo da parte del gruppo amminico terziario prevede la formazione di un parziale carica positiva sull'ammina: la presenza di una carica positiva netta sulla molecola fornita dal gruppo ammonio potrebbe sfavorire la formazione di questa carica parziale, portando a un'inibizione della reazione di deacetilazione spontanea. In questo modo, la velocità di transesterificazione di **AcP3H** risulta formata dalla somma di due membri, mentre **AcP3H+** reagisce solo in presenza di metossido.

Il calcolo dell'ordine di reazione viene effettuato per le specie **AcP3A** e **AcP3A+**, avendo cura di correggere la velocità iniziale della reazione **AcP3A** per tenere conto della reazione di deacetilazione spontanea. A differenza di quanto avviene per gli idrazoni, l'ordine di reazione in metanolo risulta unitario per entrambe le specie (**AcP3A** 1.4;

AcP3A+ 1.0): questo porta a ipotizzare che in entrambi i casi il RDS sia costituito dall'attacco nucleofilo dell'alcolato (Figura 4.15).

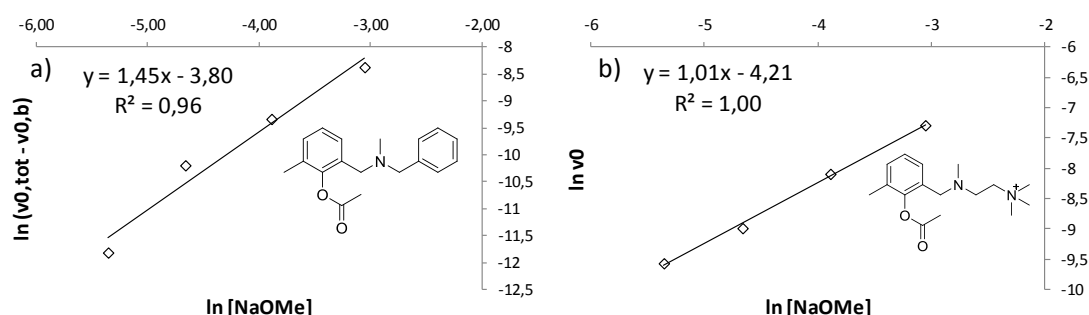


Figura 4.15: Calcolo dell'ordine di reazione per la coppia **AcP3A/AcP3A+** in metanolo, 25°C. a) **[AcP3A]** = 0.4 mM, MeOH; b) **[AcP3A+]** 0.4 mM, MeOH.

La cinetica di transesterificazione è stata studiata per entrambe le specie in presenza di 40 equivalenti di NaOMe, i risultati vengono riportati in Tabella 4.6.

Tabella 4.6 : Costante cinetica e ordine di reazione per la reazione di transesterificazione in metanolo

	k (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	$k_{obs,back}$ (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	$k_{obs,2}$ (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	$[NaOMe]$ (M) $\times 10^{-3}$	k_2 ($M^{-1}s^{-1}$) $\times 10^{-3}$
AcP3A	0.55	0.36	0.19	20.46	9.29
AcP3A+^a			1.30		63.5
k_{A+}/k_A					6.83

[AcP3A] = **[AcP3A+]** = 0.44 mM; **[NaOMe]** = 20.46 mM, 25°C, 280 nm. a) La molecola non presenta deacetilazione spontanea, quindi si ottiene direttamente il valore di $k_{obs,2}$

A differenza di quanto accade per gli idrazoni, i risultati cinetici sono in accordo con quanto atteso dai dati di stabilità in quanto la specie **AcP3A+** risulta più reattiva di **AcP3A**. Sostituendo il rapporto k_{A+} / k_A nella relazione (1) si ottiene il valore di ΔE_a relativo alla differenza tra le energie di attivazione:

$$\Delta E_a = -RT \ln \frac{k_{A+}}{k_A} \quad (14)$$

Dai dati cinetici si ottiene un valore di ΔE_a pari a 4.7 kJ/mol, che risulta essere in ottimo accordo con quello ottenuto dai dati di stabilizzazione ottenuti dalla libreria presentata nel Capitolo 3 (4.3 kJ/mol). Da questo si conclude che i TSA utilizzati per la formazione della libreria ben rappresentano i reali stati di transizione che costituiscono il RDS della reazione.

Gli stessi studi sono stati effettuati anche in terbutanolo, determinando l'ordine di reazione e effettuando il confronto tra le reattività delle due specie. Il trattamento dei dati

in questo caso risulta più semplice dato che in questo solvente non si evidenzia una deacetilazione spontanea per nessuna delle due specie in esame. Il calcolo dell'ordine di reazione fornisce un valore di 0.83 per **AcP3A** e 0.96 per **AcP3A+**: analogamente a quanto accade in metanolo, il RDS della reazione è costituito dall'attacco dell'alcolato. La tabella 4.7 mostra il confronto tra le reattività delle due specie. Come atteso, la specie contenente il gruppo ammonio è più reattiva rispetto all'omologo contenente il fenile.

Tabella 4.7: Costante cinetica e ordine di reazione per la reazione di transesterificazione in tert-butanolo

	$k_{obs,2} (s^{-1}) \times 10^{-3}$	$k_2 (M^{-1} s^{-1}) \times 10^{-3}$	Ordine reazione
AcP3H	2.35	0.12	0.83
AcP3H+	22.7	8.66	0.96
k_{A+}/k_A		72.2	

[**AcP3A**] = 0.35 mM; [**KtBuO**] = 18.71 mM; [**AcP3A+**] = 0.1 mM;
 [**KOtBu**] = 2.62 mM. 25°C, 280 nm

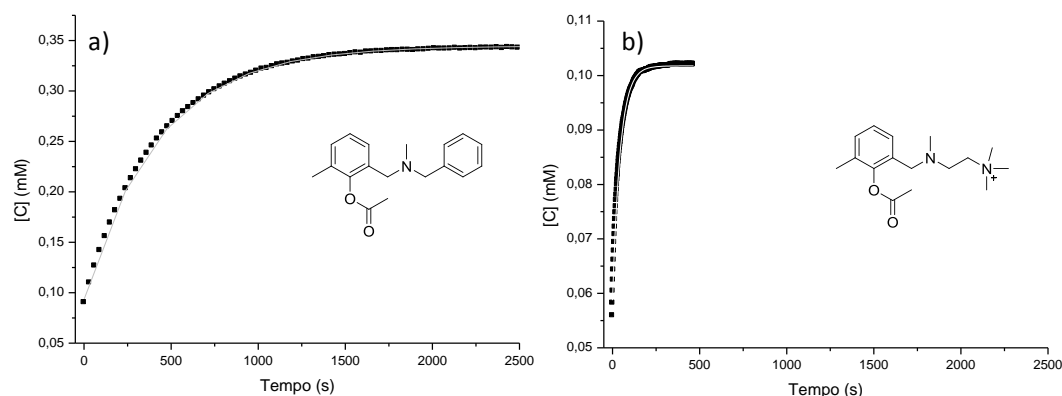


Figura 4.16 : Cinetiche di transesterificazione in tBuOH, 25°C. a) [**AcP3A**] 0.35 mM, [**KOtBu**] 18.7 mM; b) [**AcP3A+**] 0.1 mM, [**KOtBu**] 2.62 mM.

