

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Cellulari e Molecolari XIX ciclo
CHIM/06

**NUOVI MATERIALI DA NUCLEOSIDI
MODIFICATI**

Dissertazione presentata da
Stefano Lena

Tutore

Prof. Giovanni Gottarelli

Coordinatore

Prof. Lanfranco Masotti

INDICE

CAPITOLO 1 – LE NANOTECNOLOGIE	1
1.1 Introduzione	1
1.2 Possibili applicazioni	2
CAPITOLO 2 – ELETTRONICA MOLECOLARE	5
2.1 Introduzione	5
2.2 Proprietà elettroniche del DNA	6
2.3 Potenziali nano-applicazioni	8
CAPITOLO 3 – I G-QUARTETTI	11
3.1 Introduzione	11
3.2 La struttura delle molecole di DNA in quadrupla elica	12
3.3 Possibili ruoli biologici dei G-quartetti nel DNA	13
3.4 G-quartetti come possibile target di antitumorali	14
CAPITOLO 4 – ARCHITETTURE SUPRAMOLECOLARI GENERATE DA DERIVATI DI GUANOSINA	17
4.1 Autoassemblaggio in fase acquosa	17
4.2 Autoassemblaggio di derivati lipofili della guanosina in presenza di cationi	22
4.3 Autoassemblaggio di derivati lipofili di guanosina in assenza di Cationi	30
4.4 Dispositivi elettronici ibridi basati su derivati di desossiguanosina	35

CAPITOLO 5 – AUTOASSEMBLAGGIO DI DERIVATI LIPOFILI DI 8-OXOGUANOSINA E 8-OXOINOSINA	41
5.1 Introduzione	41
5.2 Derivati lipofili di 8-oxoguanosina	41
5.2.1 <i>Fasi liquido-cristalline</i>	42
5.2.2 <i>Autoassemblaggio in soluzione</i>	45
5.2.3 <i>Autoassemblaggio su superficie</i>	49
5.2.4 <i>Lo studio delle proprietà elettroniche</i>	50
5.3 I derivati della 8-oxoinosina	52
5.3.1 <i>Sintesi e autoassemblaggio dei derivati della 8-oxoinosina</i>	53
5.4 Conclusioni	63
CAPITOLO 6 – AUTOASSEMBLAGGIO DI UN DERIVATO 5'-O-ALCHILATO DI GUANOSINA	64
6.1 Introduzione	64
6.2 Autoassemblaggio in soluzione	66
6.3 Fasi liquido-cristalline	69
6.4 Autoassemblaggio all'interfaccia solido-liquido	71
CAPITOLO 7 – FUNZIONALIZZAZIONE DI GUANOSINE LIPOFILE CON OLIGOMERI TIOFENICI	74
7.1 Introduzione	74
7.2 Autoassemblaggio in soluzione	76
7.3 Fasi liquido-cristalline	82
7.4 Autoassemblaggio su superficie	82
7.4.1 <i>Studi AFM</i>	83
7.4.2 <i>Studi STM</i>	84
7.4.3 <i>Modello molecolare</i>	85
7.5 Conclusioni	86
CAPITOLO 8 – PARTE SPERIMENTALE	88

CAPITOLO 1 - LE NANOTECNOLOGIE

1.1 Introduzione

La natura ci insegna come, a partire da comuni elementi chimici, si possono costruire oggetti di una complessità stupefacente. Gli stessi atomi di carbonio che troviamo nella grafite o nel carbone, semplicemente ordinati secondo uno schema diverso, compongono un materiale sorprendente e affascinante come il diamante^{1,2}. Grazie ad una accurata disposizione di un numero limitato di elementi la natura è in grado di creare macchine capaci di funzioni avanzatissime. Ecco dunque spiegata la nuova tendenza che si sta rapidamente diffondendo nella comunità scientifica e nell'industria tecnologicamente più avanzata: tentare di imitare il modo in cui la natura costruisce i suoi prodotti, cioè "partendo dal basso". Il denominatore comune di quelle che vengono chiamate nanotecnologie è la manipolazione di singoli atomi e singole molecole o comunque la realizzazione di strutture che hanno dimensioni dell'ordine dei nanometri. I singoli componenti dei microprocessori che troviamo nei computer dell'ultima generazione hanno dimensioni di circa 200 nanometri e nonostante il rapido progresso delle tecniche tradizionali, queste si scontreranno presto con limiti fisici insuperabili. Ecco allora che la "costruzione dall'alto", cioè la lavorazione di quantità macroscopiche di materia per ottenere strutture microscopiche, lascia il posto alla "costruzione dal basso". Non si tratterà più, ad esempio, di incidere circuiti microscopici su un wafer di silicio, ma di costruire circuiti ancora più piccoli collegando opportunamente singole molecole, che funzionano come veri e propri componenti elettronici. All'interno delle nanotecnologie trovano collocazione innumerevoli campi di studio ed altrettanto svariati campi di applicazione. Si possono individuare grosso modo tre filoni principali: la nanotecnologia molecolare, il cui obiettivo è quello di costruire dispositivi o vere e proprie macchine di dimensioni molecolari mediante l'impiego di assemblatori

molecolari, strumenti in grado di costruire qualsiasi nano-dispositivo desiderato a partire dagli atomi costituenti posizionandoli esattamente dove si desidera all'interno della struttura da realizzare. Le nanostrutture, settore nel quale si studia la realizzazione, con normali metodi chimici, di strutture a scala molecolare o dell'ordine dei nanometri. Il campo di applicazione più avanzato è quello dei dispositivi elettronici molecolari come i fotoconduttori, transistor e LED organici. Dispositivi di questo tipo hanno reso possibile, ad esempio, la produzione di display luminosi che si presentano sotto forma di fogli di materiale plastico. Infine il settore dei materiali nanostrutturati, le cui proprietà innovative sono determinate da elementi costitutivi (particelle, aggregati o cavità) che presentano almeno una dimensione inferiore a 100 nm.

Una valutazione concreta delle aspettative che le nanotecnologie suscitano nel mondo produttivo viene dalla cospicuità dei fondi impegnati nella ricerca in questo campo, sia in ambito privato che pubblico, in tutti i maggiori paesi industrializzati.

1.2 Possibili applicazioni

Nel campo della nanotecnologia le dimensioni in gioco sono talmente ridotte da rendere possibile in futuro l'immissione nel corpo umano di nanomacchine che incorporano sensori ed attuatori e che hanno la possibilità di penetrare nelle cellule del sangue e dei tessuti guidati dall'esterno. I lab-on-a-chip (figura 1.1), realizzati per lo più basandosi sulle tecnologie acquisite dall'industria dei semiconduttori, sono dispositivi che stanno rivoluzionando la diagnostica e la ricerca farmaceutica³. Canali micrometrici vengono fabbricati in substrati di vetro, silicio o polimero per indirizzare picolitri del fluido in esame verso siti di rilevazione con diametro dai 10 ai 200 micron; queste nuove tecniche analitiche sono oggi essenziali in applicazioni che dispongono di quantità limitatissime di campione, come la proteomica e le bioanalisi.

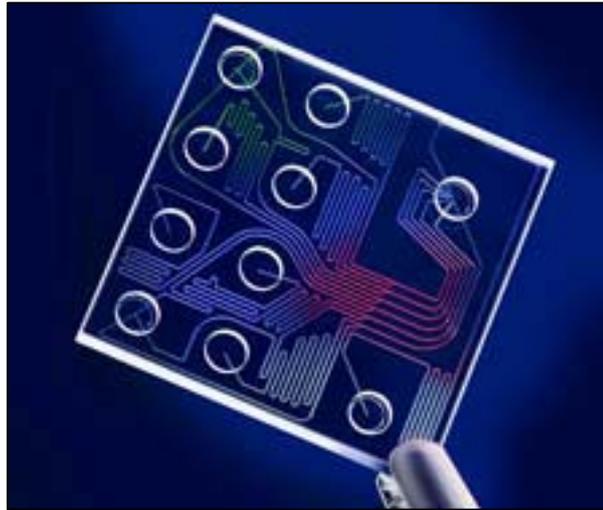


Figura 1.1

La vera rivoluzione, che ha attratto gli investimenti di giganti farmaceutici, è data dalla possibilità di produrre chip per analisi genetiche. Questi nanodispositivi sfruttano il semplice principio che le molecole organiche, come le sequenze dei geni del DNA, presentano leggerissime cariche elettriche. Incidendo sulla superficie in silicio dei microelettrodi si possono intrappolare queste molecole sulla superficie del chip. Le molecole intrappolate funzionano da bersaglio per quelle contenute nel campione da analizzare, e dal modo in cui queste ultime si attaccano o sfuggono ai bersagli è possibile determinarne la natura. Le nanotecnologie possono dare un contributo per lo sviluppo di strumenti medicali innovativi, quali le biocapsule per la produzione di insulina in pazienti affetti da diabete. Sono state realizzate delle microcapsule in silicio lunghe 2 millimetri e aventi milioni di nanocanali larghi 18 nm, abbastanza piccoli per evitare l'ingresso degli anticorpi responsabili del rigetto ma abbastanza grandi da permettere lo scambio di glucosio e insulina. Questa biocapsula può quindi essere impiantata sottocute evitando così il trapianto di pancreas. Un'applicazione ulteriore delle biocapsule può essere individuata nel campo del rilascio controllato dei farmaci. Nel campo della terapia genica sono in fase di studio delle

nanoparticelle costituite da un polimero carico positivamente in grado di legare del DNA carico negativamente a formare un sistema a forma di anello (toroide) che evita la degradazione del DNA e che ne facilita l'inserimento nella cellula anche in-vivo oltre che in-vitro rappresentando quindi un efficace vettore non virale utilizzabile nel trattamento di malattie genetiche.

Sempre grazie alle nanotecnologie vengono oggi realizzate strutture biocompatibili utilizzabili nel campo dell'ingegneria tissutale, come le nano e microstrutture di supporto in silicio per la ricrescita neuronale, costituite da intelaiature polimeriche bioerodibili a due e tre dimensioni che fungono da substrato per una adesione cellulare spazialmente predefinita.

Anche in campo cosmetico la nanotecnologia ha portato dei sensibili miglioramenti. I pigmenti della BASF a base di nanopolveri hanno dimostrato un'alta capacità di assorbimento dei raggi ultravioletti, che li rende vantaggiosi nelle creme protettive solari. Contro i raggi UV-B ottimo è il biossido di titanio, anche se ultimamente sembra che queste nanoparticelle facilitino la formazione di radicali liberi, inoltre studi recenti hanno rivelato come anche la radiazione UV-A danneggi la pelle, portando a sperimentare con successo l'aggiunta di nanoparticelle di ossido di zinco. Le loro dimensioni bastano a proteggere da un ampio spettro di raggi UV, senza ridurre la trasparenza della crema; al contrario particelle già di 200 nm renderebbero la crema opaca sulla pelle con effetto antiestetico.

CAPITOLO 2 – ELETTRONICA MOLECOLARE

2.1 Introduzione

L'attenzione rivolta all'elettronica molecolare, cioè all'uso di molecole come componenti elettronici, è molto cresciuta negli ultimi anni. Dato che sono note infatti singole molecole dell'ordine di 3 nm capaci di realizzare le funzioni tipiche dell'elettronica (rettificazione, memoria ecc.), è ipotizzabile il loro utilizzo come dispositivi dal cui assemblaggio nascerà il circuito integrato. Tra le varie molecole disponibili capaci di manipolare dati, un ruolo particolare è rivestito dalle molecole coniugate. Le molecole di questa classe, che comprende polimeri, fullereni e nanotubi (figura 2.1), hanno la caratteristica essenziale di essere drogabili in maniera simile a quello che avviene col silicio, così da rendere possibile la traduzione dell'elettronica a base di silicio al mondo del carbonio.

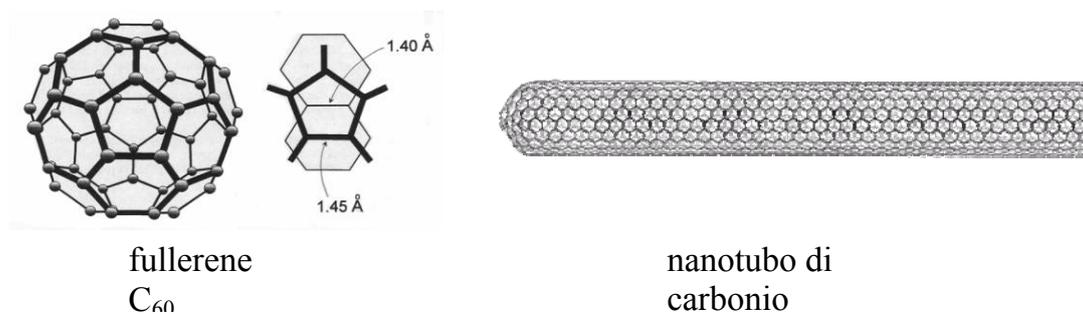


Figura 2.1

Il loro utilizzo pratico per la realizzazione di funzioni logiche complesse è però subordinato alla soluzione di alcuni problemi fondamentali. In primo luogo, è necessario lo sviluppo di una tecnologia “dal basso verso l’alto” (*bottom-up*) e cioè capace di disporre le molecole-dispositivo in maniera ordinata ed accessibile con tecniche autoassemblanti. Inoltre tale assemblaggio

non può essere condizionato dalle caratteristiche intrinseche delle molecole, ma deve corrispondere ad un ordine arbitrario imposto dall'esterno. Il problema è quindi di tradurre il progetto del circuito integrato in una disposizione corrispondente delle strutture molecolari, senza far uso delle costose tecniche litografiche, che costituiscono uno dei limiti delle tecniche convenzionali per la costruzione dei chip di ultima generazione. L'utilizzo più logico delle molecole-dispositivo è attraverso il loro autoassemblaggio su circuiti microelettronici. In questo modo si affiancherebbero le funzioni di manipolazione dei dati, realizzate con molecole-dispositivo, alle funzioni di amplificazione, indirizzamento e alimentazione, realizzate con dispositivi microelettronici. Questa architettura ibrida micro-nanoelettronica dovrebbe coniugare le tecnologie di miniaturizzazione (top-down) proprie della microelettronica a quelle autoassemblaggio (bottom-up) proprie della nascente nanoelettronica.

2.2 Proprietà elettroniche del DNA

Il DNA gioca un ruolo fondamentale in biologia come portatore delle informazioni genetiche in tutte le specie viventi. Recentemente, tuttavia, fisici e chimici hanno incominciato ad interessarsi sempre più alle proprietà elettroniche delle biomolecole⁴. La struttura a doppia elica scoperta da Watson e Crick è costituita da due filamenti che si appaiano tra loro. Ogni filamento possiede uno scheletro formato da ripetizioni di molecole di zucchero e gruppi fosfato. Ogni unità zuccherina è legata covalentemente ad una delle quattro basi azotate. Le quattro basi adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) costituiscono l'alfabeto genetico del DNA e il loro ordine o sequenza all'interno di questo determina il codice genetico. Nella doppia elica di DNA i legami a idrogeno che si instaurano tra le basi permettono ai due filamenti complementari di restare uniti. Dato che i gruppi fosfato presenti nello scheletro sono carichi negativamente, il DNA è

solitamente circondato da controioni positivi. Pertanto la struttura del DNA risulta essere ideale per il trasferimento elettronico. La disposizione degli orbitali- π dovrebbe essere la via per le reazioni di trasferimento di carica. Sono stati effettuati alcuni esperimenti per studiare la capacità di trasferimento di carica su molecole di DNA alle cui estremità sono stati legati gruppi accettori e donatori e il sistema così formato inserito tra due elettrodi metallici (figura 2.2).

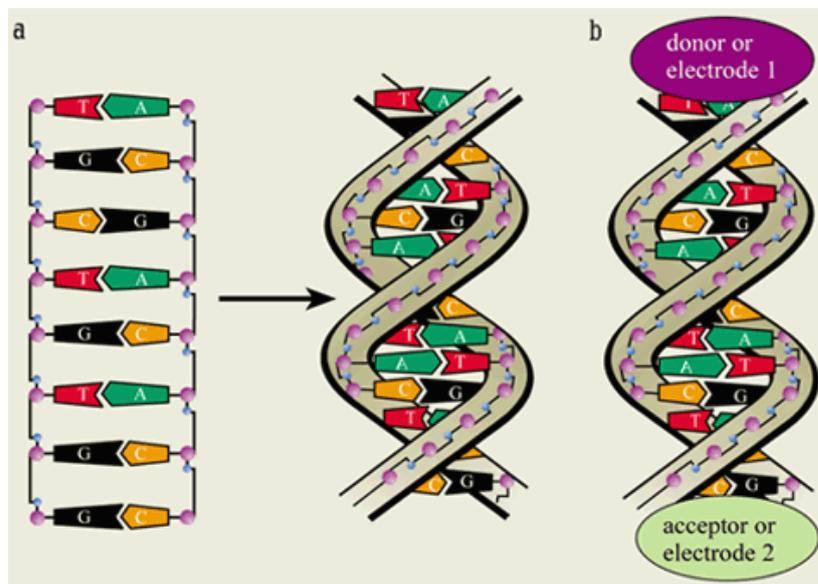


Figura 2.2

Il trasferimento di carica si pensa avvenga attraverso due meccanismi possibili. Il primo consiste in un processo, denominato “electron-tunneling”, di trasferimento di elettrone da donatore ad accettore in cui l’elettrone si muove attraverso la doppia elica del DNA, che funge da orbitale molecolare continuo (filo molecolare) in cui ogni coppia di basi è in contatto elettronico con le altre attraverso il π -stacking degli orbitali. In questo processo la carica si può muovere lungo il DNA indipendentemente dalla sequenza delle basi e dalla distanza. Il secondo meccanismo è generalmente definito come “thermal hopping”. Il trasferimento di elettrone avviene in più step e nel trasferimento di carica sembra svolgere un ruolo cruciale la sequenza del DNA. Per capire

questo è necessario confrontare le energie relative delle coppie di basi G-C e A-T. Queste energie sono state dedotte attraverso lo studio di modelli computazionali, esperimenti di fotoemissione e misure elettrochimiche. L'elemento importante è che una carica positiva è più stabile in una coppia di basi G-C piuttosto che in una coppia A-T, pertanto una carica si localizzerà più facilmente su una coppia G-C, mentre al contrario una coppia A-T avendo una più alta energia costituirà una barriera al trasporto di carica. In questo modo il trasferimento di carica avviene da una coppia di basi G-C ad un'altra G-C. Quando la distanza tra coppie G-C diviene eccessiva per avere un salto di carica efficiente allora il trasferimento avviene anche attraverso la mediazione di coppie A-T. Il trasferimento di carica mediato dal DNA può anche essere visto come un processo ossidativo o riduttivo. In particolare il processo ossidativo è oggetto di studio da parte dei ricercatori perché responsabile di alcune lesioni del DNA riscontrate in alcune mutazioni e forme di cancro. Delle quattro basi del DNA la guanina è quella più soggetta al processo di ossidazione. Pertanto nel meccanismo di hopping il radicale cationico della guanina (G^+) sembra comportarsi da intermediario nel trasferimento di carica. Una volta che si genera la carica positiva tra le basi impilate del DNA, questa salta di guanina in guanina fino ad essere intrappolata da un accettore appropriato.