Anche in questo caso non è possibile effettuare un confronto con i dati di stabilità in quanto gli esperimenti sono stati eseguiti in regimi sperimentali molto diversi, risulta comunque evidente che l'effetto di introduzione dell'ammonio è molto maggiore di quello che si osserva per gli idrazoni, come previsto dai risultati di stabilità.

4.4 Conclusioni

Questo Capitolo ha proposto lo studio della formazione di interazioni non covalenti nello stato di transizione di una reazione e del loro effetto sulla velocità globale della reazione stessa. In particolare è stata scelta come modello la reazione di transesterificazione di

un estere fenilico, che presenta in posizione prossima alla funzione esterea un gruppo che può assistere la reazione. L'effetto catalitico si esprime a seguito di una stabilizzazione dello stato di transizione della reazione attraverso la formazione di un'interazione non covalente stabilizzante nello stato di transizione, con conseguente diminuzione dell'energia di attivazione ad esso correlata.

I Capitoli precedenti hanno presentato una metodologia per la quantificazione di questa stabilizzazione, attraverso l'utilizzo del gruppo fosfonato, scelto per mimare le caratteristiche dello stato di transizione della reazione. Lo scopo dello studio presentato nell'ultimo capitolo consiste nella razionalizzazione dei risultati ottenuti dalle cinetiche di transesterificazione, tentando di correlare quantitativamente la stabilizzazione introdotta nello stato di transizione con la reattività dei composti in esame.

Questi studi prevedono un confronto diretto tra le reattività di una coppia di molecole verso la reazione di transesterificazione: la prima contiene il gruppo ammonio, che si è dimostrato in grado di interagire con la parziale carica negativa formata durante lo stato di transizione, la seconda presenta il gruppo fenile ed è utilizzata come riferimento. Dato che i capitoli precedenti avevano evidenziato una differenza tra la stabilizzazione indotta da derivati idrazonici rispetto ai corrispettivi imminici, lo studio è stato svolto su due set di molecole che si differenziano per la natura dello *spacer*.

Lo studio ha riguardato in prima battuta la coppia di idrazoni **AcP2H** e **AcP2H+**: il confronto delle velocità relative alla reazione di transesterificazione in metanolo ha evidenziato una minore reattività del composto contenente il gruppo ammonio **AcP2H+** rispetto al corrispettivo contenente il fenile **AcP2H**. Questo *trend*, confermato anche per le coppie **AcP3H** / **AcP3H+** e **AcP4** / **AcP4H+** nello stesso regime sperimentale è totalmente in disaccordo rispetto a quanto atteso dagli esperimenti di stabilità. Alla luce di questo risultato è stato necessario eseguire un'analisi più attenta del sistema, riconsiderando il meccanismo della reazione.

La misura dell'ordine di reazione in metanolo ha evidenziato che per le specie **AcP2H+** e **AcP3H+** il RDS non è costituito dall'attacco nucleofilo dell'alcolato, bensì dall'uscita del fenato: questo giustifica la mancata correlazione tra i dati di stabilità e quelli di reattività, ricavati dal confronto tra due sistemi completamente diversi. Gli stessi esperimenti cinetici sono stati eseguiti in terbutanolo, utilizzando come nucleofilo potassio terbutossido. Lo studio dell'ordine di reazione conferma che per tutte le specie in esame il RDS è costituito dall'attacco dell'alcolato, come conseguenza del maggiore ingombro sterico del reagente nucleofilo.

In queste condizioni si evidenzia che il composto contenente il gruppo ammonio si dimostra sempre più reattivo rispetto all'omologo fenilico, confermando il *trend* atteso dagli esperimenti di stabilità. La connessione tra la reattività dell'estere e la stabilità del rispettivo TSA è evidenziata anche dal confronto tra coppie diverse. L'introduzione di un gruppo metile in posizione orto rispetto alla funzione esterea (coppia **AcP3H** / **AcP3H+**) causa un aumento ulteriore della reattività del derivato contenente l'ammonio, come conseguenza di un'orientazione favorevole dei gruppi interagenti; in aggiunta, la sostituzione dello *spacer* rigido dell'idrazone con uno più flessibile causa una differenza di reattività ancora più marcata, come evidenziato dagli esperimenti svolti sulle ammine **AcP3A** / **AcP3A+**. Questo andamento è perfettamente in linea con le stabilità relative evidenziate dagli esperimenti nei capitoli precedenti. Infine l'analisi cinetica della coppia **AcP3A** / **AcP3A+** in metanolo, dopo aver verificato che per entrambe le molecole il RDS è costituito dall'attacco nucleofilo, fornisce un ottimo accordo con i dati di stabilità anche a livello quantitativo.

Questi risultati dimostrano che l'approccio di *screening* basato sul *Dynamic Covalent Capture* presentato nei capitoli precedenti può essere applicato con successo allo studio delle interazioni non covalenti nello stato di transizione di una reazione modello. L'alta sensibilità che caratterizza questa metodologia determina che la scelta del corretto TSA da utilizzare nello screening costituisca un fattore essenziale, permettendo di ottenere un ottimo accordo tra i dati di stabilizzazione e quelli cinetici. Il *Dynamic Covalent Capture* fornisce quindi una metodologia unica e semplice per ottenere informazioni riguardo allo stato di transizione di una reazione, permettendo l'accesso a dati sperimentali che sarebbero difficilmente ottenibili con altre tecniche.

Recentemente nel gruppo di ricerca presso cui ho lavorato, è stato proposto l'utilizzo di

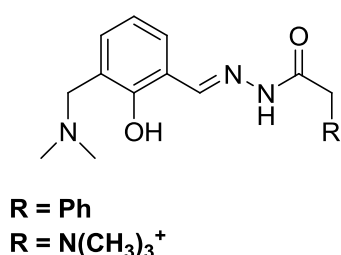


Figura 4.17: Struttura del catalizzatore utilizzato.

un sistema simile a quelli presentati in questa Tesi, che funge da catalizzatore per la reazione di transesterificazione.⁷ Il sistema, rappresentato in figura 4.17, presenta sull'anello sia il gruppo in grado di assistere la reazione intermolecolare, sia un'ammina terziaria, necessaria per il *turnover*.

Il catalizzatore è stato testato sulla reazione di transesterificazione del p-nitrofenilacetato in metanolo: in presenza di una base adatta, l'ossidrile deprotonato funge da nucleofilo nei confronti del p-nitrofenilacetato, trasferendo il gruppo acetato sul catalizzatore stesso,

modificandolo covalentemente. L'ammina terziaria in orto, come già descritto, determina la deacetilazione del catalizzatore, facilitando il trasferimento del gruppo acetile al solvente e rigenerando il catalizzatore (figura 4.18). Questa strategia ricorre spesso nella catalisi enzimatica, in cui si assiste alla trasformazione covalente del sito attivo, che viene successivamente ripristinato per rientrare nel ciclo catalitico.

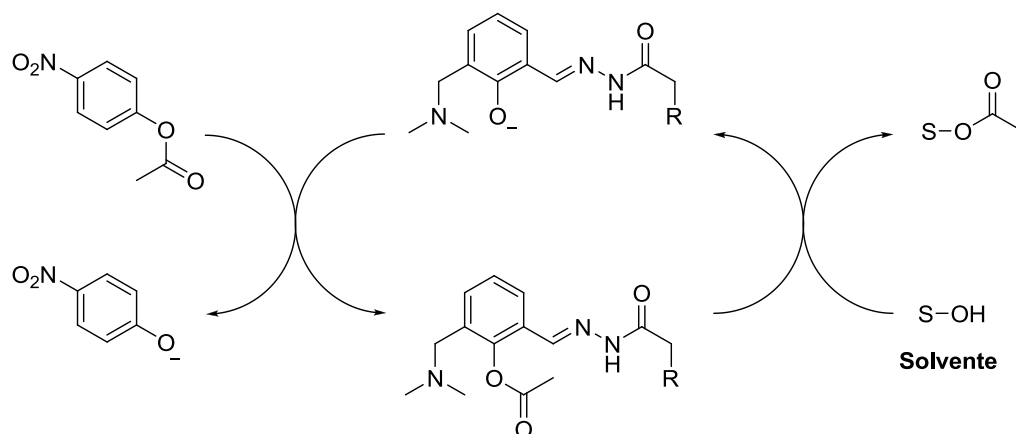


Figura 4.18: Meccanismo di azione proposto per il catalizzatore.

La modifica covalente del sito attivo è sfruttata anche nella catalisi enzimatica, a cui questo sistema è ispirato. un esempio è costituito dalla chimostripsina, in cui il sito attivo viene rigenerato dalla solvolisi dell'addotto covalente enzima-substrato ad opera di un residuo di serina (Figura 4.19).

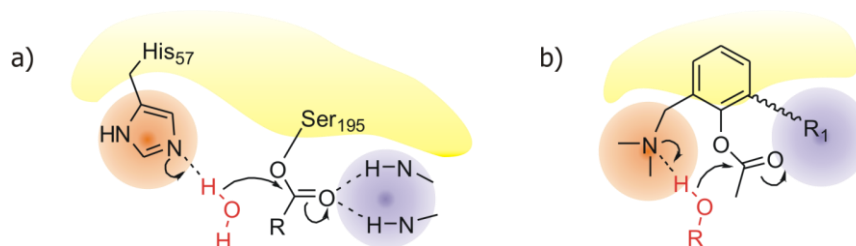


Figura 4.19: a) rigenerazione della serina proteasi a seguito di una solvolisi dell'addotto enzima-substrato. b) processo analogo nel catalizzatore sintetico.

Benchè le accelerazioni osservate con il catalizzatore proposto siano molto distanti da quelle osservate in sistemi enzimatici, i risultati mostrano una correlazione quantitativa tra l'accelerazione osservata e la stabilizzazione dello stato di transizione indotta dalla presenza del gruppo carico positivamente in catena laterale. Questo evidenzia le enormi potenzialità di questo approccio, che può essere accoppiato ad una metodologia combinatoria per il *self-selection* dell'unità catalitica.

4.5 Parte sperimentale

4.5.1 Strumenti e materiali

Per la descrizione dettagliata di tutta la strumentazione e dei materiali utilizzati si rimanda al Capitolo 2.

Studi UV-Vis

Gli esperimenti di deacetilazione sono stati effettuati su uno spettrometro UV-Vis Cary 50 equipaggiato con termostato. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

4.5.2 Sintesi e caratterizzazione

La strategia utilizzata nella sintesi dei derivati acetilati consiste nella preparazione del derivato fenolico (idrazone o ammina) e nella sua successiva acetilazione.

Sintesi generale degli idrazoni

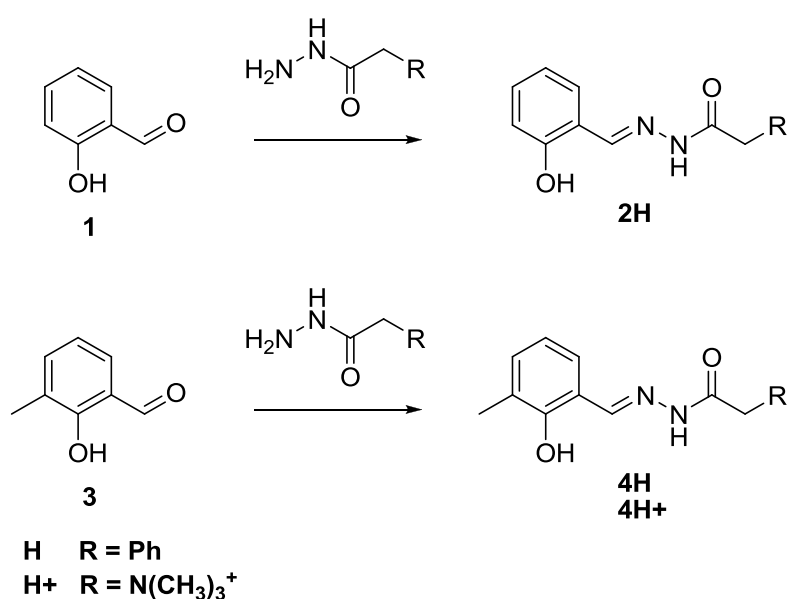
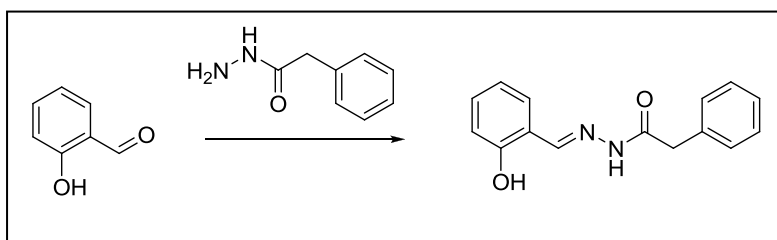


Figura 4.18: Schema generale per la sintesi degli idrazoni

Il corretto derivato della salicilaldeide (1 eq) viene sciolto in metanolo, quindi la corrispondente idrazide viene aggiunta alla soluzione in quantità equimolare. La miscela viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore, fino alla comparsa di un precipitato bianco. Il prodotto è recuperato per filtrazione e viene ottenuto in resa quantitativa.

Sintesi di 2H



Isomero maggioritario (62%)

¹H-NMR (250 MHz DMSO-d₆) δ (ppm) 3.56 (s, 2H), 6.84-7.34 (m, 8H), 7.51 (dd, 1H, J=1.6Hz, J=8.1Hz), 8.41 (s, 1H).