2.3 Potenziali nano-applicazioni

Il crescente sviluppo nel campo dell'ingegneria genetica ha permesso di utilizzare il DNA come componente per dispositivi elettronici molecolari. Per esempio un singolo filamento di DNA è stato utilizzato come ponte tra due elettrodi metallici. Per assicurare un legame di tipo selettivo, possono essere legati agli elettrodi brevi tratti a singolo filamento di DNA complementari al filamento che voglio studiare: solo i frammenti con la sequenza opportuna sono in grado così di accoppiarsi agli elettrodi. Dopo che il DNA si è legato i

controioni sono stati rimpiazzati con ioni Ag^+ così che il DNA può essere utilizzato come scheletro sul quale far crescere un sottile filo d'argento metallico dopo un trattamento in ambiente riducente (figura 2.3).

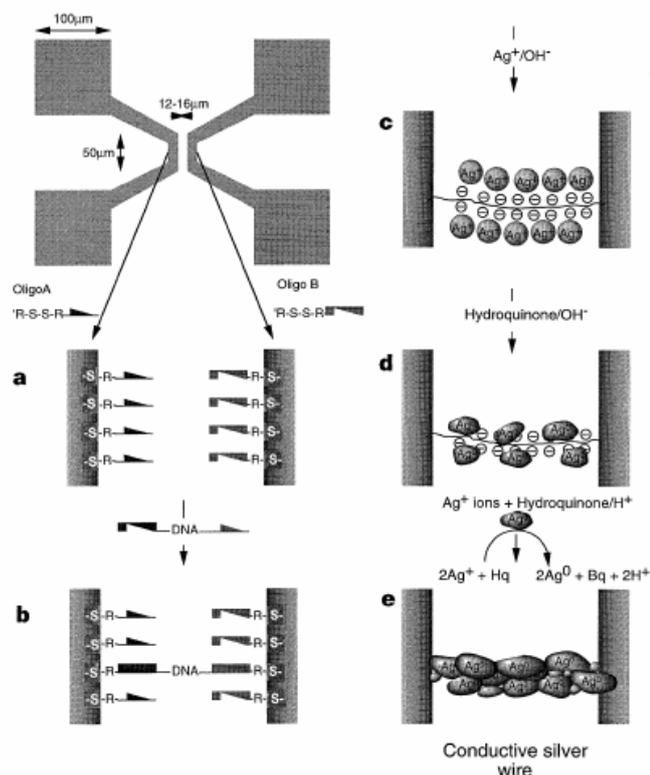


Figura 2.3

In altri studi una singola molecola di DNA è stata intrappolata elettrostaticamente in una gabbia metallica e misurata la corrente in funzione del potenziale si è evidenziato che il comportamento di questa è simile ad un diodo. Una delle applicazioni più interessanti che sfrutta le proprietà elettroniche e di autoassemblaggio del DNA è quella dei DNA-chip. Questi dispositivi si basano sul fatto che dei brevi filamenti di DNA singolo possono legare altri filamenti di DNA che hanno una sequenza complementare e che possono quindi essere utilizzati come sonde per la ricerca di specifiche

sequenze genetiche presenti in campioni di DNA. Micro-chip fabbricati con sonde basate su DNA stanno trovando un largo impiego in campo analitico e medico. Attualmente, i chip vengono analizzati otticamente ma una ulteriore miniaturizzazione potrebbe richiedere nuovi sistemi di interpretazione sulla base dello studio delle proprietà di trasferimento elettronico del DNA.

CAPITOLO 3 – I G-QUARTETTI

3.1 Introduzione

In aggiunta alla classica struttura in doppia elica, certe sequenze del DNA possono ripiegarsi in strutture secondarie in quadrupla elica, la cui unità base è costituita da un quartetto di guanosine ⁵ legate attraverso uno schema di legami ad idrogeno di tipo Hoogsteen (figura 3.1).

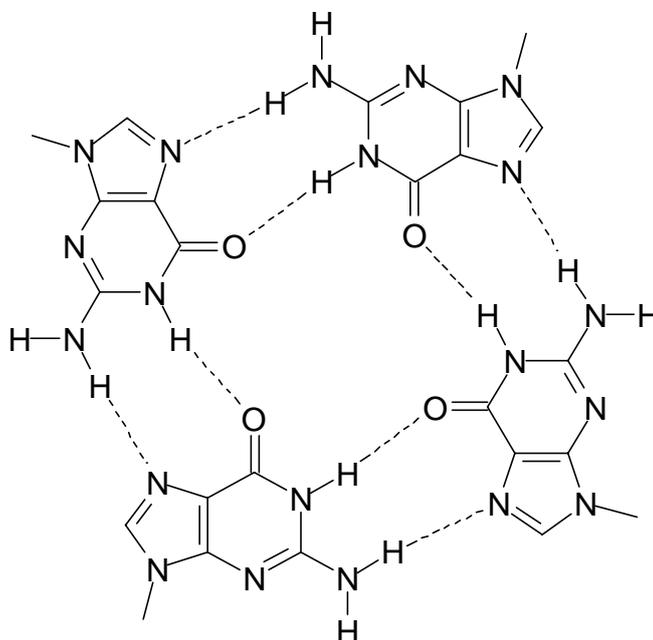


figura 3.1

In vivo queste sequenze sono presenti in specifiche regioni del genoma, come le porzioni terminali telomeriche dei cromosomi e le regioni regolatorie trascrizionali degli oncogeni. Per questo motivo i G-quartetti rappresentano un potenziale bersaglio nello sviluppo di nuovi farmaci.

3.2 La struttura delle molecole di DNA in quadrupla elica

La quadrupla elica di DNA è formata da tetrameri impilati, ognuno dei quali è originato dall'associazione planare di quattro guanosine attraverso uno schema di legami ad idrogeno di tipo Hoogsteen. La struttura è stabilizzata dalla presenza di cationi monovalenti come il K^+ e Na^+ che coordinano gli otto ossigeni carbonilici di due tetrameri impilati. In vitro esistono diversi tipi di strutture di G-quartetti e vengono classificati a seconda della loro struttura molecolare e orientazione dei filamenti che li contengono. Alcuni esempi sono mostrati in figura 3.2.

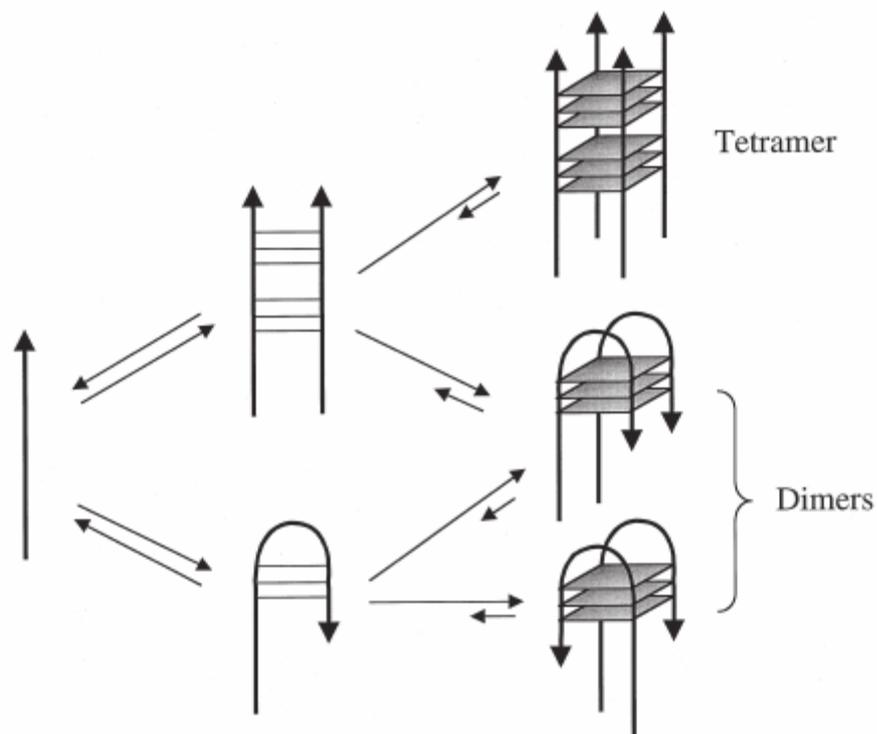


Figura 3.2

Sebbene in vitro tratti di DNA ricchi in guanosine siano in grado di formare i G-quartetti in presenza di cationi metallici come K^+ e Na^+ , in vivo la formazione di questi risulta essere più complicata. Recentemente, sia la

scoperta di proteine capaci di facilitare la formazione dei G-quartetti, sia la constatazione che la forma B della doppia elica del DNA in presenza di ioni è in grado di interconvertirsi in G-quadruplex intermolecolari lascia supporre che questo tipo di strutture siano assemblate e disassemblate all'interno della cellula con una certa facilità.

3.3 Possibili ruoli biologici dei G-quartetti nel DNA.

I telomeri sono le estremità specializzate dei cromosomi e sono costituite da una porzione lunga in doppio filamento contenente una sequenza tandem ripetitiva e da una sporgenza più corta a singolo filamento ricca di guanosine. La formazione dei G-quartetti in questa sporgenza terminale dei telomeri sembra costituire il meccanismo molecolare di difesa della cellula contro possibili danneggiamenti⁶. Inoltre i G-quartetti sono coinvolti nel processo di allungamento del DNA telomerico da parte dell'enzima a trascrizione inversa telomerasi. In questa reazione di allungamento si ha il processo di traslocazione durante il quale si forma transitoriamente un ripiegamento del DNA telomerico (forcina) dovuto alla formazione di strutture a G-quartetto. Questo meccanismo sembra essere alla base del distacco della telomerasi dal DNA telomerico. E' stato inoltre dimostrato che la struttura a G-quartetto deve essere disassemblata prima che il DNA telomerico possa subire un nuovo processo di allungamento. Pertanto molecole in grado di stabilizzare i G-quartetti possono fungere da inibitori della telomerasi.

Anche nei promotori di alcuni geni, come quello della β -globina umana, e di alcuni oncogeni sono state trovate delle sequenze ricche in guanosina in grado quindi di formare strutture a g-quartetto. Si può ipotizzare che questo tipo di struttura possa svolgere un ruolo cruciale nella regolazione della trascrizione dei geni. E' stato proposto un coinvolgimento dei G-quartetti anche nel processo di allineamento e ricombinazione cromosomiale, e nelle malattie associate alla replicazione del DNA.

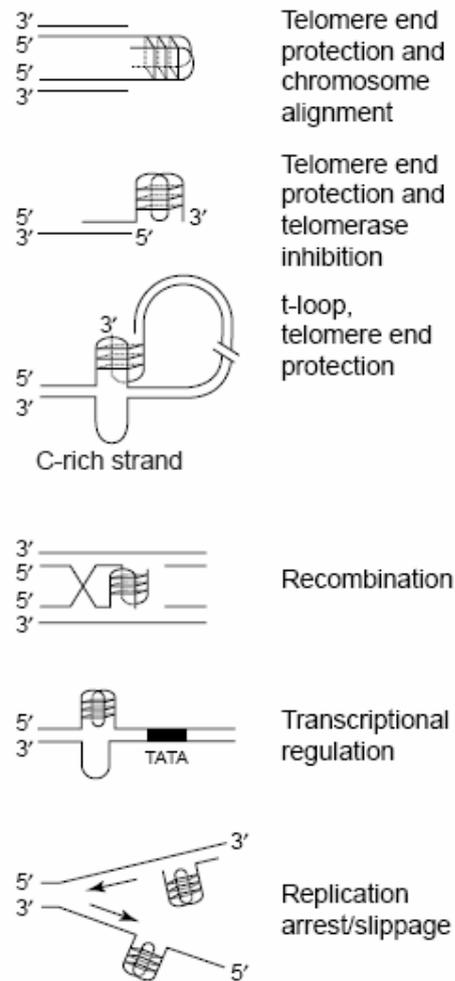
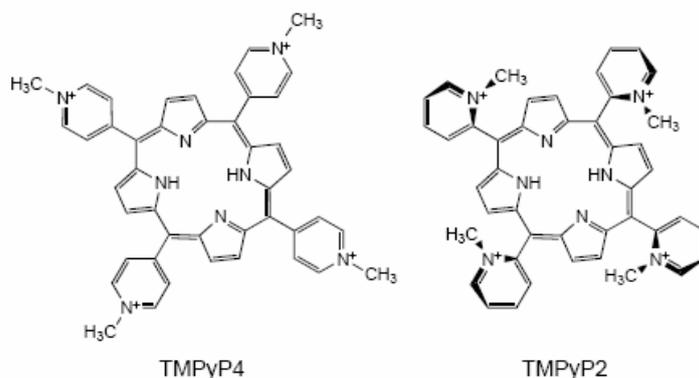
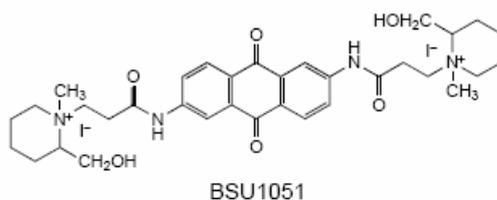


Figura 3.3

3.4 G-quartetti come possibile target di antitumorali

Nella maggior parte delle cellule del corpo, i telomeri si accorciano di poco ogniqualvolta la cellula si divide. Questo progressivo accorciamento dei telomeri funge da orologio biologico, limitando il numero di repliche della cellula ⁷. Nell'85% dei tumori l'enzima telomerasi è in continua attività e preserva in questo modo la lunghezza dei telomeri assicurando l'immortalità della cellula tumorale. Perché la telomerasi svolga la sua attività il singolo

filamento di DNA telomeric deve necessariamente essere lineare e privo di qualsiasi forcina o ripiegamento, la formazione di G-quartetti in questa regione ne inibisce invece l'attività. Pertanto molecole in grado di legarsi selettivamente ai G-quartetti stabilizzandone la struttura costituiscono dei potenziali farmaci capaci di bloccare la crescita incontrollata delle cellule tumorali. Attualmente sono stati identificati e studiati numerosi composti con queste caratteristiche tra i quali sono da ricordare: gli antrachinoni, le porfirine cationiche, i perileni, il bromuro di etidio, i derivati dell'acridina e le carbocianine; le strutture sono schematizzate in figura 3.4.



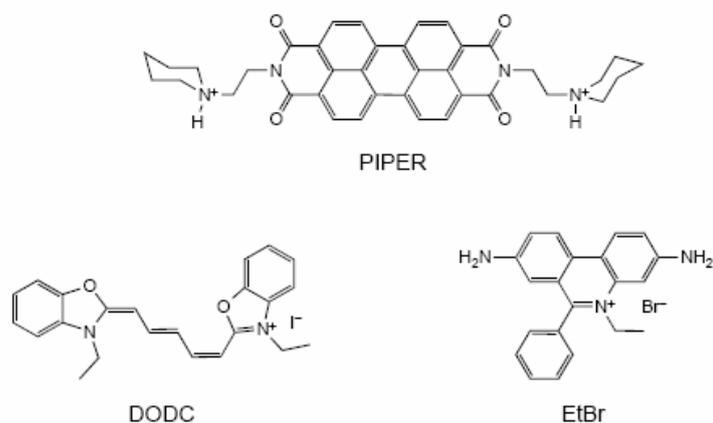


Figura 3.4 *Abbreviazioni: DODC, 3,3'-diethyloxycarbocyanine; EtBr, ethidium bromide; PIPER, N,N'-bis [2-(1-piperidino)-ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide; TMPyP2, tetra-(N-methyl-2-pyridyl)porphine; TMPyP4, tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine.*

Tra questi, le porfirine hanno suscitato un maggior interesse nella terapia antitumorale data la loro proprietà di accumularsi principalmente nei tessuti tumorali piuttosto che in quelli sani. L'arrangiamento planare degli anelli aromatici delle porfirine aiuta queste molecole a legarsi ai G-quartetti attraverso un fenomeno di stacking. Due possibili meccanismi sono stati proposti: uno propone che le porfirine si mettano in stacking esternamente al complesso tetramericco di guanosine, l'altro che le porfirine si intercalino tra due tetrameri.

CAPITOLO 4 – ARCHITETTURE SUPRAMOLECOLARI GENERATE DA DERIVATI DI GUANOSINA

4.1 Autoassemblaggio in fase acquosa

Il gruppo di ricerca a cui appartengo, ha iniziato studi sulla guanosina a partire già dagli anni 80⁸, quando fu scoperto che una soluzione acquosa del sale sodico di 2'-deossiguanilil-(3'-5')-2'-deossiguanosina (figura 4.1) formava una fase liquido-cristallina colesterica ed una esagonale per concentrazioni differenti.

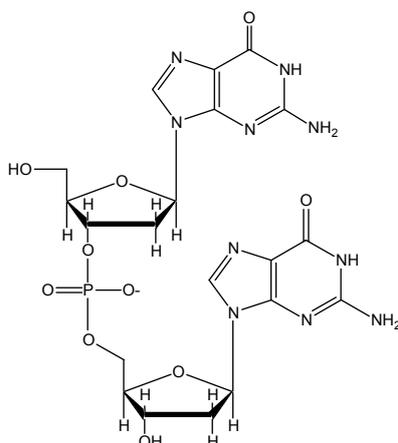


Figura 4.1

Era noto che molti biopolimeri, come il DNA, mostravano fasi liquido cristalline in acqua. Le mesofasi sono dovute alla struttura della doppia elica del DNA che può essere paragonata ad un bastoncino con una superficie idrofilica ed un core lipofilo⁹. Questi oggetti allungati sono chirali e si possono aggregare secondo un ordine colesterico o esagonale a seconda della concentrazione nella fase acquosa (figura 4.2).