Isomero minoritario (38%)

¹H-NMR (250 MHz) δ (ppm) 3.95 (s, 2H) 6.84-7.34 (m, 8H), 7.70 (dd, 1H, J=1.5Hz, J=7.7Hz), 8.30 (s, 1H)

Isomero maggioritario (62%)

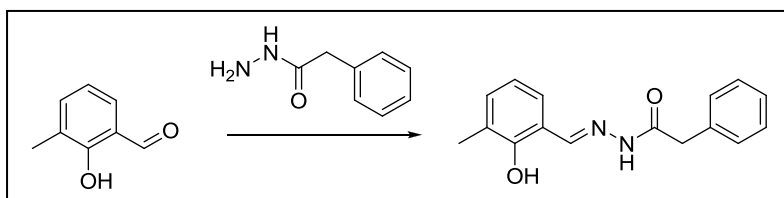
¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆) 116.25, 119.23, 120.10, 126.34, 126.59, 128.29, 129.03, 129.23, 131.23, 135.37, 146.86, 157.21, 166.29

Isomero minoritario (38%)

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆) 116.04, 118.54, 119.39, 126.30, 126.34, 128.16, 129.04, 129.27, 130.91, 135.57, 140.63, 156.27, 171.84.

ESI-MS (+, MeOH (HCOOH 0.1%)): *m/z* 255.2 [M+H]⁺, calcd: 255.3; 277.1 [M+Na]⁺, calcd: 255.3.

Sintesi di 4H



Isomero maggioritario (90%)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.23 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 6.82 (t, 1H, 7.5Hz), 7.12-7.38 (m, 7H), 8.27 (s, 1H).

Isomero minoritario (10%)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.25 (s, 1H), 3.99 (s, 2H), 6.83 (t, 1H, 7.5Hz), 7.12-7.38 (m, 7H), 8.10 (s, 1H).

Isomero maggioritario (90%)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 15.75, 42.32, 118.28, 120.15, 128.18, 129.59, 129.71, 130.00, 130.07, 130.17, 134.01, 152.13, 157.69, 169.71.

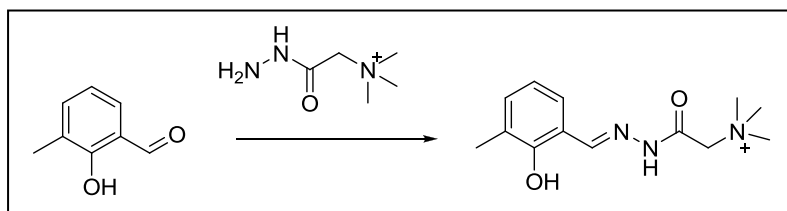
Isomero minoritario (10%)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 15.75, 40.52, 118.28, 120.54, 128.18, 129.59, 129.71, 130.00, 130.07, 130.28, 136.19, 149.48, 157.69, 169.71.

ESI-MS (+, ACN (HCOOH 0.1%)): *m/z* 269.1 [M+H]⁺, calcd: 269.2, 291.3 [M+Na]⁺, calcd: 291.2

UHPLC-MS (ACN (+ HCOOH 0.1%) from 10% to 90% in 5 min, 5.50 min), ESI (+) : *m/z* 269.3 [M+H]⁺. calcd: 269.2.

Sintesi di 4H+



Isomero maggioritario 65%

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.25 (s, 3H), 3.41 (s, 9H), 4.32 (s, 2H), 6.81-6.89 (m, 1H), 7.18-7.27 (m, 2H), 8.36 (s, 1H).

Isomero minoritario 35%

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.25 (s, 3H), 3.43 (s, 9H), 4.81 (s, 2H), 6.81-6.89 (m, 1H), 7.18-7.27 (m, 2H), 8.18 (s, 1H).

Isomero maggioritario (65%)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 15.72, 55.09, 64.78, 117.88, 120.31, 126.94, 130.35, 134.50, 153.90, 160.78, 165.32.

Isomero minoritario (35%)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 15.72, 54.84, 63.84, 118.56, 120.73, 126.77, 129.85, 134.40, 150.55, 157.73, 165.92.

ESI-MS (+, ACN/H₂O 20/80): *m/z* 250.0 [M]⁺, calcd: 250.3.

UHPLC-MS (ACN (+ HCOOH 0.1%) from 10% to 90% in 5 min, 3.1 min), ESI (+) : m/z 250.0 $[M]^+$. calcd: 250.3.

Sintesi delle ammine

Sono state utilizzate due strategie sintetiche diverse per la preparazione dei derivati amminici. La prima, utilizzata per la preparazione dell'ammina che presenta il gruppo ammonio in catena laterale, è rappresentata in figura 4.19. La sintesi dell'ammina non carica è avvenuta con una sintesi *one pot* che prevede l'amminazione riduttiva di 3-metil salicilaldeide con $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$.⁸

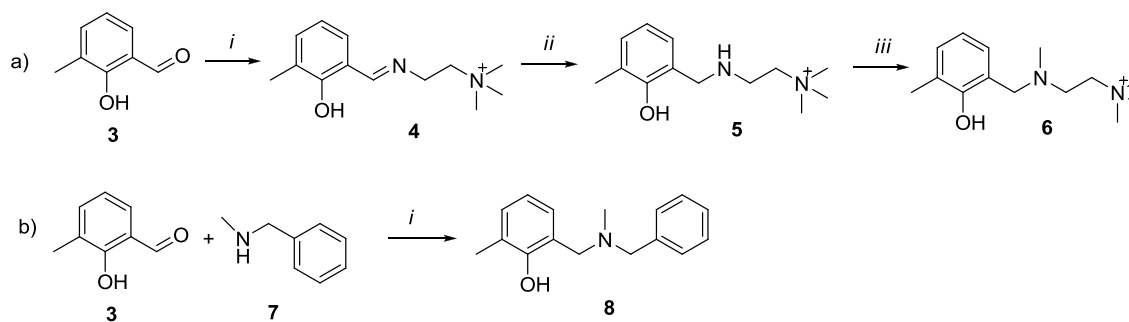
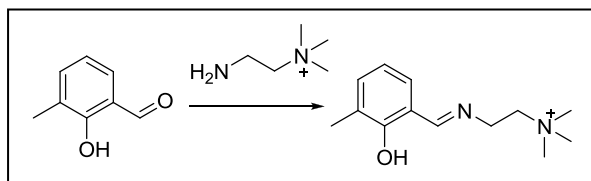


Figura 4.19: Schema generale di sintesi per le ammine **5** e **7**. a) i) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, MeOH; ii) H_2 , Pd/C, MeOH; iii) MeI, MeOH. b) i) $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$, DCE.