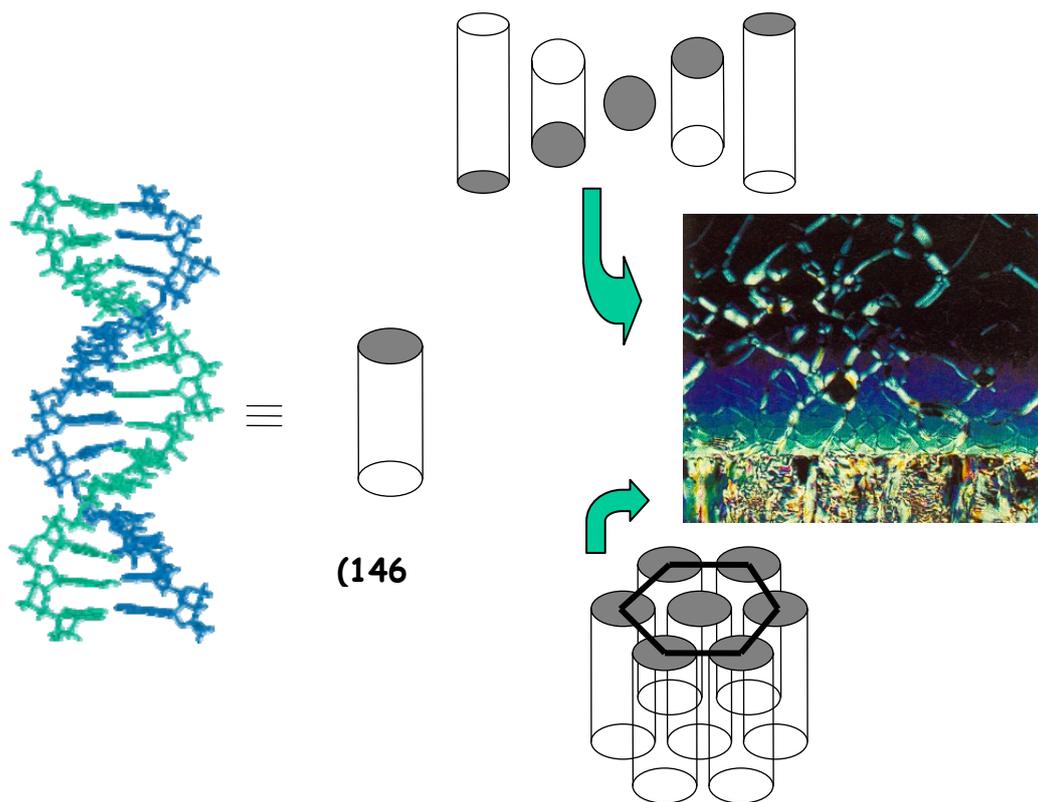


Figura 4.2

La tessitura delle mesofasi del DNA sono del tutto analoghe a quelle osservate per i derivati della guanosina, sebbene le strutture di questi ultimi non siano ne dei polimeri ne degli oggetti anisometrici lunghi come il DNA.

Tra le basi azotate, la guanosina è l'unica a possedere molteplici siti donatori ed accettori di legami ad idrogeno, che le permettono di legare altre guanosine per formare i cosiddetti G-quartetti attraverso uno schema di legami ad idrogeno tipo Hoogsteen (figura 4.3).

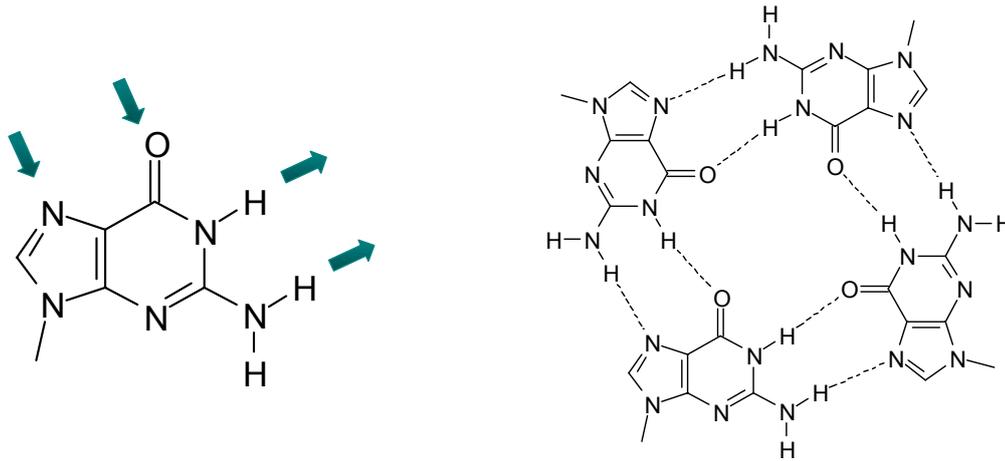


Figura 4.3

Il G-quartetto è stato riconosciuto come l'unità fondamentale delle quadrupla elica di poly(G)¹⁰, un polimero nel quale l'unità monomerica è costituita dalla guanosina monofosfato. In questa struttura i G-quartetti sono legati attraverso ponti covalenti zucchero-fosfato (figura 4.4).

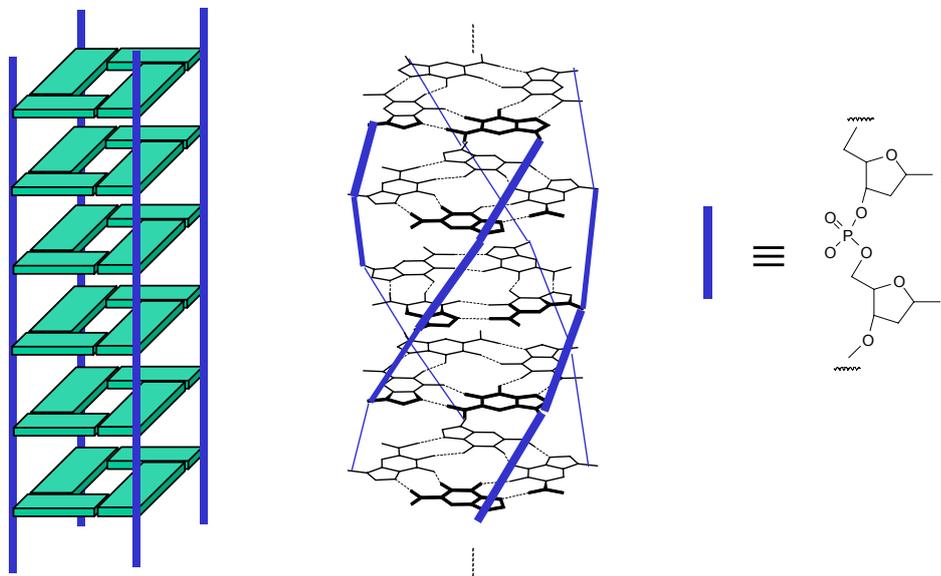


Figura 4.4

Nonostante l'assenza dei ponti zucchero-fosfato anche le guanosine a basso peso molecolare autoassemblano secondo uno schema a G-quartetto¹¹, dove i quartetti si impilano uno sull'altro alla distanza di van der Waals e i cationi sono intrappolati tra essi (figura 4.5). Le interazioni di stacking e la coordinazione degli ioni metallici stabilizza questa struttura anche in assenza di ponti covalenti tra quartetti adiacenti. Come conseguenza della chiralità intrinseca dei composti, ogni G-quartetto risulta essere ruotato rispetto a quello adiacente.

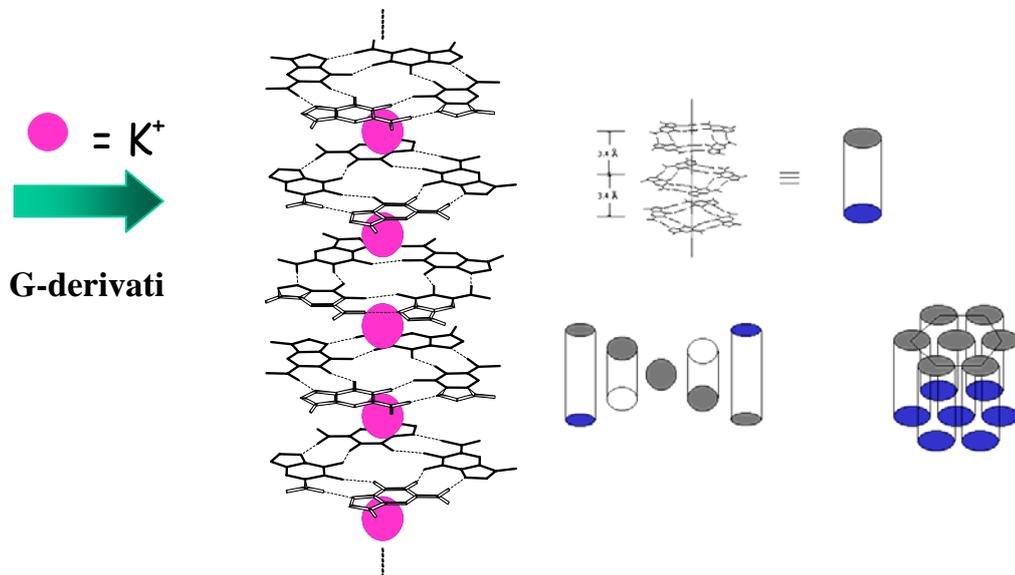


Figura 4.5

Questi aggregati formano delle mesofasi liotropiche di tipo colesterico o esagonale in funzione della concentrazione, della temperatura e della quantità di sali presenti. La struttura base è un aggregato chinale di tipo colonnare basato su G-quartetti tenuti assieme da interazioni non covalenti. Studi di diffrazione dei raggi X a basso angolo hanno mostrato nella regione a più alto angolo un picco stretto che corrisponde ad una periodicità di circa 3.4 Å, valore tipico per sistemi aromatici in stacking. Inoltre sono state calcolate le mappe di densità elettronica che confermano l'esistenza di un sistema basato

su G-quartetti . All'inizio degli anni novanta esperimenti di diffrazione a raggi X su un singolo cristallo di tetraplex dell'oligonucleotide d(TG4T) hanno chiaramente mostrato la struttura dei G-quartetti, la posizione dei cationi e lo stacking chirale dei tetrameri ¹² (figura 4.6).

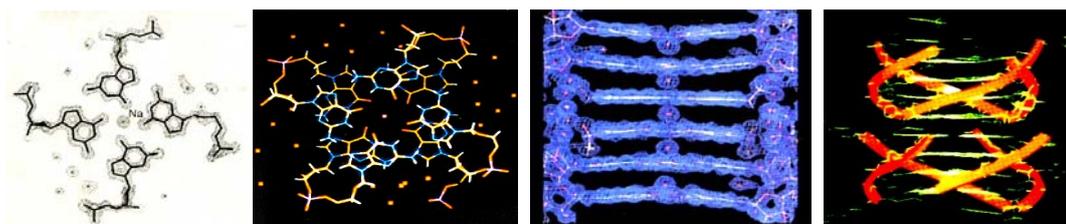


Figura 4.6

Il processo di autoassemblaggio dei derivati della guanosina può essere facilmente indagato attraverso il dicroismo circolare ¹³. Un esempio viene mostrato in figura 4.7, in cui sono riportati gli spettri CD delle diverse specie formate dall'aggregazione del composto d(Gp) in acqua a tre differenti temperature ¹⁴. A 30 °C lo spettro corrisponde alla specie non assemblata, a 5 °C alla specie colonnare in cui è evidente un couplet negativo nella regione di assorbimento della guanosina correlabile allo stacking sinistrorso di G-quartetti adiacenti e a 1 °C alla fase colesterica in cui appare un segnale negativo molto intenso correlabile ad una fase liquido-cristallina sinistrorsa. Quindi attraverso la spettroscopia CD è possibile determinare anche il senso di rotazione dell'aggregato colonnare e della fase colesterica.

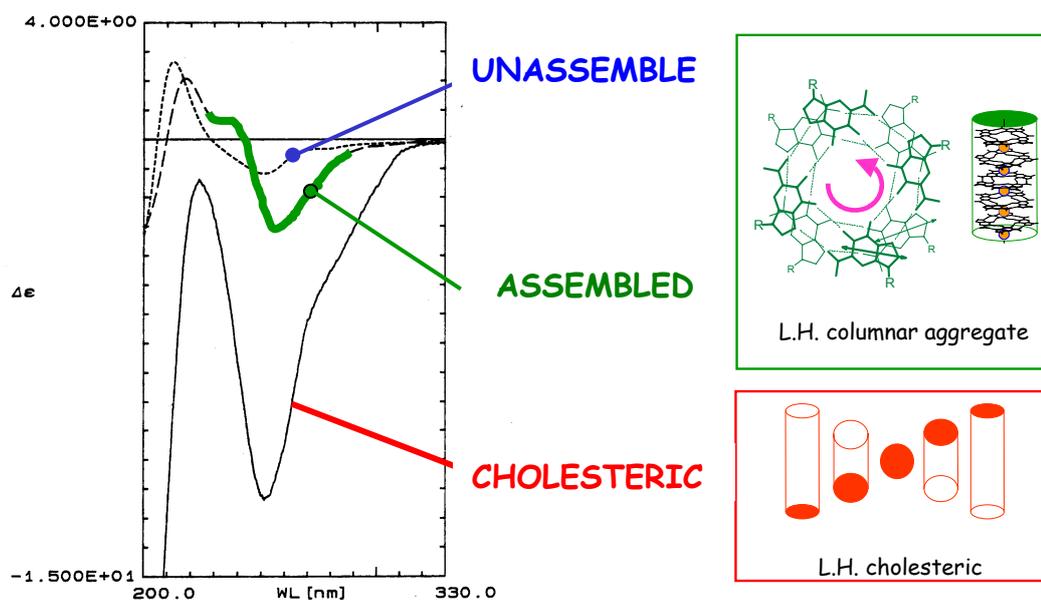
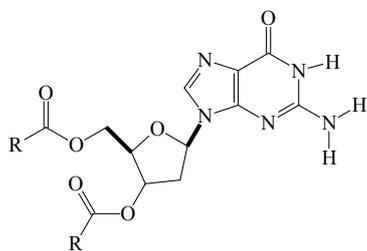


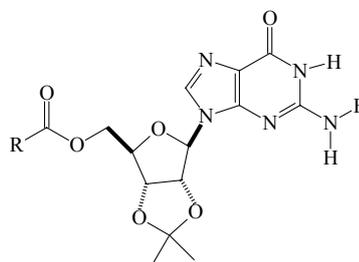
Figura 4.7

4.2 Autoassemblaggio di derivati lipofili della guanosina in presenza di cationi

Sulla base dei risultati ottenuti in fase acquosa ed in particolare sul ruolo dei cationi nel processo di aggregazione, è stato studiato l'autoassemblaggio di derivati lipofili di guanosina anche nei solventi organici. Per fare questo sono stati preparati degli esteri della guanosina **1-5**.



- 1** R = C₉H₁₉
2 R = *p*-(C₁₂H₂₅O)-Ph
3 R = C₂H₅



- 4** R = C₉H₁₉
5 R = *p*-(C₇H₁₅O)-Ph

Un aspetto interessante di queste lipo-G è che possono comportarsi da veri e propri ionofori. In esperimenti di estrazione, soluzioni dei composti **1** e **2** in cloroformio sono state sbattute con soluzioni acquose di sali di picrato (insolubile in cloroformio); la colorazione gialla caratteristica del cromoforo picrato è stata trasferita alla fase organica segno dell'avvenuta complessazione del sale di picrato da parte dei derivati lipo-G¹⁵ come mostrato in figura 4.8.

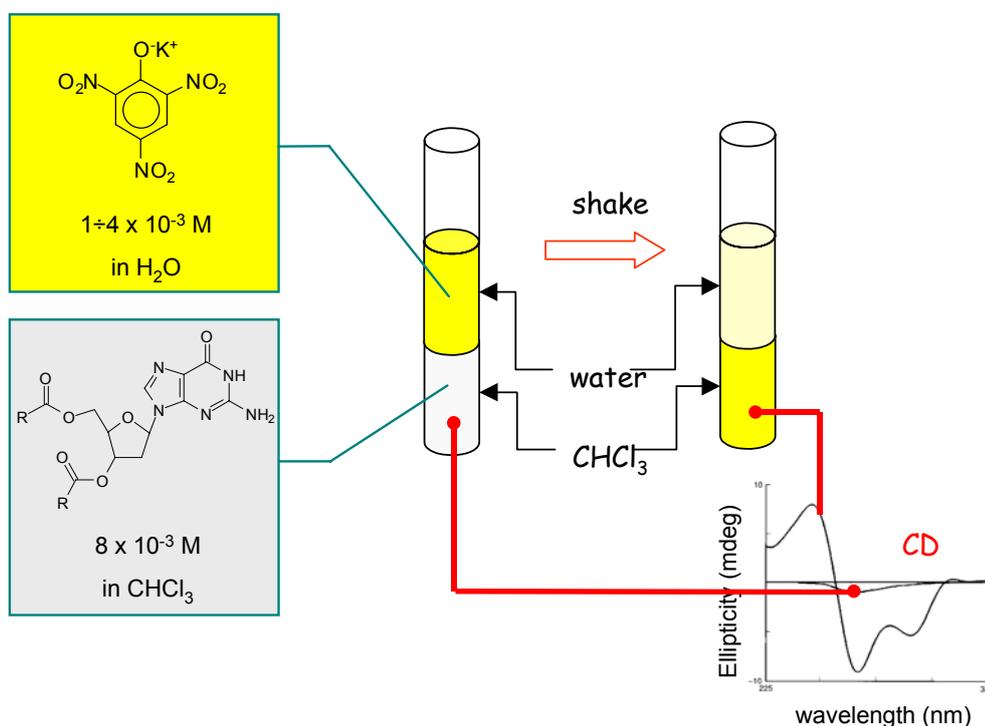


Figura 4.8

Le lipo-G possono quindi essere paragonate a degli ionofori autoassemblanti una novità rispetto ai classici ionofori come gli eteri corona. Come già visto per i sistemi acquosi è possibile seguire l'autoassemblaggio delle guanosine lipofile attraverso la spettroscopia CD, che mostra chiaramente la formazione di G-quartetti impilati. La struttura del complesso che si forma dipende dal rapporto tra le guanosine ed il picrato utilizzato durante l'estrazione. Per

seguire l'autoaggregazione è possibile utilizzare anche la spettroscopia NMR registrando gli spettri di [lipo-G/picrato] con stechiometrie differenti. Una parte dello spettro del composto **1** in cloroformio in presenza di differenti concentrazioni di potassio picrato viene riportato in figura 4.9.

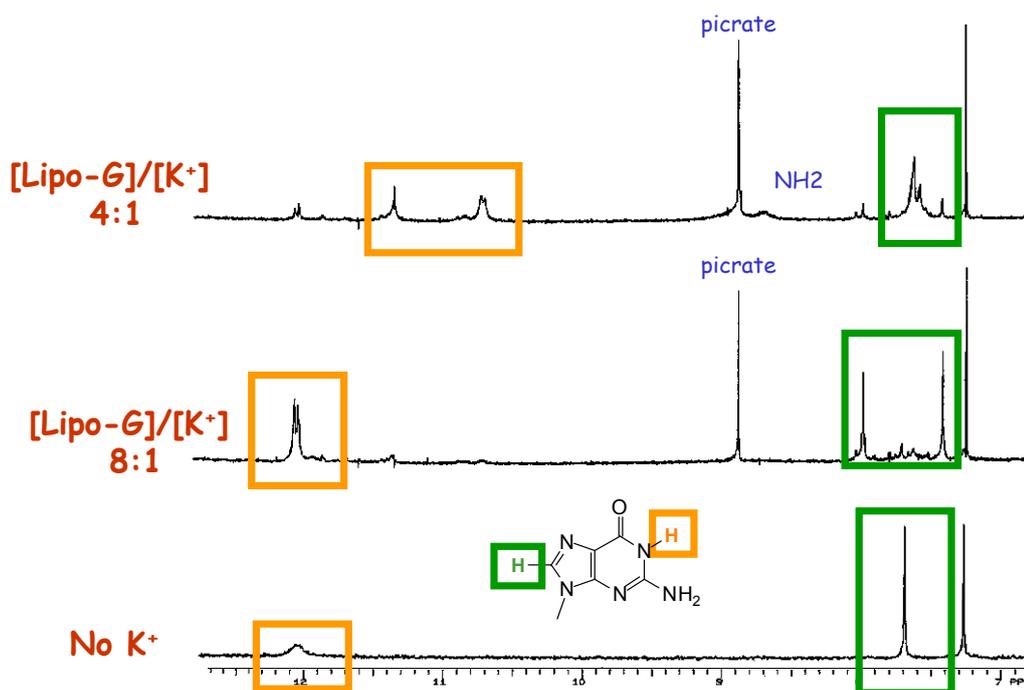


Figura 4.9

Dopo estrazione in rapporto 8:1 (guanosina:picrato) i segnali dei protoni H8 e H1 cambiano. Aumentando la concentrazione del sale (4:1) lo spettro NMR cambia ulteriormente evidenziando la presenza di due complessi differenti con una diversa stechiometria. Questi risultati sono in accordo con lo schema di autoassemblaggio delle lipo-G controllato da cationi riportato in figura 4.10. I cationi metallici fungono quindi da cemento per tenere insieme i G-quartetti. Con l'aumento dello ione K^+ si ha da prima la formazione di un "ottamero" e poi la formazione di uno *pseudo*-polimero con stechiometria 4:1.

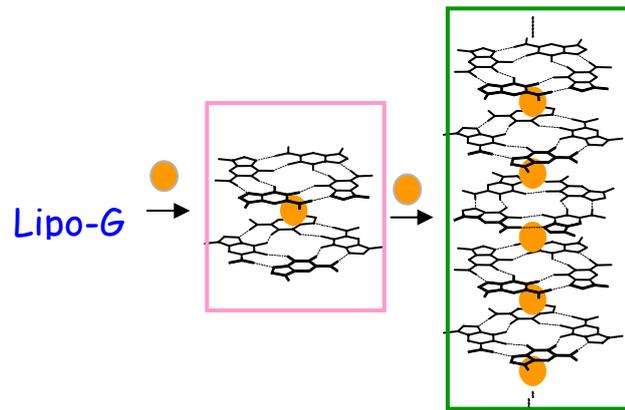


Figura 4.10

Uno studio NMR più dettagliato ha permesso di identificare la struttura dell'ottamero di lipo-G¹⁶. Lo spettro NMR riportato in figura 4.11 mostra due set di segnali in rapporto 1:1. Un set di segnali corrisponde ai quartetti di guanosina in conformazione *anti* e l'altro set di segnali corrisponde ai quartetti in conformazione *syn*. L'ottamero costituito da un quartetto tutto *anti* impilato sopra ad un quartetto tutto *syn* ha un arrangiamento definito testa-coda.

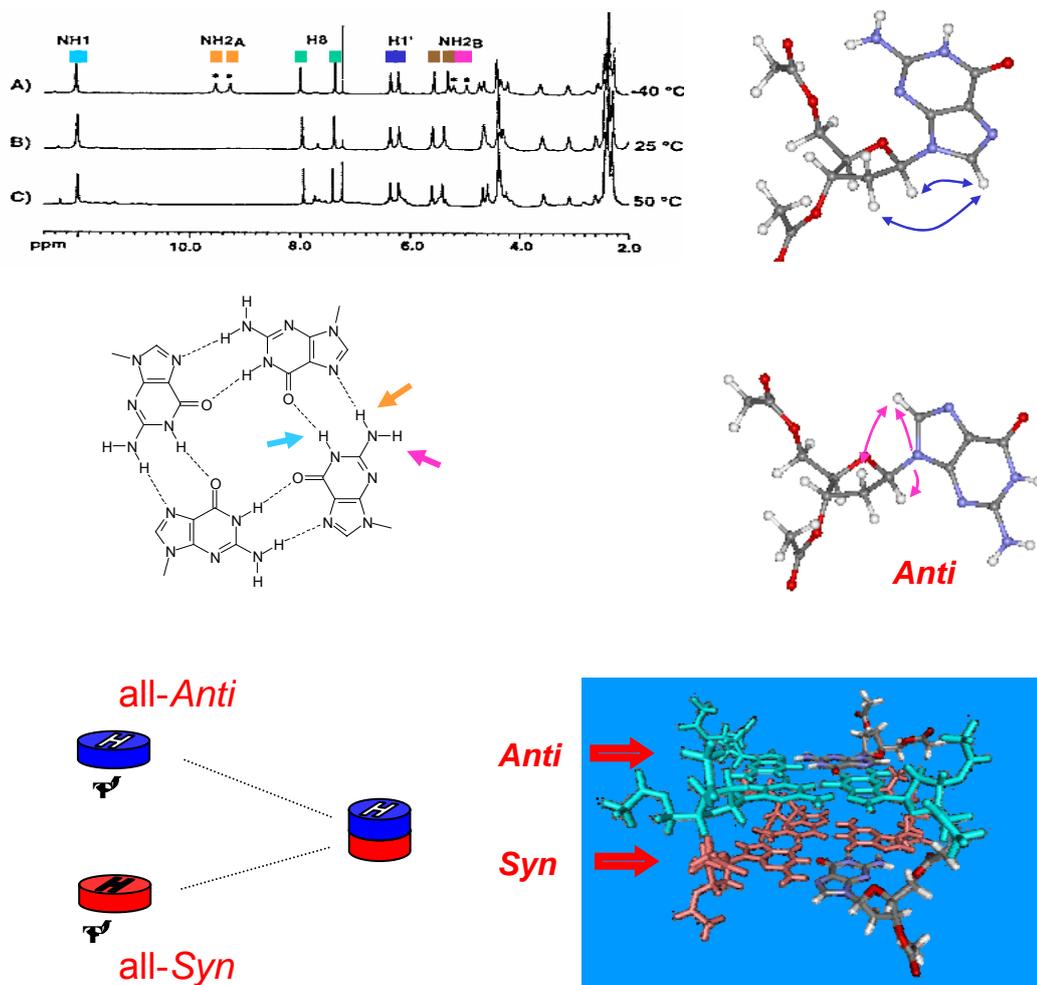


Figura 4.11

Anche l'aggregato *pseudo*-polimerico è stato caratterizzato allo stesso modo attraverso studi NMR¹⁷ eseguiti sul composto **1** in cloroformio in presenza di un eccesso di KPic. Lo spettro ha mostrato tre set di segnali in rapporto 1:1:1 che sono stati attribuiti a tre differenti conformazioni dei G-quartetti come mostrato in figura 4.12.

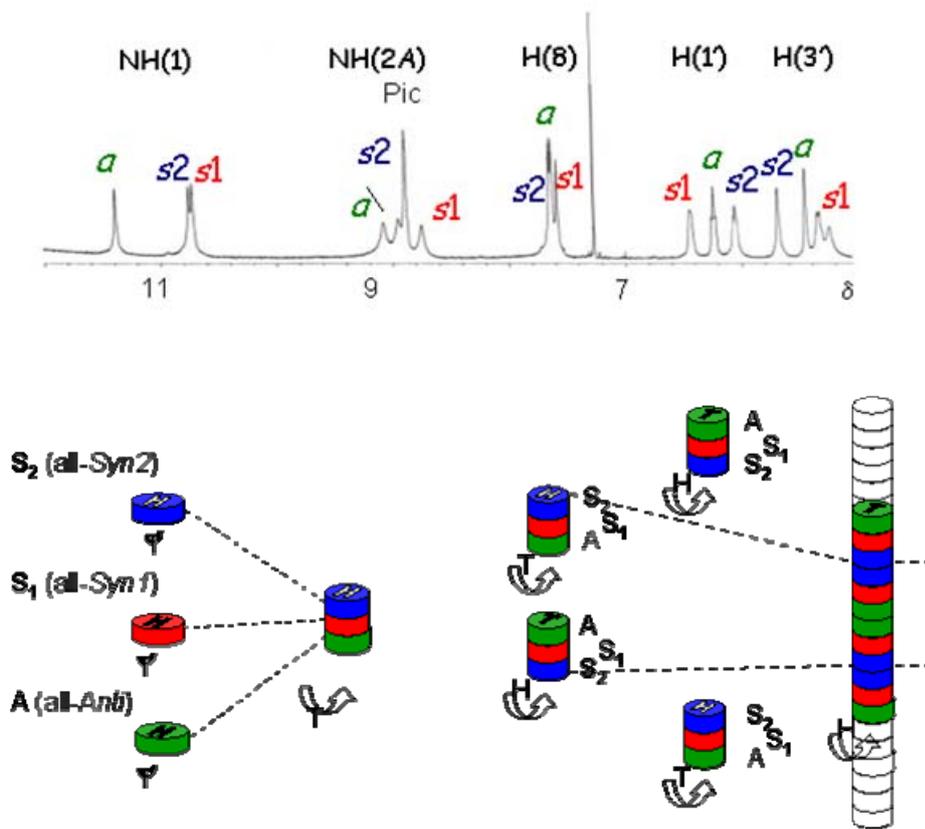


Figura 4.12

La prima struttura a risoluzione atomica dell'aggregato colonnare è stato ottenuta per cristallizzazione di un silil-derivato di guanosina con potassio e cesio picrato. I risultati hanno confermato la struttura proposta in soluzione con i G-quartetti impilati e gli ioni metallici intrappolati tra i vari piani ¹⁸. Quando il polimero lipofilo viene disciolto in solventi idrocarburici genera liomesofasi di tipo colesterico ed esagonale a seconda della concentrazione, come confermato da studi di microscopia ottica e misurazioni di diffrazione dei raggi X a basso angolo ¹⁹. In figura 4.13 sono riportate le immagini delle tessiture osservate al microscopio del composto **1** in presenza di K-Picrato in

eptano. L'immagine *a* corrisponde ad una fase colesterica alla concentrazione p/p del 10%, la *b* ad una fase esagonale con una concentrazione p/p del 20%. L'immagine *d* corrisponde ad una fase colesterica allineata con un campo magnetico analogamente a quanto osservato per le guanosine idrofile.

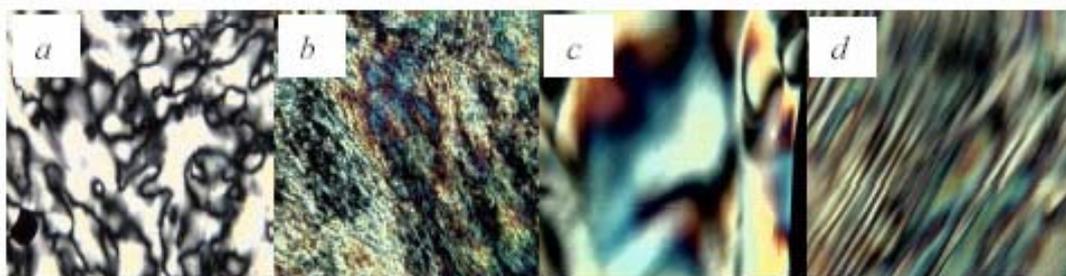


Figura 4.13

La guanosina non è l'unica nucleobase che può autoassemblare per dare origine a strutture supramolecolari differenti. L'isoguanosina (isoG) è un isomero della guanosina che differisce per la trasposizione dell'azoto e dell'ossigeno alle posizioni C2 e C6. Questa lieve differenza causa autoassemblaggi con arrangiamenti differenti per le due molecole. Se la guanosina forma dei G-quartetti impilati in presenza di cationi metallici, l'isoguanosina forma dei pentameri attraverso legami ad idrogeno che si impilano a formare un decamero in presenza di Cs^{+} ²⁰ (figura 4.14). Questa differenza nello schema di autoassemblaggio e nella grandezza del macrociclo risultante è stata spiegata considerando le geometrie ottimali nella formazione dei legami ad idrogeno per le due nucleobasi. Per G i siti donatori ed accettori sono posizionati a 90° l'uno rispetto all'altro, un'orientazione ottimale per la formazione del G-quartetto. Per la formazione di un pentamero planare di isoG risulta invece essere ottimale un angolo di 67° tra i siti donatori e quelli accettori. La grandezza maggiore del pentamero di isoG rispetto al tetramero di G spiega inoltre la selettività verso cationi più grandi come il Cs^+ .

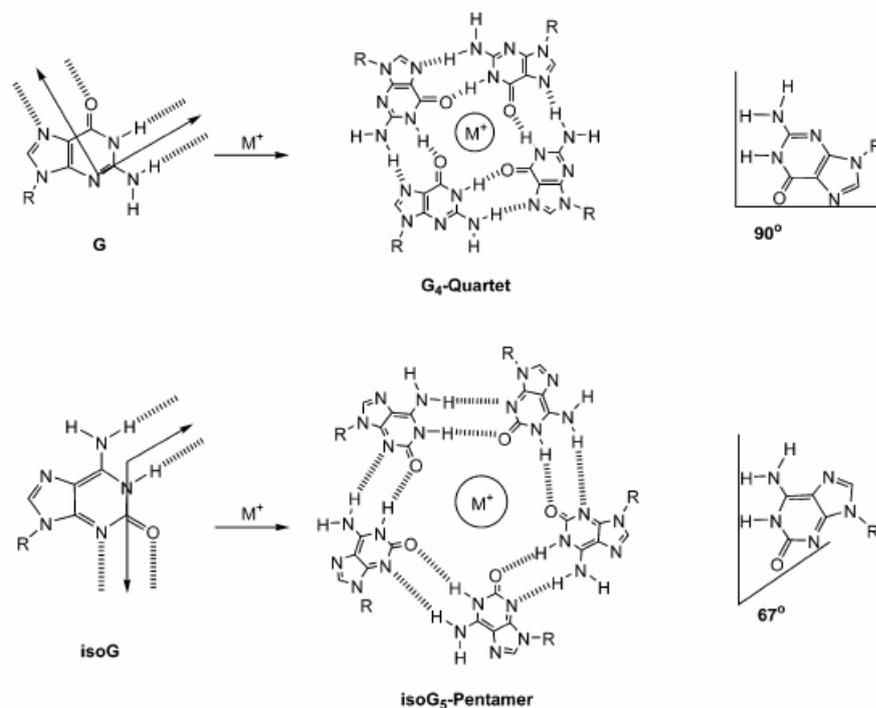


Figura 4.14

Il radionuclide $^{137}\text{Cs}^+$ è uno dei maggiori contaminanti nucleari ²¹. Uno degli obiettivi principali nelle contaminazioni nucleari è quello di riuscire a separare il $^{137}\text{Cs}^+$ radioattivo dal largo eccesso di Na^+ e K^+ in soluzione. Gli eteri corona si sono mostrati solo debolmente selettivi verso il Cs^+ a causa della loro flessibilità, mentre i calix[4]arene-etero corona sono sì più selettivi ma costosi da sintetizzare. La isoG rappresenta invece una valida alternativa per legare selettivamente il $^{137}\text{Cs}^+$ radioattivo attraverso la formazione di strutture autoassemblanti. Il decamero lipofilico di isoG è in grado oltre che di legare il Cs^+ anche di trasportarlo attraverso le membrane organiche. Sono stati effettuati studi di trasporto di CsNO_3 da parte di questi aggregati attraverso membrane liquide e membrane polimeriche con un'alta selettività ed efficienza di trasporto ²². Questi studi preliminari sono di forte

incoraggiamento per l'utilizzo in futuro di ionofori autoassemblanti di questo tipo nella separazione di contaminanti pericolosi.. Un recente studio ²³ ha descritto un G-quadruplex unimolecolare in grado di trasportare attraverso il doppio strato della membrana fosfolipidica lo ione Na^+ . Per fare questo è stato sintetizzato un estere in 5' della guanosina, capace quindi di autoassemblarsi in strutture a G-quartetto. Un processo di metatesi olefinica, attraverso l'utilizzo di un catalizzatore di Grubb di seconda generazione, ha poi permesso di formare dei legami intra ed inter-quartetto rendendo così l'aggregato stabile all'interno della membrana, come mostrato in figura 4.15.

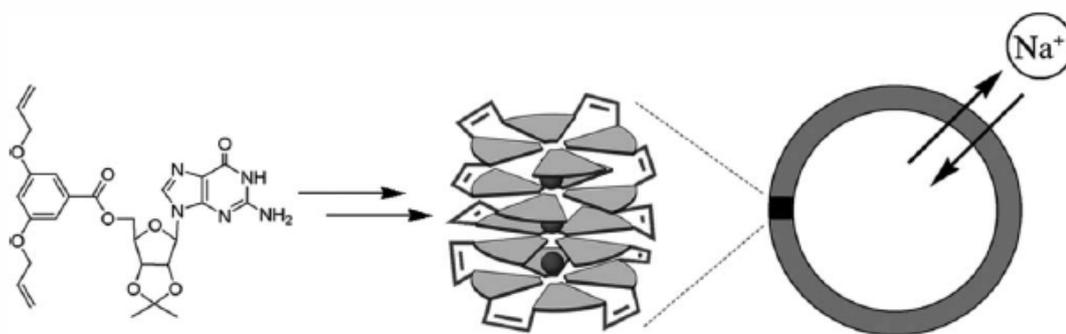


Figura 4.15

4.3 Autoassemblaggio di derivati lipofili della guanosina in assenza di cationi

Un'analisi NMR più approfondita dello spettro di lipo-G a concentrazioni molto diluite in cloroformio mostra che il valore di chemical shift di NH1 è tipico di un protone impegnato in legame ad idrogeno. Il modo più semplice per spiegare questo fenomeno è di ipotizzare l'esistenza in soluzione di una forma dimerica in cui l'NH1 è coinvolto in legami ad idrogeno. Aumentando la concentrazione il segnale dell'NH2 si sposta verso campi più bassi suggerendo che anch'esso è progressivamente coinvolto in legami ad

idrogeno. Questo fatto è riscontrabile anche con la spettroscopia IR dove le bande corrispondenti allo stretching dei protoni amminici liberi si riducono al crescere della concentrazione. L'esistenza di dimeri, trimeri ed altre specie oligomeriche è stata confermata dalla spettrometria ESI-MS²⁴ (figura 4.16).