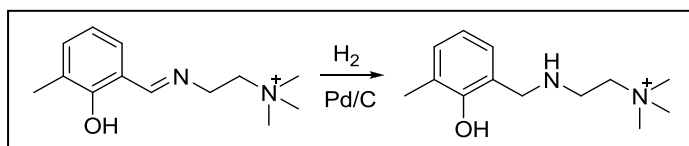
Sintesi di 4

(2-amminoetil) trimetilammonio cloruro idrocloruro (510.8 mg, 2.97 mmol) è sciolto in H₂O, quindi viene aggiunta una soluzione di NaOH (0.1 N, 29.2 mL, 1 eq) e la soluzione ottenuta viene liofizzata e ripresa in MeOH fino precipitazione di NaCl. La miscela è filtrata e il solvente viene rimosso su rotavapor e pompa meccanica, ottenendo l'ammina in forma libera come un sale fortemente igroscopico, che viene conservato in atmosfera inerte. Viene prelevato (2-amminoetil)trimetilammonio cloruro (80.4 mg, 0.58 mmol, 1 eq) e sciolto in MeOH (3 mL), 3 metil saliciladeide (79.5 mg, 0.58 mmol, 1 eq) è aggiunta mantenendo la soluzione sottoagitazione. La soluzione è mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore, quindi il solvente viene rimosso su rotavapor e pompa meccanica ottenendo un residuo giallo. Il prodotto puro è ottenuto per riprecipitazione da toluene (123.6 mg, 83% resa).

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 8.60 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.84 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.98-4.21 (m, 2H), 3.77 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 2.22 (s, 3H).

¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ 170.56, 159.91, 135.06, 131.02, 126.78, 119.82, 119.28, 67.50 (t, 3.3 Hz), 54.36 (t, 3.9 Hz), 53.84, 15.44.

ESI-MS (+, ACN (HCOOH 0.1%)): *m/z* 269.1 [M+H]⁺, calcd: 269.2, 291.3 [M+Na]⁺, calcd: 291.2

Sintesi di 5

Il prodotto **4** (503.8 mg, 1.98 mmol) è pesato in un pallone a 3 colli munito di ancorotta magnetica. Viene aggiunto metanolo (15 mL) via ago cannula fino a dissoluzione completa. Si aggiunge quindi Pd/C (2 punte di spatola) e H₂ viene fatto gorgogliare nella miscela così ottenuta mantenendo un'agitazione vigorosa. H₂ viene fatto gorgogliare per 7 ore, quindi la miscela è lasciata in pressione di H₂ per altre 12 ore, sempre

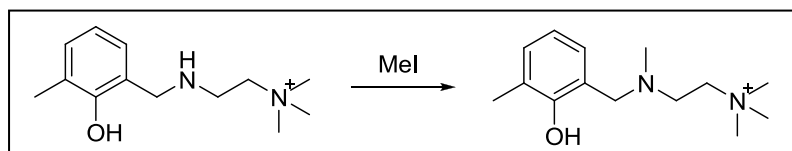
mantenendo l'agitazione. Al termine della reazione N_2 viene fatto gorgogliare nella soluzione per diversi minuti, quindi il tutto è filtrato su celite. Il solvente viene rimosso su rotavapor e pompa ottenendo il prodotto (**5**) come un olio incolore, senza dover ricorrere a purificazioni ulteriori.

1H NMR (250MHz, $CDCl_3$) δ 2.18 (s, 3H), 3.03-3.11 (m, 2H), 3.17 (s, 9H), 3.47-3.54 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 6.70 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.97 (dd, 2H, $J=7.5$ Hz, $J=15.8$ Hz).

^{13}C NMR (63 MHz, CD_3OD) δ 16.01, 43.01, 52.39, 54.23 (t, $J=4.0$ Hz), 66.21 (t, $J=3.0$ Hz), 120.33, 123.95, 125.95, 127.97, 129.38, 131.17.

UHPLC (ACN (+ HCOOH 0.1%) from 10% to 90% in 5 min, 1.08 min), ESI (+) : m/z 223.3 $[M]^+$. calcd: 223.3

Sintesi di 6

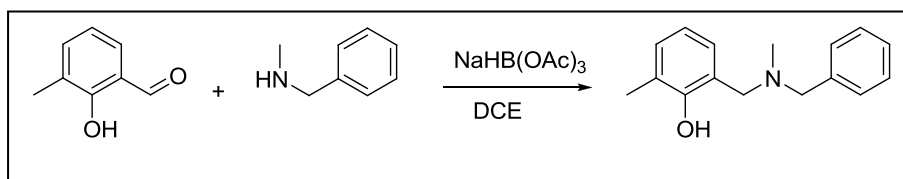


Il reagente **5** (151.1 mg, 0.584 mmol) viene sospeso in acetonitrile (3 mL) all'interno di una vial di Pyrex munita di ancoretta magnetica. Si aggiungono CH_3I (500 μ L, 8.03 mmol, 14 eq) e DIPEA (100 μ L, 0.585 mmol, 1 eq), quindi la vial è sigillata e la soluzione è mantenuta sotto agitazione per 12 ore a temperatura ambiente. Il solvente viene rimosso su rotavapor e il residuo ottenuto viene sottoposto a purificazione via HPLC preparativo (ACN/ H_2O + 0.1% TFA; 10-35% ACN in 12 min, 35-90% in 3 min; 280 nm; 10.3 min). Le frazioni corrispondenti al prodotto vengono raccolte e liofilizzate, ottenendo il prodotto desiderato **6** come olio incolore (41.4 mg, 20% resa).

1H NMR (250MHz, CD_3OD) δ 2.30 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 3.27 (s, 9H), 3.75-3.87 (m, 2H), 3.92-4.04 (m, 2H), 4.44 (s, 2H), 6.90 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.26 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) δ 16.61, 41.37, 49.73, 54.41, 57.57, 60.67, 117.82, 121.76, 126.80, 131.36, 134.70, 155.69.

UHPLC (ACN (+ HCOOH 0.1%) from 10% to 90% in 5 min, 1.55 min), ESI (+) : m/z 237.2 $[M]^+$. calcd: 237.4

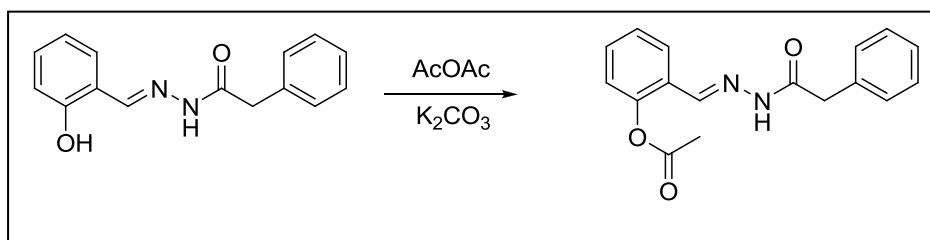
Sintesi di 7

In un pallone a 2 colli munito di ancoretta magnetica vengono aggiunti nell'ordine dicloroetano (10 mL), 3-metil salicilaldeide (180 μ L, 1.48 mmol, 1 eq), metil benzilammina (190 μ L, 1.48 mmol, 1 eq) e $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (500 mg, 2.36 mmol, 1.6 eq). La sospensione così ottenuta viene mantenuta sotto agitazione per 3 giorni mantenendo il tutto sotto atmosfera di azoto. Al termine della reazione, viene aggiunta una soluzione di NaHCO_3 satura (25 mL) e la soluzione viene estratta con diclorometano (4 x 20 mL). Le frazioni organiche vengono raccolte, anidificate su Na_2SO_4 e concentrate su rotavapor e pompa ottenendo il prodotto come olio incolore, senza ricorrere a ulteriori purificazioni. (317.3 mg, 88% resa).