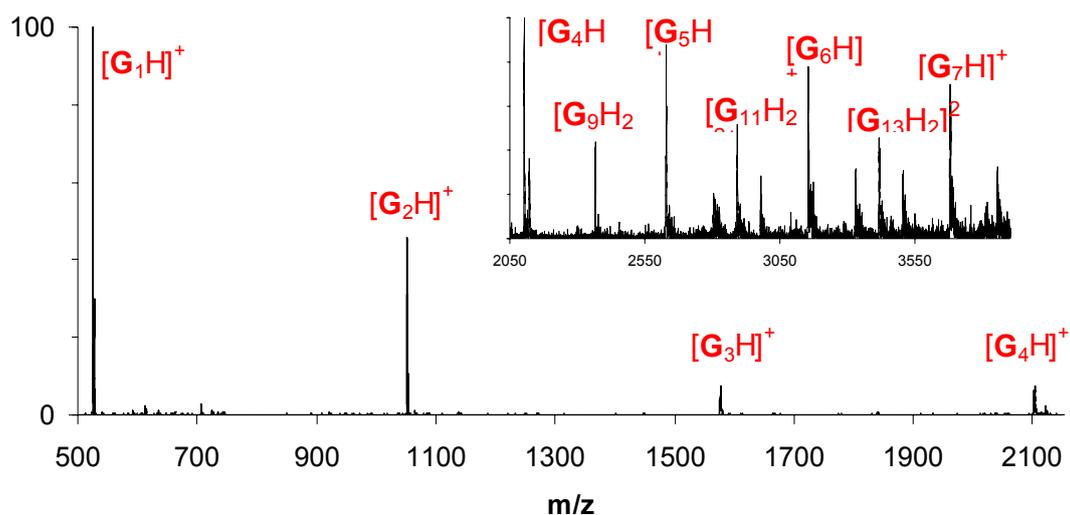


Figura 4.16 ESI-MS di **5** in cloroformio + 10% di acido formico

Il dimero presente a basse concentrazioni presenta due gruppi accettori e due gruppi donatori di legame ad idrogeno come mostrato in figura 4.17. Aumentando la concentrazione le unità dimeriche si aggregano attraverso legami ad idrogeno che coinvolgono gli amino gruppi e gli atomi di azoto in posizione 3 per dare una struttura a nastro. Questo tipo di autoassemblaggio in funzione della concentrazione trova riscontro con gli esperimenti NOE, che mostrano interazioni, che sono assenti nei dimeri, tra i protoni amminici e l'N(3) e tra i protoni amminici o imminici e i protoni dello zucchero. E' stato inoltre osservato che lo spettro NMR di una soluzione in cloroformio anidro appena preparata è differente dallo spettro registrato e discusso in precedenza di una soluzione in cloroformio "standard". In particolare il segnale H8 è

allargato per la soluzione appena preparata e nel tempo si muove a campi più alti e si stringe. Questa osservazione ha suggerito l'idea che la soluzione preparata di fresco mantenga la memoria dello stato solido nel quale è presente una struttura differente.

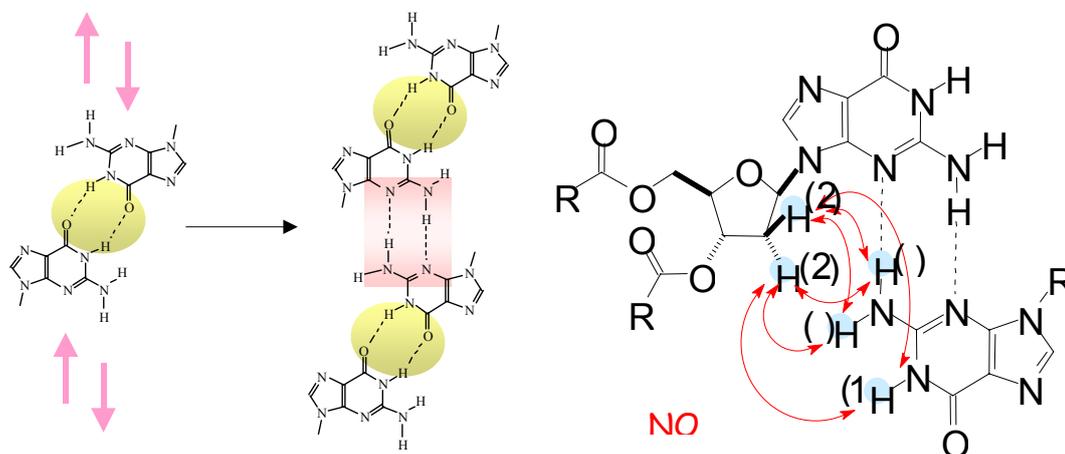


Figura 4.17

Esperimenti NOE eseguiti su una soluzione preparata di fresco forniscono indicazioni su un diverso pattern di interazioni. In particolare, come mostrato in figura 4.18, sono presenti interazioni tra H8, H2 e H1 che col tempo spariscono a favore delle interazioni descritte precedentemente e riportate in figura 4.17.

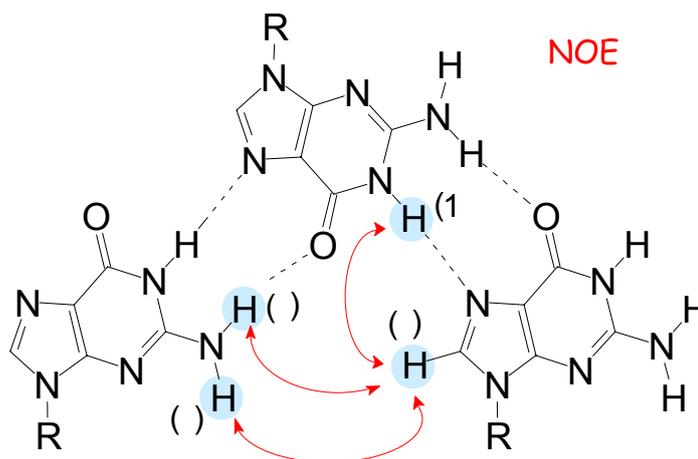


Figura 4.18

E' stato quindi proposto, per la soluzione in cloroformio appena preparata e per lo stato solido, l'esistenza di un differente tipo di nastro (figura 4.19). Nella soluzione in cloroformio, il nastro **I** lentamente si trasforma attraverso un riarrangiamento interno nel nastro di tipo **II** termodinamicamente più stabile per tornare al nastro di tipo I una volta rimosso il solvente. Le analisi dei raggi X eseguite sul singolo cristallo del composto **3** hanno successivamente confermato l'esistenza allo stato solido del nastro di tipo **I**²⁵.

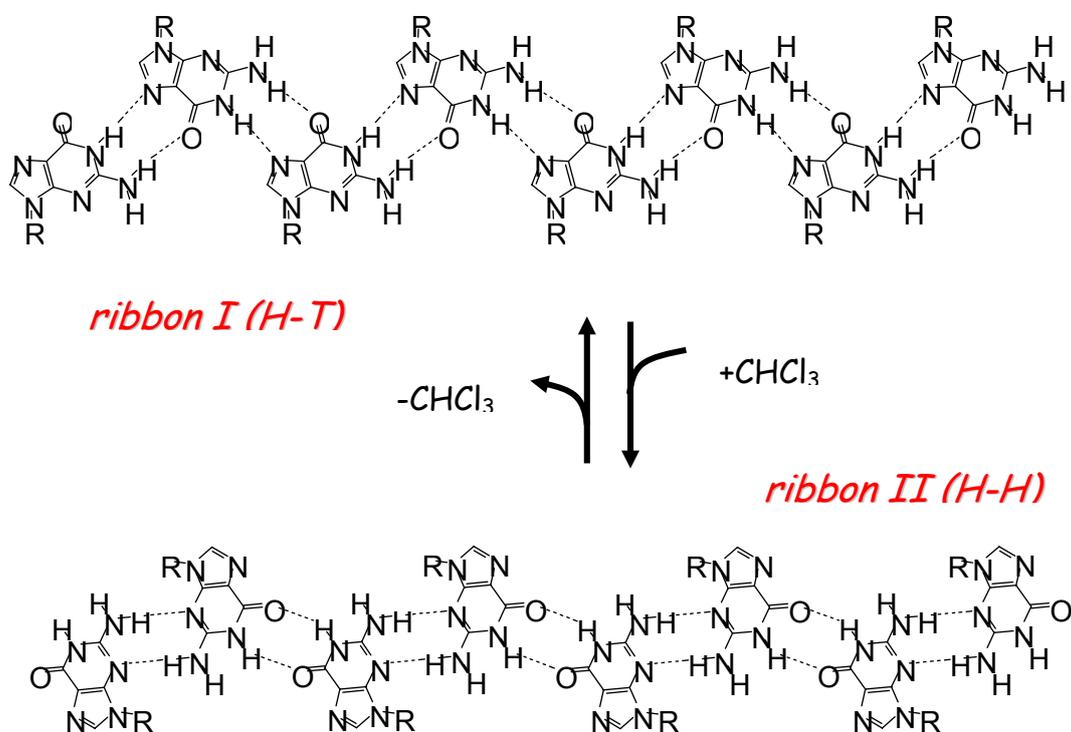


Figura 4.19

I nastri di guanosina sono stati osservati anche attraverso tecniche di spettroscopia a scansione di sonda²⁶. In figura 4.20 è rappresentata un'immagine SFM (scanning force microscopy) in cui è possibile osservare un nastro del composto **2** formatosi per evaporazione lenta del solvente su

substrato di mica. La larghezza del nastro misurata in circa 6.2 nm è perfettamente in accordo con la struttura proposta.

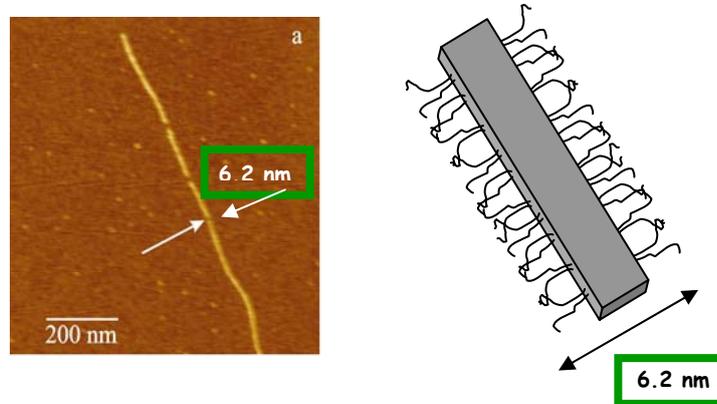


Figura 4.20

In figura 4.21 viene invece rappresentata un'immagine dello stesso composto ma registrata all'interfaccia grafite/soluzione attraverso la tecnica STM (scanning tunneling microscopy), in cui si può osservare i nastri vicini tra loro e interdigitati attraverso le catene lipofile. La dimensione calcolata della cella unitaria **b** è sovrapponibile a quella ricavata dal singolo cristallo di nastro **I** mediante i raggi X.

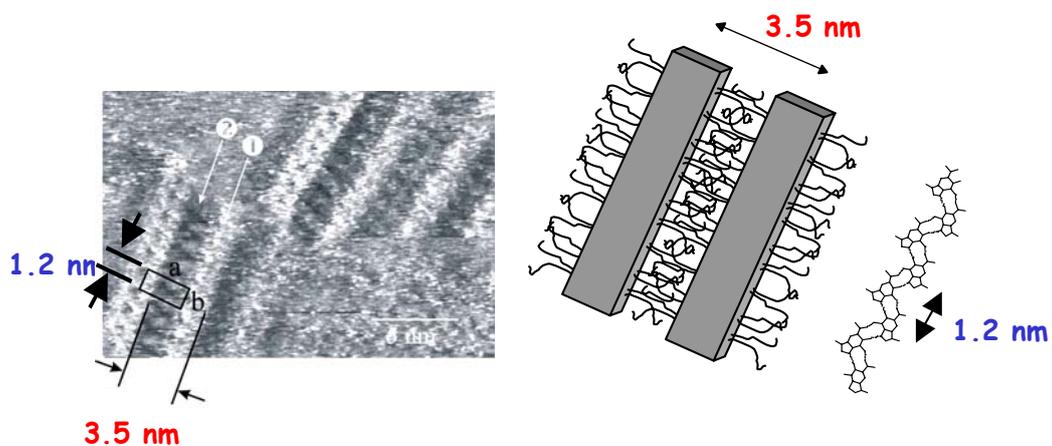


Figura 4.21

4.4 Dispositivi elettronici ibridi basati su derivati di desossiguanosina

In questo capitolo si riporta una nuova classe di dispositivi elettronici ibridi basati su guanosine modificate capaci di assemblare in strutture polimeriche a nastro e depositate tra due elettrodi metallici^{27,28}. Sono state scelte le guanosine sia per le loro proprietà di autoassemblaggio, sia perché tra le basi del DNA la guanosina è quella con un minor potenziale di ossidazione, che si traduce in una maggiore capacità di trasferimento di carica.

Il dispositivo elettronico ibrido utilizzato consiste in due elettrodi Au/Cr (35/8 nm) depositati su un substrato di silicio attraverso la litografia a fascio elettronico come mostrato in figura 4.22.

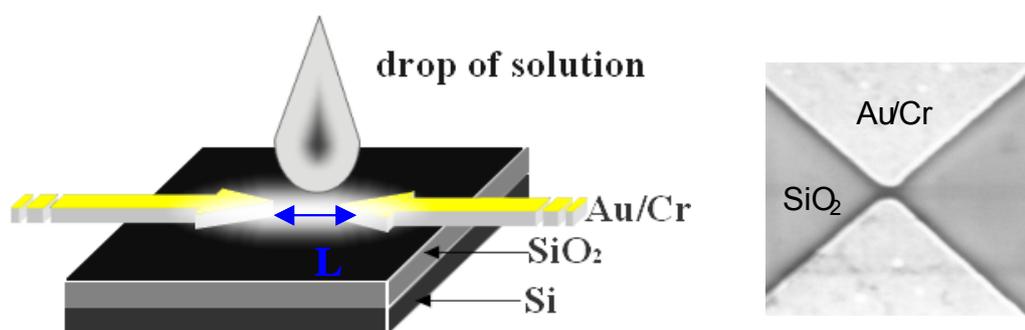


figura 4.22

La distanza (L) tra i due elettrodi è stata variata in un range di 30-120 nm. In seguito è stata depositata tra i due elettrodi una soluzione in cloroformio di dG(C₁₀)₂ ad una concentrazione di 3.3×10^{-2} M, concentrazione alla quale la guanosina forma degli aggregati ordinati. Per far sì che la conduzione fosse dovuta solo alla presenza dell'aggregato molecolare, il solvente è stato evaporato sotto vuoto (10^{-4} bar) per togliere eventuali tracce che avrebbero potuto condizionare le misurazioni. Per verificare la effettiva formazione del nastro di guanosina tra i due elettrodi, l'esperimento è stato seguito con l'ausilio della AFM (atomic force microscopy) come mostrato in figura 4.23.

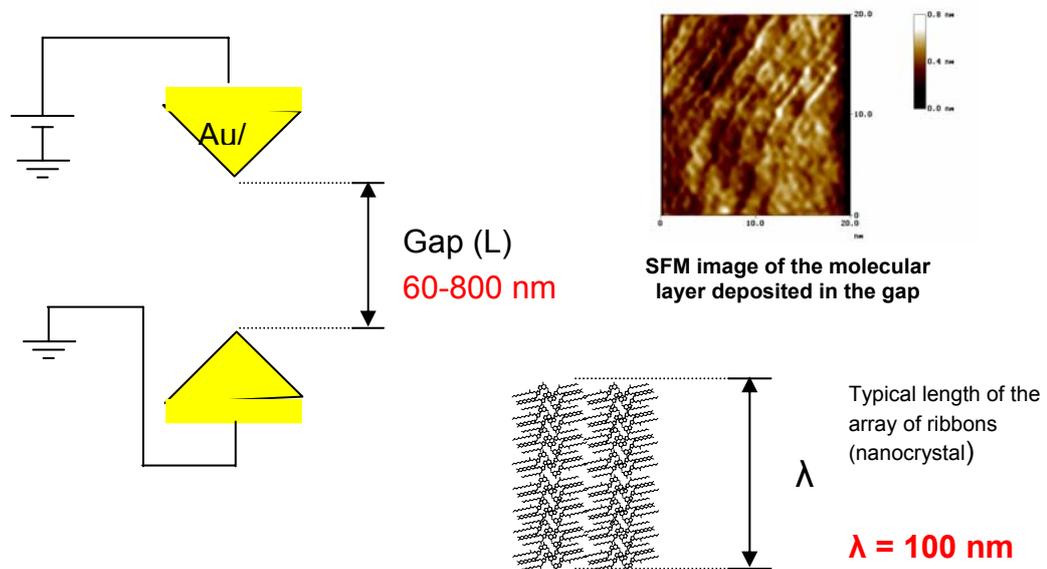


Figura 4.23

E' stata quindi registrata l'intensità di corrente al variare del potenziale applicato. L'intero test è stato eseguito sotto vuoto e in un range di potenziale di $\pm 10\text{V}$. Per assicurare la riproducibilità dei dati le misure sono state eseguite più volte anche a distanza di giorni e mesi. In tutti gli esperimenti si sono ottenuti gli stessi risultati. In figura 4.24 sono riportate le curve voltaggio-corrente al variare della distanza tra gli elettrodi. Per una distanza tra gli elettrodi $\leq 60 \text{ nm}$, in cui viene indagato un solo nanocrystallo, il dispositivo elettronico ibrido si comporta da diodo, con una intensità di corrente dell'ordine di μA per valori positivi e di nA per valori negativi.

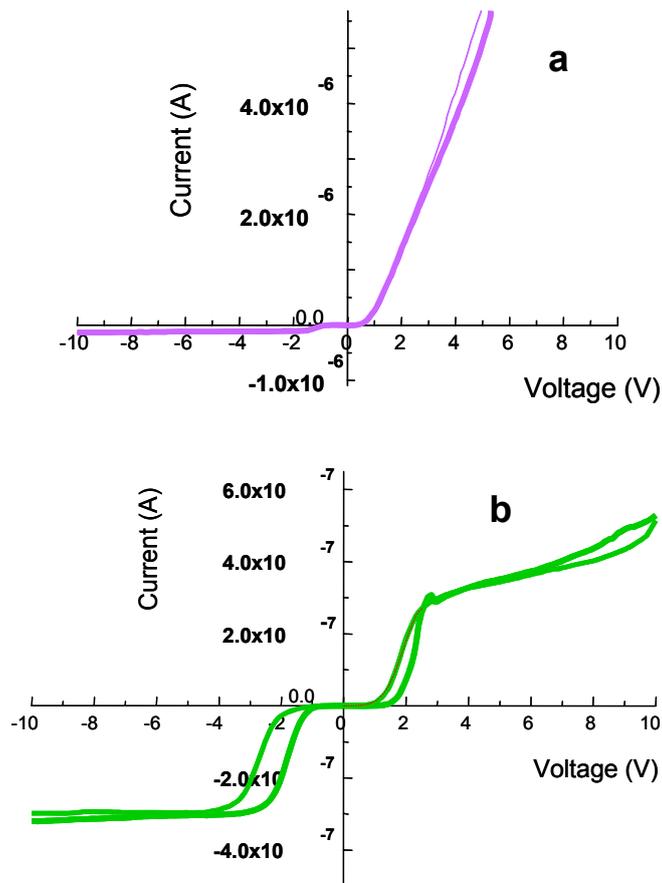


Figura 4.24 Grafico voltaggio-corrente per dispositivi con una distanza di (a) 60 nm e (b) 120 nm

La curva asimmetrica relativa al grafico voltaggio-corrente nei dispositivi dove viene esaminato un singolo nanocristallo, potrebbe essere dovuta all'esistenza di un forte dipolo in ogni nanocristallo (figura 4.25). Il dipolo presente è responsabile della conduzione di corrente tra gli elettrodi del dispositivo. L'intensità di corrente dipende dalla orientazione statistica dei nanocristalli, in cui l'allineamento del momento di dipolo del nanocristallo con l'asse degli elettrodi gioca un ruolo cruciale. Il dispositivo nel quale i nastri sono perfettamente paralleli all'asse degli elettrodi ha mostrato la rettificazione massima. Con l'aumento dell'angolo tra i nastri e l'asse degli elettrodi il valore di rettificazione decresce più del 50%. Inoltre, se il momento di dipolo risultante e l'asse degli elettrodi risultano perpendicolari tra loro le

proprietà elettriche scompaiono. Questa è la spiegazione del perché le misurazioni non sono sempre riproducibili. Il fattore limitante risulta quindi essere il processo di evaporazione del solvente in cui i nastri di guanosina possono assumere orientazioni differenti e solo quelle parallele all'asse degli elettrodi mostrano proprietà elettriche interessanti.

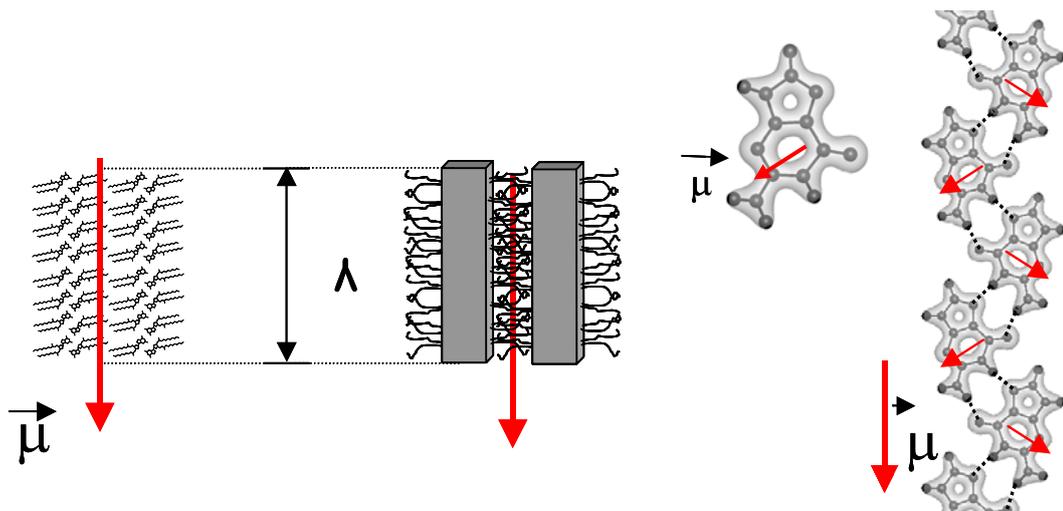


Figura 4.25

La situazione cambia in maniera significativa nel dispositivo in cui la distanza tra gli elettrodi è di 120 nm. La curva voltaggio-corrente riportata in figura 4.24 è simmetrica e non lineare con una intensità di corrente pari a zero per valori compresi tra -2V e +2V. Quando tra i due elettrodi sono presenti nanocristalli che hanno un'orientazione casuale, il momento di dipolo risultante tende a zero, quindi il trasporto di carica è governato solo dal processo di tunneling e di hopping che avviene tra nanocristalli adiacenti. La forma della curva voltaggio-corrente in questo caso è assimilabile al comportamento di un dispositivo metallo-semiconduttore-metallo. Sulla base di questi primi incoraggianti risultati è stato inoltre costruito un prototipo di transistor attraverso la litografia a sonda elettronica costituito da

due elettrodi Cr/Au (6 nm / 35 nm), di distanza variabile tra 20-100 nm, ancorati su substrato di Si/SiO₂ ed un terzo elettrodo di Ag posto dietro al substrato per simulare un transistor ad effetto di campo (FET)²⁹. Tra i due elettrodi è stata poi depositata per drop-casting una soluzione organica di dG(C₁₀)₂. Variando il potenziale applicato all'elettrodo posto dietro al substrato si è misurata la variazione di corrente in funzione del potenziale misurato tra i due elettrodi planari. Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura e pressione ambiente. In figura 4.26 sono riportate le curve voltaggio-corrente, all'aumentare del voltaggio applicato al terzo elettrodo, per il dispositivo in cui la distanza tra gli elettrodi è di 40 nm.

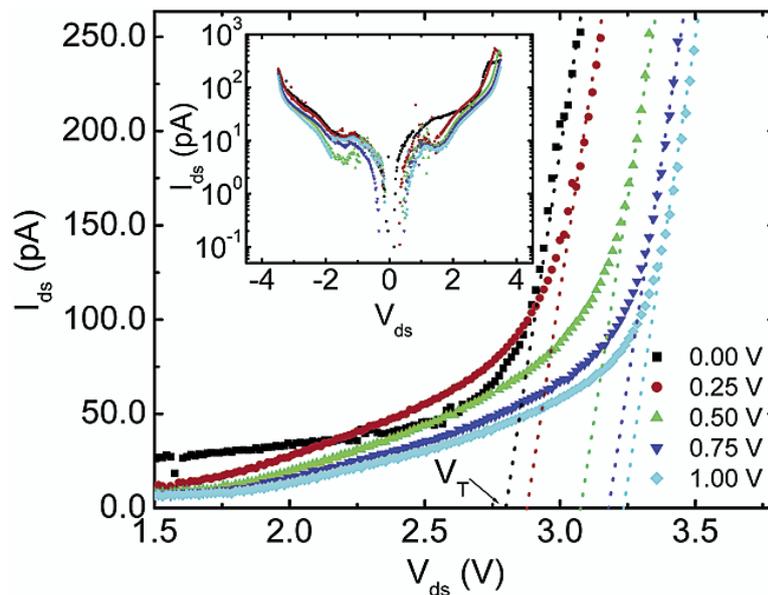


Figura 4.26

Come si può vedere l'andamento delle curve è asimmetrico: esiste una direzione preferenziale per il flusso di corrente. Simultaneamente è stata misurata la corrente tra gli elettrodi planari e l'elettrodo posto dietro il substrato. In un range compreso tra 1.5V e 3V le curve I-V sono piuttosto

lineari ad indicare un comportamento da isolante, per valori oltre i 3V la corrente cresce esponenzialmente ad indicare invece un comportamento più simile ad un transistor.

In conclusione, una tra le caratteristiche più affascinanti di questi derivati lipofili di guanosina è la loro possibilità di crescere, in particolari condizioni, in strutture a nastro ordinate, le quali possono essere utilizzate per costruire dei dispositivi molecolari ibridi , di dimensioni assai piccole, che esibiscono un'alta conduttività e rettificazione.

CAPITOLO 5 – AUTOASSEMBLAGGIO DI DERIVATI LIPOFILI DI 8-OXOGUANOSINA E 8-OXOINOSINA

5.1 Introduzione

I derivati lipofili della 8-oxoguanosina sono dei modelli analoghi alle 8-oxoguanine, specie che si formano durante l'ossidazione del DNA. Le 8-oxoguanine possiedono un potenziale di ossidazione (E_{ox}) più basso rispetto alle guanine, le quali a loro volta, tra le basi del DNA, sono quelle con il potenziale di ossidazione più basso. L'interesse verso i derivati della 8-oxoguanosina deriva dal fatto che un valore di E_{ox} basso potrebbe tradursi in un incremento delle proprietà conduttive rispetto alle architetture supramolecolari formate dalla guanosina.

5.2 Derivati lipofili di 8-oxoguanosina

Sono stati sintetizzati due derivati lipofili della 8-oxoguanosina, riportati in figura 5.1, e attraverso tecniche differenti sono state studiate le diverse proprietà di autoassemblaggio³⁰.

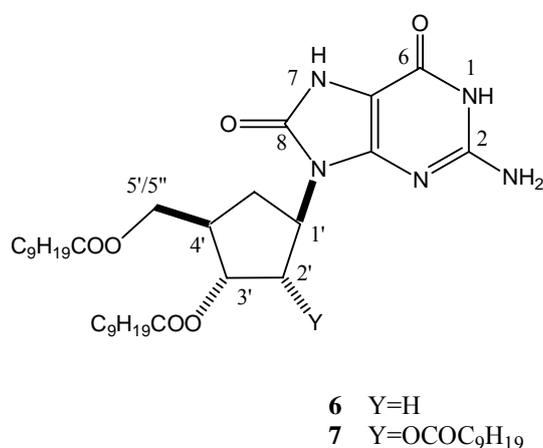


Figura 5.1

Mentre gli studi di diffrazione dei raggi X e la microscopia ottica hanno permesso di evidenziare il comportamento dei derivati **6** e **7** in fase liquido-cristallina, l’NMR e il Dicroismo Circolare sono stati impiegati per studiarne il comportamento in soluzione. L’utilizzo della microscopia a scansione di tunnel (STM) è servita invece per studiarne il comportamento all’interfaccia solido/liquido.

5.2.1 Fasi liquido-cristalline

I composti **6** e **7** hanno generato fasi liquido-cristalline liotropiche. Queste ultime sono comunque differenti da quelle riportate per i derivati non sostituiti in **8**. La microscopia ottica ha rivelato la presenza di due mesofasi birfrangenti la cui tessitura dipende dalla concentrazione dei composti nella fase liquido-cristallina. In figura 5.2 vengono riportate le immagini delle tessiture ottenute per il composto **7**.

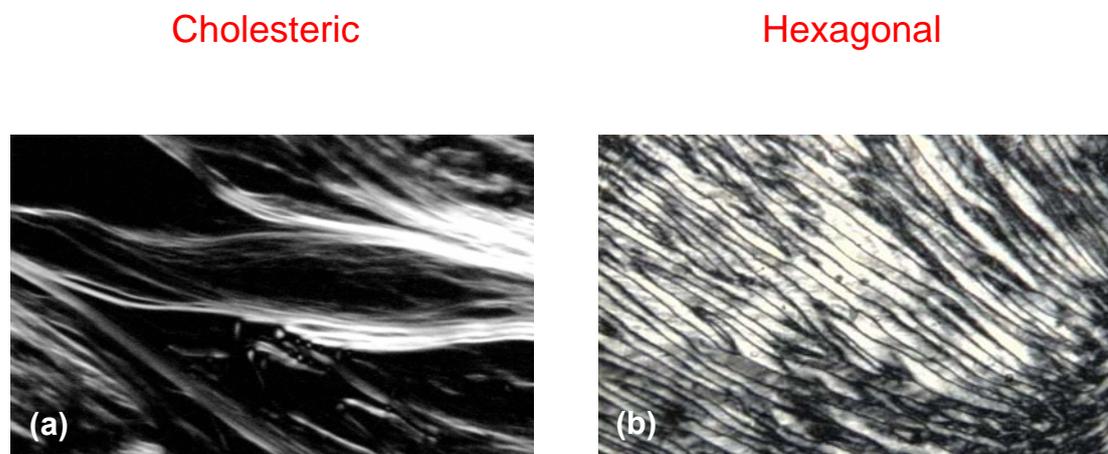


Figura 5.2 *Tessiture osservate al microscopio ottico in eptano. a) $c=8\%$ p/p b) $c=15\%$ p/p (ingrandimento 250x)*

Le analisi con i raggi X a basso angolo sono state eseguite in funzione della concentrazione di **6** e **7** in esano. I risultati ottenuti per i due composti sono

sovrapponibili pertanto in figura 5.3 vengono riportati solo gli esperimenti eseguiti per il derivato 7.

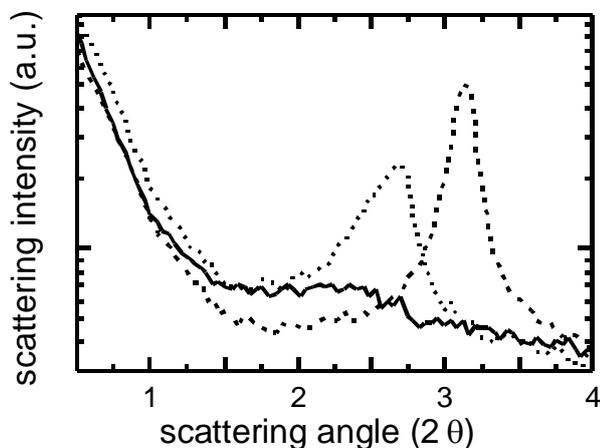


Figura 5.3 Profili ottenuti con i raggi X a basso angolo in esano a $c=3\%$ (linea continua), 10% (linea punteggiata) e 20% (linea tratteggiata)

In figura 5.4 viene invece riportato il profilo di scattering completo ottenuto per il composto 7 alla concentrazione più alta.

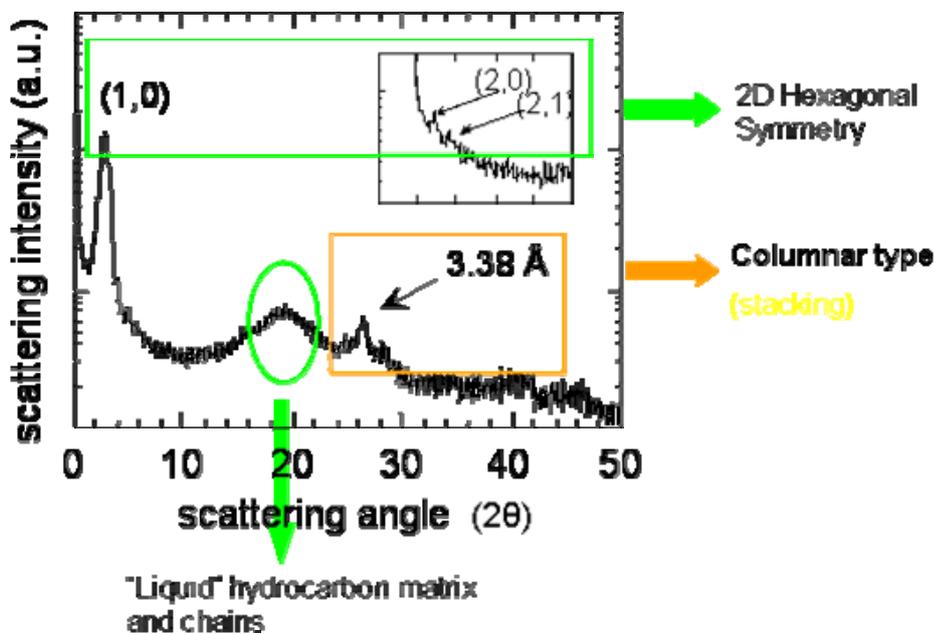


Figura 5.4 Diffrazione dei raggi X in esano a $c=20\%$ p/p

I risultati sono stati interpretati considerando le regioni di diffrazione a basso ed alto angolo in modo separato. Per concentrazioni del composto **7** comprese tra 3 e 12%, in corrispondenza della regione a più basso angolo è stata osservata una banda larga. La posizione, la larghezza e l'intensità di questa banda cambia con la concentrazione, indicando che la progressiva evaporazione del solvente determina una continua diminuzione della distanza tra gli elementi strutturali della fase ed un incremento dell'ordine a lungo raggio del campione. Questo risultato suggerisce la presenza di una fase liquido-cristallina di natura nematica o colesterica scarsamente ordinata.

Nella regione a più alto angolo, che fornisce informazioni sull'arrangiamento a corto raggio all'interno degli elementi strutturali, invece non si osserva nessun picco. Per concentrazioni superiori al 12%, nel profilo di diffrazione dei raggi x compaiono una serie di picchi. In particolare, nella regione a basso angolo è presente un forte picco, la cui posizione dipende dalla concentrazione del solvente. Utilizzando un tempo di esposizione più lungo si possono identificare picchi di ordine più alto; in ultimo sono stati osservati due ulteriori picchi che avvalorano l'ipotesi di una simmetria reticolare^{31,32}. Le spaziature reciproche dei picchi sono, infatti, in rapporto $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$, e questo sta ad indicare un impaccamento esagonale degli elementi strutturali. Nella regione ad alto angolo è stato osservato un picco caratteristico centrato a circa 3.4 Å. La presenza di questo picco, perfettamente in accordo coi precedenti studi^{33,34}, indica una natura colonnare discotica della mesofase, caratterizzata dallo stacking regolare delle 8-oxoguanosine, probabilmente legate attraverso legami ad idrogeno in quartetti alla tipica distanza di 3.4 Å. Perciò, la fase liquido-cristallina ordinata possiede una struttura colonnare esagonale, con gli elementi colonnari allungati (bastoncini) e paralleli formati da guanosine impilate. Questi bastoncini sono inseriti in una matrice idrocarburica formata dal solvente (esano) e dalle catene alifatiche, che sono responsabili della banda di scattering larga osservata a circa 4.4 Å.

5.2.2 Autoassemblaggio in soluzione

I composti 8-oxoderivati mostrano per concentrazioni comprese tra 10^{-4} e 10^{-2} mol L⁻¹ e temperature comprese tra 10 e 45 °C dei segnali NMR in cloroformio molto allargati. Questi da soli non forniscono delle informazioni dettagliate sulla composizione in soluzione, ma se incrociati coi segnali NMR ottenuti dallo spettro in DMSO è possibile ricavare qualche informazione utile. Nello spettro in DMSO i segnali dei protoni amidici H(1) e H(7) sono parzialmente sovrapposti a circa 10.8 ppm, mentre i protoni amminici esociclici H(2) sono a circa 6.5 ppm. Nello spettro in CDCl₃ invece i protoni dell'ammino gruppo si spostano a campi più alti di circa 1.2 ppm, mentre i segnali dei protoni amidici si allargano e si spostano verso campi più bassi a circa 11.2 ppm, come mostrato in figura 5.5.

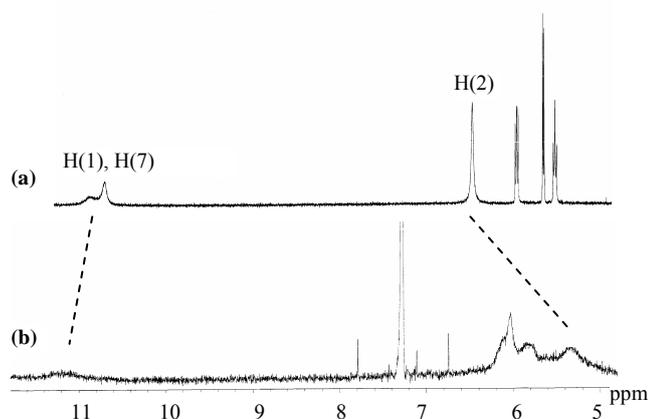


Figura 5.5 Spettri NMR a temperatura ambiente del composto **7** in (a) DMSO-*d*₆ e (b) in CDCl₃

Questi dati sembrerebbero indicare che i protoni amminici, contrariamente a quelli amidici, non sono coinvolti in legami ad idrogeno. In aggiunta lo

spostamento dei protoni dell'amminogruppo verso campi più alti suggerisce la presenza di una struttura supramolecolare impacchettata.

Gli spettri ottenuti analizzando il derivato **7** con il Dicroismo Circolare, in differenti condizioni sperimentali, sono riportati in figura 5.6.