$^1\text{H NMR}$ (250MHz, CDCl_3) δ 2.16 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 6.64 (t, 1H, $J=7.4\text{Hz}$), 6.78 (d, 1H, $J=6.8\text{Hz}$), 6.99 (d, 1H, $J=7.1\text{Hz}$), 7.19-7.37 (m, 5H).

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ 15.72, 41.11, 60.96, 61.48, 118.58, 121.09, 124.84, 126.12, 127.59, 128.55, 129.33, 129.89, 136.89, 155.90.

UHPLC (ACN (+ HCOOH 0.1%) from 10% to 90% in 5 min, 3.12 min), ESI (+): m/z 242.2
 $[\text{M}+\text{H}]^+$.calcd: 242.3

Sintesi di AcP2H

Il reagente P2H (164.2 mg, 0.646 mmol) è pesato in un pallone munito di ancoretta magnetica. Si aggiunge anidride acetica neat (4 mL), e K_2CO_3 (eccesso). La reazione viene mantenuta sotto agitazione per 12 ore. La miscela è ripresa in CH_2Cl_2 , il solido è eliminato per filtrazione e il solvente è rimosso su rotavapor. Il residuo è distillato a bassa pressione, ottenendo il prodotto come olio. Resa quantitativa.

Isomero maggioritario: 60%

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.37 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 7.12-7.42 (m, 8H), 8.01 (t, 1H, J=8.7Hz), 8.24 (s, 1H).

Isomero minoritario: 40%

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.33 (s, 3H), 4.07 (s, 2H), 7.12-7.42 (m, 8H), 8.02 (t, 1H, J=8.7Hz), 8.08 (s, 1H).

Isomero maggioritario: 60%

¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 20.88, 40.37, 124.22, 127.45, 127.64, 127.83, 128.16, 129.71, 130.1, 132.44, 136.24, 144.59, 151.08, 170.99, 175.76.

Isomero minoritario: 40%

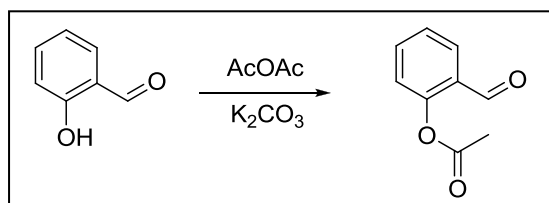
¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 21.96, 42.48, 124.26, 127.43, 127.44, 127.97, 128.84, 129.53, 130.52, 132.06, 136.63, 140.54, 151.04, 170.55, 171.17.

ESI-MS (+, ACN): *m/z* 279.3 [M+H]⁺, 319.2 [M+Na]⁺, 335.2 [M+K]⁺, calcd: 296.3.

Schema di sintesi di AcP2H+

Lo schema di sintesi prevede per questo composto l'acetilazione della salicilaldeide, la quale viene poi fatta reagire con l'idrazide per ottenere il prodotto.

Sintesi di 2-formil-fenilacetato



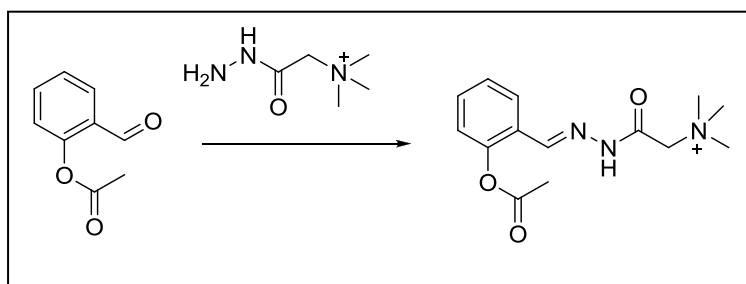
Salicilaldeide (1 mL, 9.38 mmol, 1 eq) è sciolta in acetonitrile (10 mL). Anidride acetica (1.8 mL, 19.1 mmol, 2 eq) e K₂CO₃ (largo eccesso) sono aggiunti. La sospensione è lasciata sotto agitazione per 12 ore. Viene aggiunta H₂O (20 mL), quindi la miscela è estratta con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Le frazioni organiche vengono anidrificate su Na₂SO₄, quindi il solvente è rimosso su rotavapor. Il prodotto è purificato per precipitazione da etere etilico. 830.8 mg, 54% resa.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.02 (s, 3H), 6.82 (d, 1H, J=8.2Hz), 7.03 (t, 1H, J=7.5Hz), 7.27 (t, 1H, J=7.7Hz), 7.51 (d, 1H, J=7.6Hz), 9.74 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 20.68, 123.34, 126.30, 127.85, 131.15, 135.20, 151.31, 169.15, 188.70.

ESI-MS (+, $\text{ACN}(+0,1\% \text{HCOOH})$): m/z 165.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd: 164.1, 187.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd: 187.1.

Sintesi di AcP2H+



2-formil-fenilacetato (50.3 mg, 0.306 mmol, 1 eq) è sciolto in metanolo. Viene quindi aggiunto Girard T (51.6 mg, 0.308 mmol, 1 eq) e la miscela è riscaldata a 65°C , mantenendo l'agitazione per 12 ore. il solvente è rimosso su rotavapor ottenendo il prodotto che viene purificato tramite ricristallizzazione da etere etilico. Resa quantitativa.

Isomero maggioritario 80%

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.35 (s, 3H), 3.41 (s, 9H), 4.79 (s, 2H), 7.15-7.52 (m, 3H), 8.03 (dd, 1H, $J=1.7\text{Hz}$, $J=7.9\text{Hz}$), 8.10 (s, 1H)

Isomero minoritario 20%

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.39 (s, 3H), 3.40 (s, 9H), 4.62 (s, 2H), 7.41 (m, 3H), 7.98 (dd, 1H, $J=1.0\text{Hz}$, $J=7.8\text{Hz}$), 8.27 (s, 1H).

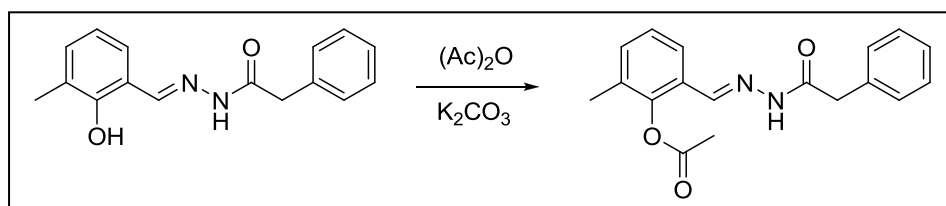
Isomero maggioritario 80%

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 20.83, 54.80, 64.17, 124,24, 127.36, 127.51, 127.55, 132.65, 142.06, 151.28, 166.43, 171.06.