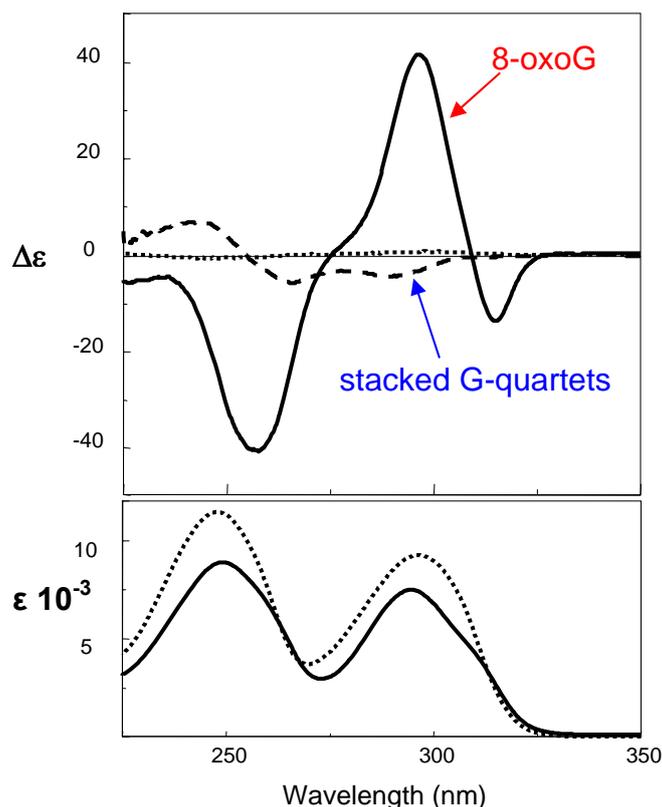


Figura 5.6 Spettri CD e UV in metanolo (linea punteggiata) e in esano (linea continua) di **7** a $c=0.5$ mM. Per confronto, è riportato lo spettro CD dell'aggregato colonnare di $dG(C_{10})_2$ in $CHCl_3$ in presenza di K^+ (linea tratteggiata).

Mentre lo spettro CD in metanolo è molto debole, le bande in cloroformio (non riportate) sono più intense. In esano, al di sotto della concentrazione critica per avere la prima mesofase, lo spettro CD è incredibilmente differente, caratterizzato da bande molto intense. Lo spettro non cambia per concentrazioni comprese tra 0.05 e 5 mM, ciò dimostra che la popolazione

della specie chirale assemblata è indipendente dalla concentrazione. A concentrazioni superiori alla concentrazione critica, l'intensità del segnale aumenta e tutte le bande sono monosegnate, un comportamento tipico per le fasi colesteriche. Anche se le transizioni elettroniche permesse della 8-oxoguanosina non sono conosciute, da questi spettri CD è possibile ricavare comunque delle informazioni utili: (i) L'intensità in esano (ma anche in cloroformio) è compatibile con una struttura altamente chirale. (ii) L'intensità non cambia con la concentrazione o temperatura, indicando una forte stabilità dell'architettura³⁵. (iii) Il fattore-g (il rapporto tra il segnale CD e l'intensità di assorbimento) per il composto **7** è più grande rispetto a quello delle strutture chirali colonnari dei derivati di guanosina basate su G-quartetti impilati. D'altro canto, le strutture a nastro di guanosina mostrano un CD poco intenso. La struttura chirale identificata per il derivato 8-oxo non sembra essere composta di 8-oxo-G-quartetti impilati, visto che lo spettro CD non è simile a quello dei G-quartetti impilati.

A differenza dei derivati della guanosina, negli 8-oxo derivati sono presenti due gruppi amidici (figura 5.7), i quali possono dare origine alla formazione di forti legami ad idrogeno amide-amide. In particolare, le interazioni amide-amide possono essere di due tipi: una che vede coinvolti in legami ad idrogeno gli anelli a sei termini con gli anelli a sei termini e gli anelli a cinque termini con gli anelli a cinque termini dando così origine a delle strutture a nastro (figura 5.7b), l'altra in cui gli anelli a sei termini si legano agli anelli a cinque termini, dando origine a delle strutture a quartetto (figura 5.7c) o ad un elica continua (figura 5.7d). I nostri dati suggeriscono che l'elica continua è la struttura supramolecolare preferibilmente adottata dai composti **6** e **7**. In supporto a questa ipotesi, i quartetti dei derivati della 8-bromoguanosina e della 8-metilthioguanosina da noi studiati, così come i derivati 8-sostituiti studiati da Sessler³⁶, non formano nessuna struttura di tipo colonnare senza l'aggiunta di ioni. Pertanto per i composti **6** e **7** è molto difficile pensare alla

formazione di una struttura a G-quartetti impilati (figura 5.7c) senza la presenza di cationi metallici.

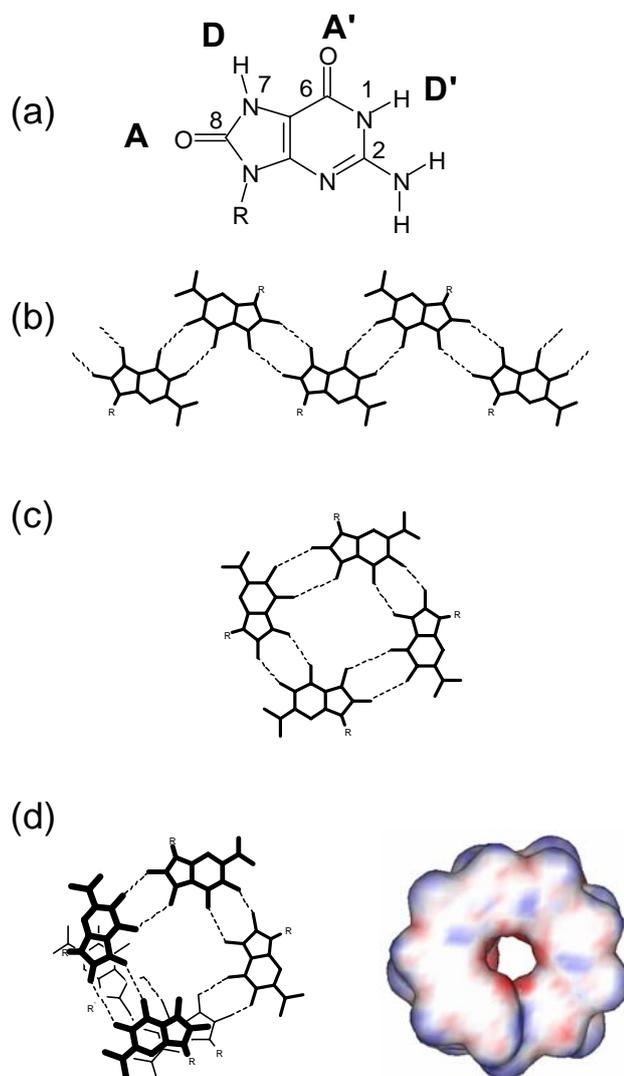


Figura 5.7 I gruppi amidici donatori/accettori nei derivati di 8-oxoguanosina (a); struttura tipo nastro (b); struttura a 8-oxo-G-quartetti (c); struttura ad elica continua (d)

5.2.3 Autoassemblaggio su superficie

La figura 5.8 mostra un'immagine STM del derivato **6** all'interfaccia soluzione-grafite. Essa rivela una disposizione di quartetti che sono impaccati secondo una cella unitaria di $a = (3.8 \pm 0.2)$ nm, $b = (3.4 \pm 0.2)$ nm, $\alpha = (59 \pm 3)^\circ$. Questi dati sono in accordo con una geometria di tipo esagonale³⁶. Le regioni più luminose, in cui si ha il maggior effetto di tunneling, possono essere assegnate agli anelli aromatici della guanina, poiché la differenza di energia tra l'HOMO delle basi e il livello-Fermi della grafite è più basso rispetto a quella dello zucchero e delle catene alifatiche³⁷. Il quartetto visualizzato potrebbe quindi rappresentare una sezione dell'elica supramolecolare.

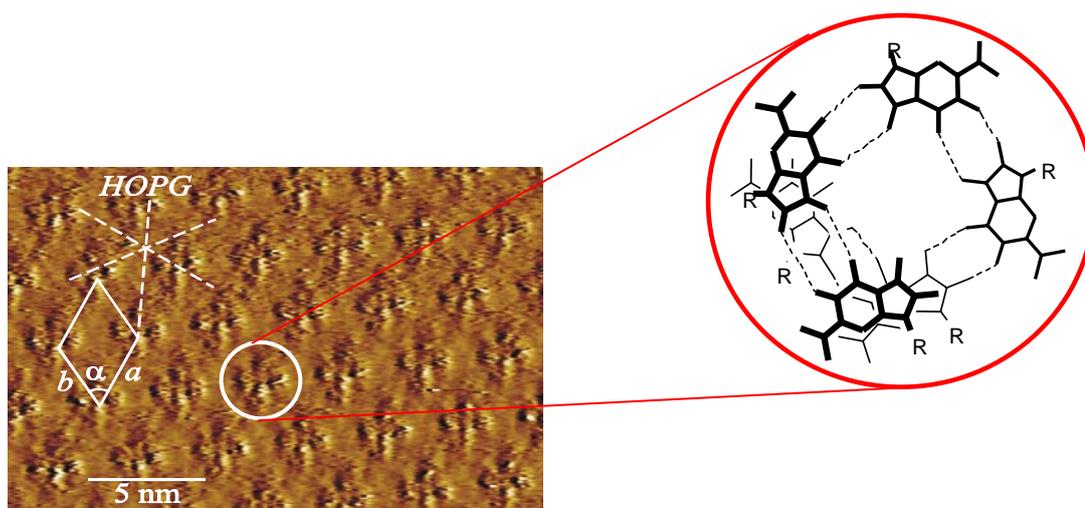


Figura 5.8

5.2.4 Lo studio delle proprietà elettroniche

L'arrangiamento in un'architettura ad elica è interessante anche per la sua potenziale capacità di rettificare la corrente, questo farebbe degli 8-oxo derivati dei possibili candidati per la fabbricazione di nanodispositivi bioelettronici e nanocircuiti ²⁷. Questi dispositivi elettronici ibridi sono stati fabbricati nello stesso modo in cui sono stati fabbricati quelli utilizzati per lo studio dei derivati della guanosina (capitolo 4). Pertanto, è stata depositata una goccia di 8-oxodG(C₁₀)₂, sciolta in cloroformio (c = 3 mM), tra due elettrodi d'oro ancorati su substrato di SiO₂. I dispositivi ibridi, con una distanza tra gli elettrodi di 60 e 120 nm, sono stati testati a temperatura ambiente. Le curve *I-V* per entrambi i dispositivi sono riportate in figura 5.9.

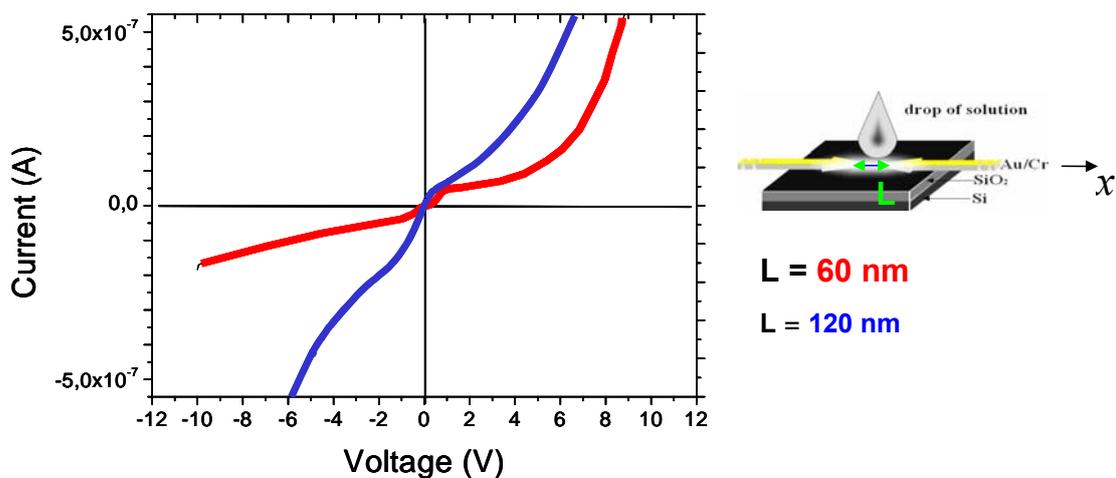


Figura 5.9 Curve *I-V* dei dispositivi con gap di 60 nm (linea rossa) e 120 nm (linea blu)

Nel caso del dispositivo con un gap di 60 nm, le curve *I-V* sono caratteristiche per un rettificatore di corrente, con una intensità di corrente di due ordini di grandezza più bassa rispetto a quella registrata per i dispositivi basati sui derivati della guanosina. Per quanto riguarda il dispositivo con gap di 120 nm

le curve $I-V$ evidenziano una sensibile riduzione della regione a corrente-zero con una resistenza di circa $8 \times 10^6 \Omega$. L'interpretazione della discrepanza tra i risultati sperimentali e l'ipotesi di partenza è stata fatta considerando che, in questo modello, le proprietà di rettificazione sono dovute sia al momento di dipolo intrinseco che fornisce un grado di polarità al dispositivo sia all'allineamento della struttura supramolecolare rispetto all'asse degli elettrodi. L'autoassemblaggio in una elica continua porta ad una parziale perdita dei momenti di dipolo intrinseci alla molecola, così che il dipolo risultante può essere considerato trascurabile, come illustrato dalle frecce rosse in figura 5.10.

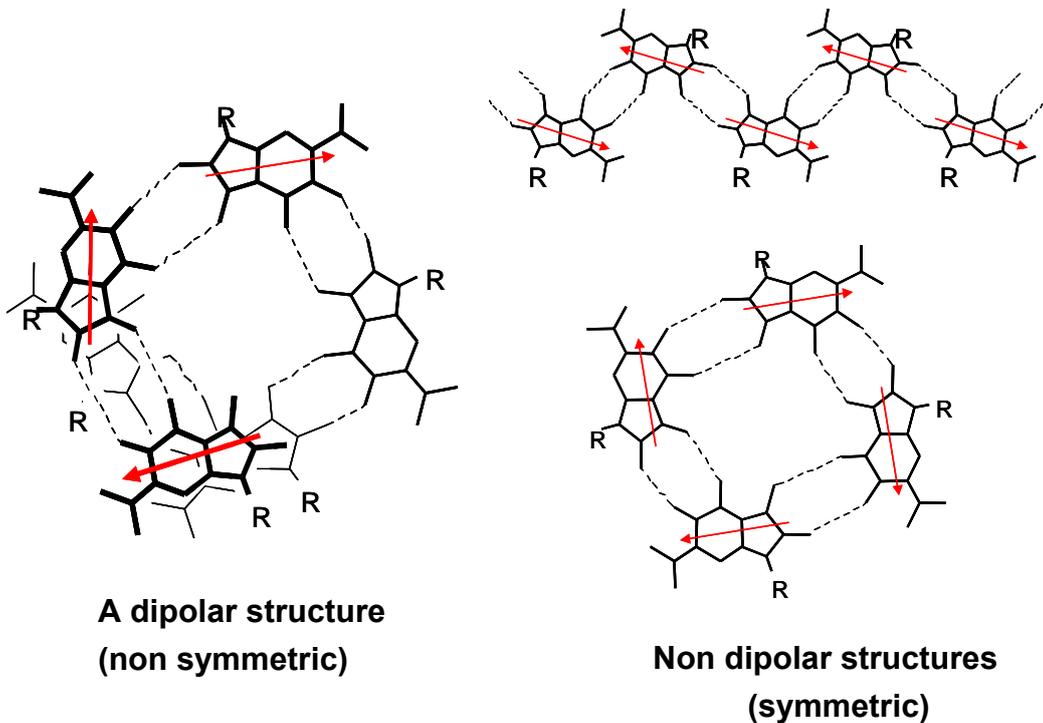


Figura 5.10

5.3 I derivati della 8-oxoinosina

Per dimostrare la corretta assegnazione della struttura supramolecolare ad elica continua delle 8-oxoguanosine, in cui l'ammino gruppo esociclico non partecipa alla formazione di legami ad idrogeno, sono stati sintetizzati e caratterizzati due derivati della 8-oxoinosina³⁸ (figura 5.11), un'analogo strutturale della 8-oxoguanosina in cui manca l'ammino gruppo esociclico.

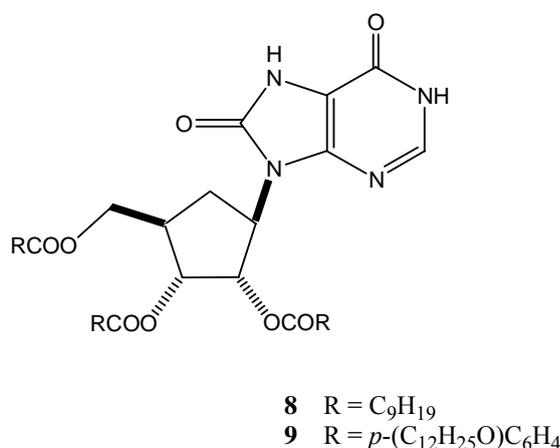


Figura 5.11

Di seguito verrà descritto l'autoassemblaggio dei derivati lipofilici della 8-oxoinosina e la fase liquido-cristallina formata dal derivato **9** nei solventi idrocarburici. Da notare che, mentre il derivato **9** che presenta dei sostituenti ingombranti sullo zucchero, si autoassembla formando delle mesofasi, il derivato **8**, che presenta dei gruppi decanoili sullo zucchero, non lo fa. Questo potrebbe essere attribuito alle ridotte proprietà amfifiliche di quest'ultimo. In figura 5.12 vengono riportate le possibili strutture supramolecolari formate dai derivati della 8-oxoinosina.