Isomero minoritario 20%

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 21.09, 44.03, 64.87, 124,48, 127.16, 127.48, 129.25, 133.01, 147.01, 151.20, 161.63, 171.38.

ESI-MS (+, MeOH): m/z 278.2 $[\text{M}]^+$, calcd: 278.3.

Sintesi di AcP3H

Il reagente (145.7 mg, 0.54 mmol) viene sciolto in una miscela di acetonitrile: dimetilsolfossido 5:1 (10 mL), quindi K_2CO_3 viene aggiunto in largo eccesso. Alla sospensione si aggiunge anidride acetica (1.0 mL, 1.08 g, 10.6 mmol, 19.6 eq) e la miscela è mantenuta sotto agitazione per 2 giorni, seguendo la reazione via TLC (etere di petrolio : etile acetato 9:1, R_f 0.33). Al termine della reazione si aggiunge etere etilico, e il precipitato ottenuto è recuperato tramite filtrazione e purificato con cromatografia flash (SiO_2 , etere di petrolio : etile acetato 6 :4). (95.3 mg, 57% resa).

Isomero maggioritario (85%)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 10.27 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.47 – 7.08 (m, 7H), 4.08 (s, 2H), 2.27 (s,3H), 2.18 (s,3H).

Isomero minoritario (15%)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 8.58 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.47 – 7.08 (m, 7H), 3.66 (s, 2H), 2.44 (s,3H), 2.07 (s,3H).

Isomero maggioritario (85%)

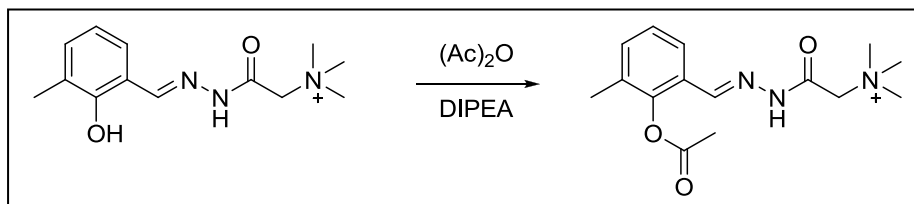
^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 174.42, 169.15, 148.44, 144.13, 139.67, 134.94, 132.79, 131.32, 129.70, 128.62, 126.95, 126.40, 124.48, 39.48, 20.44, 16.30.

Isomero minoritario (15%)

^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 189.39, 167.10, 147.97, 144.13, 137.14, 139.99, 133.08, 131.56, 129.56, 129.22, 127.69, 126.20, 125.87, 29.83, 20.80, 16.30

ESI-MS (+), $CH_3CN + HCOOH$ 0.1%: 311.1 $[M+H]^+$ m/z (calcd. = 311.1); 333.1 $[M+Na]^+$ m/z (calcd. = 333.1); 643.2 $[2M+Na]^+$ m/z (calcd. = 643.2)

UPLC Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1x100mm 1.8u), flow 0.2ml/min, 0-5min 10-90% ACN+0.1%HCOOH: 5.40 min

Sintesi di AcP3H+

Il reagente (67.3 mg, 0.23 mmol) è sospeso in acetonitrile (3 mL) in una vial di Pyrex munita di ancoretta magnetica. Successivamente si aggiungono anidride acetica (160 μ L, 1.57 mmol, 6.8 eq) e DIPEA (1 goccia). La soluzione è mantenuta sotto agitazione per 12 ore, ottenendo la precipitazione del prodotto come solido bianco che viene recuperato per filtrazione e lavato con acetonitrile, senza ulteriori purificazioni (46.3 mg, 61% resa).

Isomero maggioritario (90%)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.18 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 3.41 (s, 9H), 4.79 (s, 2H), 7.20-7.40 (m, 2H), 7.86 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 8.06 (s, 1H).

Isomero minoritario (10%)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.19 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 3.40 (s, 9H), 4.26 (s, 2H), 7.20-7.40 (m, 2H), 7.78 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 8.25 (s, 1H).

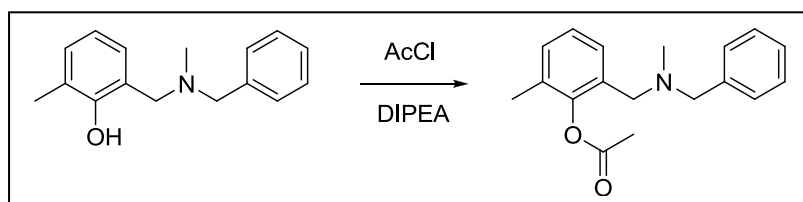
Isomero maggioritario (90%)

$^{13}\text{C-NMR}$ (250MHz, CD_3OD) 15.77, 24.26, 55.05, 64.65, 117.93, 118.65, 120.36, 127.05, 130.38, 134.57, 153.83, 157.86, 160.85.

Isomero minoritario (10%)

$^{13}\text{C-NMR}$ (250MHz, CD_3OD) 15.82, 30.74, 54.77, 63.86, 117.93, 118.65, 120.81, 126.86, 129.82, 134.47, 150.47, 156.90, 165.42.

UHPLC (ACN (+ HCOOH 0.1%)from 10% to 90% in 5 min, 3.0 min), ESI (+) : m/z 292.2 $[\text{M}]^+$.calcd: 292.3.

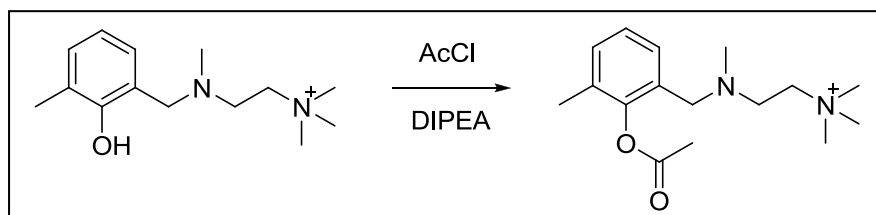
Sintesi di AcP3A

Il reagente **7** (159.6 mg, 0.661 mmol, 1 eq) è posto in un pallone munito di ancoretta magnetica e tubo a CaCl₂, quindi viene sciolto in acetonitrile (8 mL). Alla soluzione viene aggiunta DIPEA (225 uL, 1.32 mmol, 2 eq) e il tutto è raffreddato a 0°. Acetil cloruro (95 uL, 1.33 mmol, 2 eq) viene aggiunto attentamente, quindi la miscela è riportata a temperatura ambiente e mantenuta sotto agitazione 12 ore. Viene aggiunta H₂O (25 mL), quindi si estrae con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Raccolte le frazioni organiche, vengono anidificate su Na₂SO₄ e il solvente è rimosso su rotavapor ottenendo un olio giallo che viene purificato tramite cromatografia flash (SiO₂, etere di petrolio : etile acetato 9 : 1). Il prodotto **AcP3A** è ottenuto come olio incolore (105.3 mg, 56% resa).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 2.26 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 7.36 (m, 8H).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 16.31, 20.52, 42.25, 56.76, 62.25, 125.80, 126.97, 128.20, 128.51, 129.07, 129.86, 130.55, 130.99, 138.93, 148.33, 168.86.

UHPLC (ACN (+ HCOOH 0.1%) from 10% to 90% in 5 min, 3.29 min), ESI (+) : *m/z* 284.2 [M+H]⁺. calcd: 284.4

Sintesi di AcP3A+

Il reagente **5** (41.4 mg, 0.152 mmol, 1 eq) è posto in un pallone munito di ancoretta magnetica e tubo a CaCl₂, quindi viene sciolto in acetonitrile (4 mL). Alla soluzione vengono aggiunti nell'ordine DIPEA (52 uL, 0.304 mmol, 2 eq) e acetil cloruro (22 uL, 0.309 mmol, 2 eq), quindi la miscela è mantenuta sotto agitazione 12 ore. Il solvente viene rimosso su rotavapor, ottenendo un residuo che viene purificato con HPLC preparativo (Jupiter Proteo, 17 mL/min, ACN + TFA 0.1% da 10% a 90% in 15 min, 270

nm, 7.7 min). Le frazioni corrispondenti al prodotto vengono raccolte e liofilizzate, ottenendo il prodotto come olio incolore (27.7 mg, 56% resa).

¹H NMR (250MHz, CD₃CN) δ 2.16 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 3.08 (s, 9H), 3.44-3.51 (m, 2H), 3.77-3.84 (m, 2H), 4.13 (s, 2H), 7.26 (t, 1H, J=7.6Hz), 7.44 (m, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃CN) δ 15.31, 19.65, 39.22, 48.02, 53.34, 54.29, 59.47, 122.53, 126.29, 129.71, 131.70, 132.68, 148.73, 168.85.

ESI-MS (+, ACN):*m/z* 279.2 [M]⁺, calcd: 279.4

HPLC (ACN (+ TFA 0.1%))from 10% to 90% in 15 min, 10.34 min).

4.5.3 Procedura generale per gli esperimenti di transesterificazione degli idrazoni

La soluzione madre dell'idrazone in esame viene preparata in metanolo o terbutanolo (10:20 mM). Per la preparazione della soluzione di NaOMe, un matraccio da 1 mL portato a volume con metanolo viene tarato, quindi Na in toluene, precedentemente lavato in pochi mL di metanolo, viene aggiunto. Dopo completa dissoluzione di Na, il matraccio è lasciato raffreddare e portato nuovamente a volume. La quantità di Na aggiunta, e quindi il titolo della soluzione preparata, è ottenuto per differenza tra le pesate prima e dopo l'aggiunta. La soluzione madre di terbutossido viene preparata sciogliendo KOtBu, disponibile commercialmente, in terbutanolo. Prima di ogni esperimento viene registrato lo spettro UV-Vis (500 – 200 nm) relativo alla specie acetilata e al rispettivo fenato, sintetizzato separatamente. La lunghezza d'onda è scelta sulla base della massima differenza in assorbanza tra le due specie. L'esperimento fornisce anche il valore di concentrazione di substrato ottimale a cui svolgere la misura. Per gli esperimenti cinetici, in una cuvetta di quarzo con cammino ottico 1 cm e volume ridotto (1 mL) vengono aggiunti nell'ordine la specie in esame, il solvente e la soluzione di alcolato. La cinetica viene misurata termostatando e cuvette a 25°C.

4.5.4 Procedura generale per gli esperimenti di transesterificazione delle ammine

Le soluzioni madre delle ammine in esame vengono preparate in acetonitrile per evitare la deacetilazione spontanea. La lunghezza d'onda ottimale viene scelta come per gli idraazoni, le soluzioni madre di NaOMe o KOtBu vengono preparate come per gli idrazoni. Le prove cinetiche in KOtBu vengono effettuate come per gli idrazoni. La

velocità di deacetilazione spontanea in MeOH viene valutata in una cuvetta in quarzo con cammino ottico 1 cm e volume ridotto (1 mL) aggiungendo nell'ordine il metanolo e la specie desiderata. La cinetica viene misurata termostatando e cuvette a 25°C. Successivamente, viene misurata la cinetica di transesterificazione in presenza di NaOMe, aggiungendo nella cuvetta nell'ordine il metanolo, la soluzione di NaOMe e la specie desiderata.

4.5.5 Procedura generale per il calcolo dell'ordine di reazione

Le soluzioni madre di idrazoni in esame vengono preparate in metanolo o terbutanolo. Le soluzioni madre di NaOMe o KOtBu vengono preparate come descritto precedentemente. Vengono registrate le cinetiche di ogni composto in metanolo e terbutanolo in presenza di un eccesso esattamente determinato di alcolato, che varia in un range da 10 equivalenti a 100 equivalenti. La procedura è analoga a quella precedentemente descritta. Le velocità iniziali vengono determinate dal plot della concentrazione di prodotto formato rispetto al tempo, eseguendo il *fitting* sulla porzione che risulta lineare, verificando che l' R^2 relativo al *fitting* sia > 0.98 . Una volta determinate le velocità iniziali, si esegue un plot del logaritmo della velocità iniziale rispetto al logaritmo della concentrazione di alcolato aggiunta: l'ordine di reazione viene determinato dalla pendenza della retta ottenuta.

Nel caso delle ammine si procede allo stesso modo, tuttavia occorre tenere conto nel caso di **AcP3A** della deacetilazione spontanea che avviene in metanolo. Dopo aver determinato la velocità iniziale del processo di deacetilazione spontanea in metanolo, nel plot per la determinazione dell'ordine di reazione si riporta in ascissa il logaritmo di [NaOMe] e in ordinata il logaritmo della differenza tra la velocità iniziale totale e la velocità iniziale del processo di deacetilazione.

4.6 Bibliografia

1. Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
2. Reetz, M. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 284-310.
3. Gennari, C.; Piarulli, U., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3071-3100.
4. Gasparini, G.; Prins, L. J.; Scrimin, P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2475-2479.
5. Wayman, K. A.; Sammakia, T., *Org. Lett.* **2003**, 5, 4015-4108.
6. Wessjohann, L. A.; Zhu, M. Z., *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 107-112.
7. Gasparini, G.; Dal Molin, M.; Prins, L. J., *Submitted* **2012**.
8. Prins, L. J.; Blazquez, M. M.; Kolarovic, A.; Licini, G., *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2735-2738.

- (1) Gasparini, G.; Dal Molin, M.; Prins, L. J., *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 2429-2440.
- (2) Gasparini, G.; Dal Molin, M.; Lovato, A.; Prins, L. J.; "Dynamic Covalent Chemistry" in "Supramolecular Chemistry: from Molecules to Nanomaterials" (Wiley), **2011**, in press.
- (3) Dal Molin, M., Gasparini G., Scrimin, P., Rastrelli, F., Prins, L. J., *Chem Commun.* **2011**, 47, 12476-12478.
- (4) Gasparini, G.; Dal Molin, M.; Prins, L. J., "Self-selection of an organic transesterification catalyst using a Dynamic Covalent Capture strategy", **2012**, submitted.