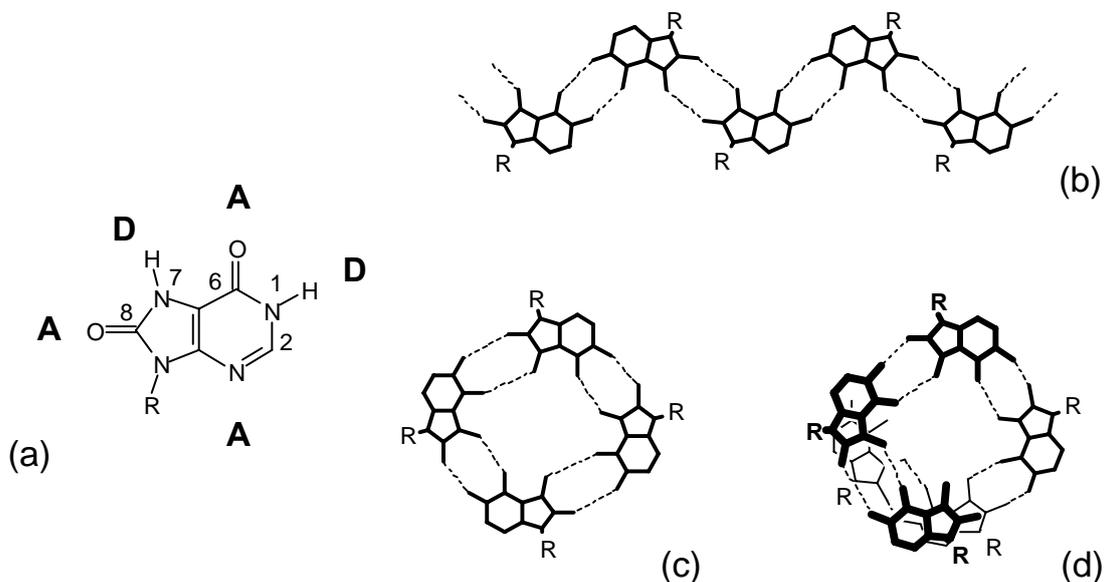


figura 5.12 *Gruppi accettori/donatori (a) e tre possibili architetture supramolecolari: nastro (b), quartetto (c), elica continua (d)*

5.3.1 Sintesi e autoassemblaggio dei derivati della 8-oxoinosina

Sono stati sintetizzati i derivati **8** e **9** secondo lo schema riportato in figura 5.13. L'adenosina commerciale è stata bromurata in posizione-8 con bromo in una soluzione tampone di sodio acetato. La risultante 8-bromoadenosina è stata diazotata con NaNO_2 in acido acetico a temperatura ambiente e il sale di diazonio poi idrolizzato in situ per dare la 8-bromoinosina. Questa è stata convertita in triacetil 8-oxoinosina per sostituzione del bromo con acetato in acido acetico/anidride acetica a 160°C e successiva idrolisi dell'enol-estere. Per transesterificazione con metossido di sodio in metanolo a 50°C si è ottenuta la 8-oxoinosina. In seguito questo composto è stato esterificato con l'anidride o il cloruro arilico corrispondente in acetonitrile a temperatura ambiente per fornire rispettivamente i composti **8** e **9**.

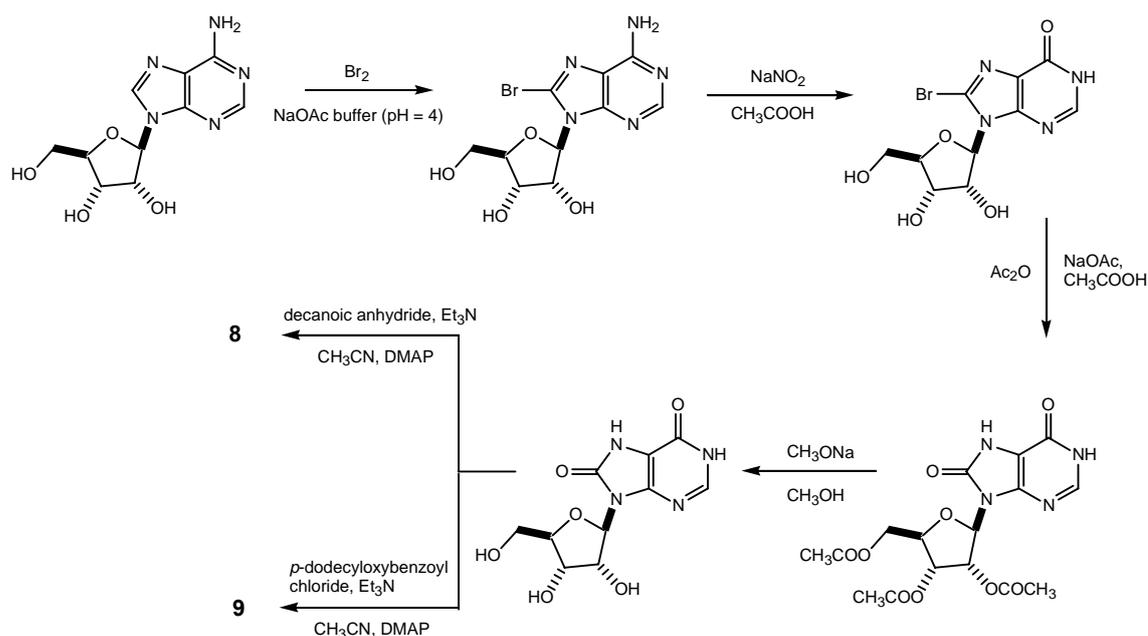


Figura 5.13

Soluzioni del composto **8** in cloroformio e in esano, non mostrano nessuna fase liquido-cristallina birfrangente per concentrazioni inferiori al 80% *p/p*. Inoltre, negli stessi solventi, gli spettri di dicroismo circolare, riportati in figura 5.14, mostrano dei segnali molto deboli corrispondenti al cromoforo della 8-oxoinosina. La forma e l'intensità degli spettri CD suggeriscono l'assenza di un ordine di tipo elicoidale nella struttura supramolecolare. In ultimo, lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 è molto simile a quello in DMSO (solvente che compete per la formazione di legami ad idrogeno); questo per dire che non c'è nessuno spostamento significativo dei chemical shift dei segnali e nessun allargamento di banda con il cambio del solvente.

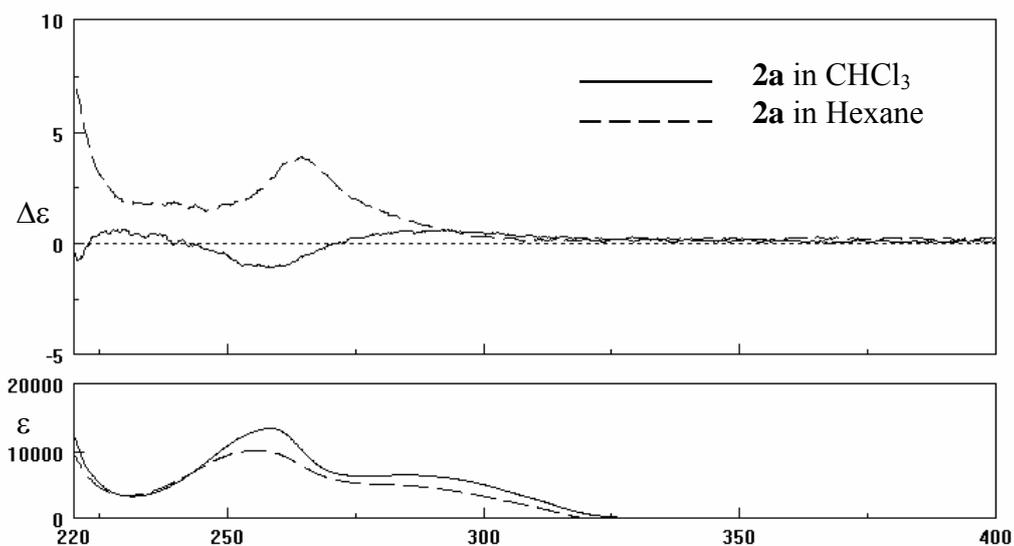


Figura 5.14

Questo comportamento potrebbe essere attribuito ad effetti di tipo solvofobico. Il liomesoformismo richiede che le molecole siano amfifiliche: nelle specie autoassemblate, la parte liofilica della molecola è esposta al solvente, mentre la parte liofobica non è in contatto con questo. L'assenza del gruppo amminico nel derivato **8** diminuisce il carattere liofobico della base aromatica, riducendo così le proprietà amfifiliche della molecola e la sua propensione a formare strutture supramolecolari grandi e di conseguenza le mesofasi liotropiche. Al fine di aumentare l'amfifilicità dei derivati della 8-oxoinosina, e quindi aumentare la propria capacità di autoassemblare, è stato preparato il composto **9**. In questo derivato, sono state introdotte tre code lipofile recanti dei gruppi aromatici e delle catene alchiliche lunghe. Questa modifica strutturale dovrebbe aumentare la differenza in liofilicità tra il core (la base 8-oxoipoxantina) ed il resto della molecola. Inoltre anche le interazioni tra i gruppi aromatici dovrebbero stabilizzare un possibile aggregato. Infatti, è stato recentemente riportato che le catene aromatiche aumentano in modo considerevole la stabilità dei foldameri in doppia elica. Il composto **9** ha dimostrato infatti di possedere proprietà liquido-cristalline liotropiche nei

solventi idrocarburici. La microscopia ottica ha rivelato la presenza di una mesofase birifrangente a $c > 2.3\%$ e $> 3.5\%$ in esadecano e in eptano rispettivamente (figura 5.15).



Figura 5.15 *Immagine ottenuta al microscopio ottico in luce polarizzata di una soluzione al 10% (p/p) in esadecano (ingrandimento 100x)*

Esperimenti di diffrazione ai raggi X hanno confermato la presenza di un ordine liquido-cristallino. Per concentrazioni superiori al 15%, sono stati osservati una serie di picchi di diffrazione, come mostrato in figura 5.16, la cui posizione conferma la natura liquido-cristallina del campione. La regione di diffrazione dei raggi X a basso angolo è dominata da un picco intenso, la cui posizione dipende dalla concentrazione del solvente, mentre picchi di diffrazione con un ordine più alto possono essere osservati solo con tempi di esposizione più lunghi. In condizioni ottimali, sono stati individuati due o tre picchi ulteriori che hanno permesso l'assegnazione della simmetria. Le spaziature reciproche dei vari picchi sono in rapporto $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}:\sqrt{9}$, che sta ad indicare un impacchettamento di tipo esagonale degli elementi strutturali.

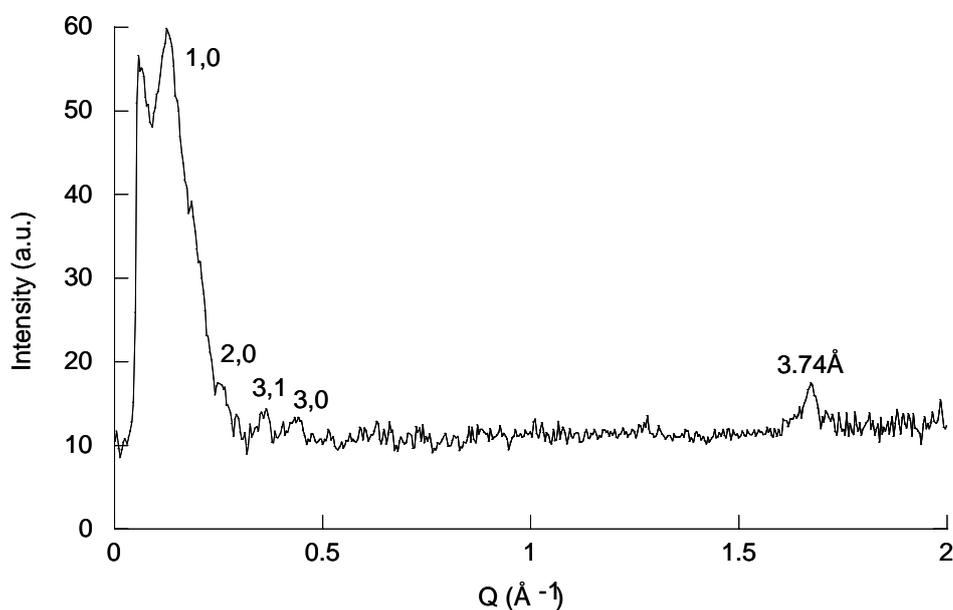


Figura 5.16 *Profilo di diffrazione dei raggi X ottenuto per una soluzione del composto 9 in eptano a $c = 30\%$ p/p*

Nella regione ad alto angolo, è stato osservato un picco caratteristico centrato a circa 3.74 \AA , la cui posizione è indipendente dalla concentrazione. La presenza di questo picco indica la natura colonnare degli aggregati del composto **9** ed è in accordo con l'ipotesi di arrangiamento delle basi impilate in una struttura ad elica come osservato per le 8-oxoguanosine³⁰. Assumendo che la distanza di impilamento tra i residui di 8-oxoinosina sia il valore standard di 3.4 \AA , il valore di 3.74 \AA trovato, suggerisce che l'angolo formato dalle basi in relazione al piano perpendicolare dell'asse colonnare sia di circa 23° . Come per il derivato della 8-oxoguanosina, la regione ad alto angolo è caratterizzata inoltre dalla presenza di una larga banda a $Q = 1.4 \text{ \AA}^{-1}$, che è correlata alla conformazione disordinata dei sostituenti lipofili nella regione idrocarburica. Due punti vengono di seguito presi in considerazione: primo, la dipendenza della distanza inter-elica nella composizione del campione, e

secondo, la ricostruzione della mappa di distribuzione della densità elettronica. La figura 5.17 mostra la dipendenza dalla concentrazione della dimensione della cella unitaria, misurata per la fase esagonale.

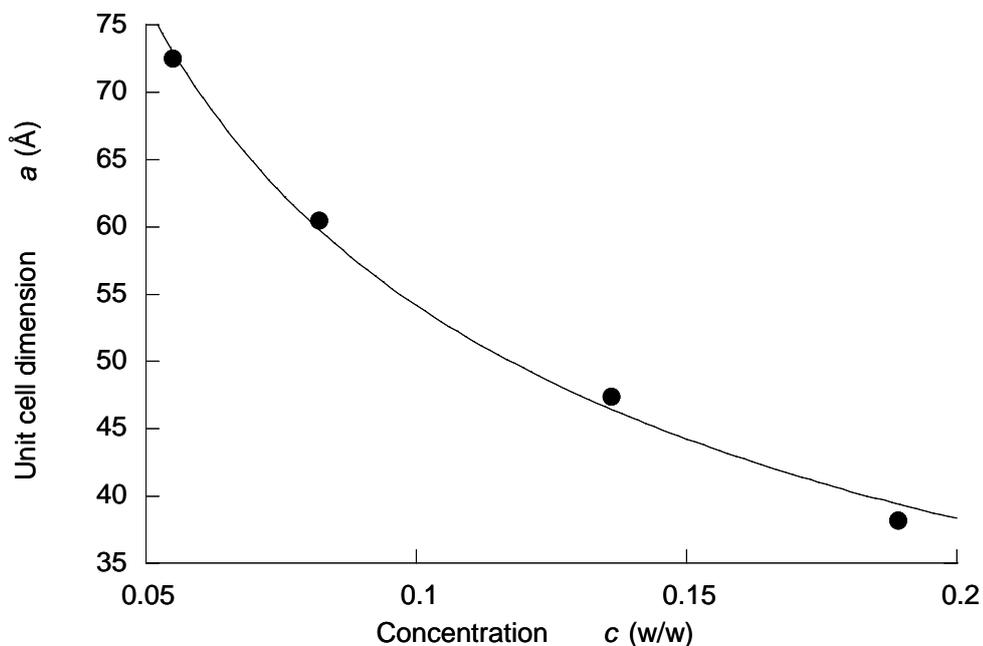


figura 5.17

E' interessante notare che la dipendenza della concentrazione dalle dimensioni dell'unità di cella è $c_{v,G}^{-1/2}$ e che l'andamento a iperbole è ben descritto da un modello che prevede elementi a forma di bastoncino di lunghezza infinita che si allontanano l'uno dall'altro mano a mano che si diluisce³⁰. Attraverso un'equazione matematica, è stato ricavato il raggio della sezione dell'elica della 8-oxoinosina che misura circa 9 Å. La mappa di distribuzione della densità elettronica per il derivato **9** viene riportata in figura 5.18. Comparandola con quella ottenuta per il derivato della 8-oxoguanosina³⁰ anche se si nota una risoluzione sperimentale più bassa, si può tuttavia

apprezzare una certa similitudine nella forma e nella dimensione delle due eliche.

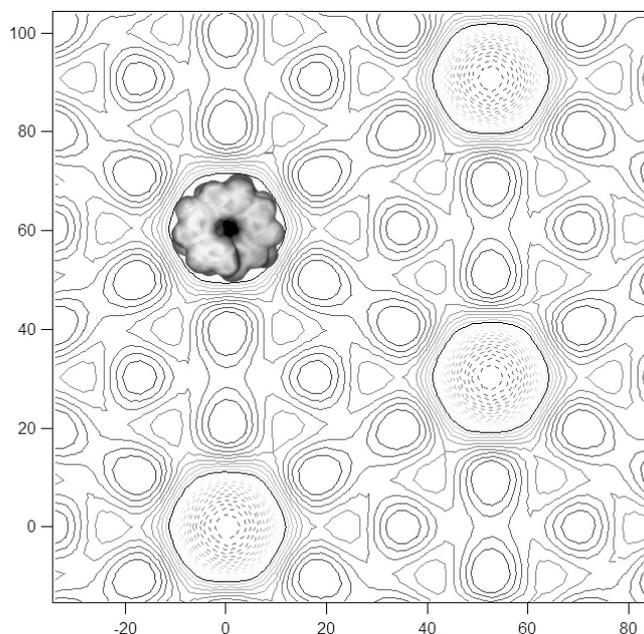


Figura 5.18 *Mapa di distribuzione della densità elettronica per la mesofase formata dal composto 9 ($c = 0.3$). Le dimensioni degli assi sono in Å*

Per ottenere delle informazioni sulla struttura supramolecolare adottata dal composto 9 in soluzione, sono stati eseguiti degli esperimenti NMR comparativi in cloroformio e DMSO, quest'ultimo è un solvente estremamente competitivo nella formazione dei legami ad idrogeno. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO eseguito a temperatura ambiente mostra una singola serie di picchi, i cui chemical shift sono riportati in tabella 1. Ogni protone da origine ad un picco più o meno della stessa larghezza, eccetto i protoni NH(1) e NH(7) i quali sono circa sette volte più appiattiti. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in cloroformio alla stessa temperatura mostra anch'esso una singola serie di segnali, tuttavia questi sono significativamente più allargati: in particolare i segnali H(2), quelli

relativi ai protoni dello zucchero e ai protoni amminici sono fino a 40-50 volte più allargati e appiattiti.

Table 2. ¹H NMR (400 MHz) chemical shifts for a 13 mm solution of **2b** (25 °C). Assignments were made on the basis of COSY, NOESY, and ROESY spectra.

Solvent	NH(1)	NH(7)	H(2)	H(1')	H(2')	H(3')	H(4')	H(5'/5'') ^[a]	Ph protons
CDCl ₃	12.39	11.20	7.81	6.35	6.53	6.16	4.70	4.77, 4.67	8.07–7.84, 6.82
[D ₆]DMSO	12.68	11.59	7.92	6.07	6.30	6.04	4.65	4.59, 4.48	7.88–6.88

[a] Diastereotopic protons have not been assigned.

Tabella 1

In linea di principio, l'evidenza dell'aggregazione del composto **9** in cloroformio potrebbe essere ricavata semplicemente comparando i segnali dei cross-peak nei NOESY eseguiti in DMSO e cloroformio. Tuttavia, nel nostro caso, non è stato possibile poiché in entrambi i solventi i segnali dei cross-peak sono dello stesso segno della diagonale, data la sua massa molecolare elevata ($M_w = 1149.50$). Ciò nonostante una prova indiretta dell'aggregazione è stata ottenuta attraverso l'analisi degli spettri ROESY, i quali sono stati preferiti ai NOESY per la loro possibilità di distinguere tra un cross-peak generato da un'interazione attraverso lo spazio e uno generato da uno scambio chimico⁴⁰. In soluzione possono essere ipotizzati due modelli di autoassemblaggio: uno basato su legami ad idrogeno tra il gruppo amidico NH(7)-CO(8) di una molecola e il gruppo amidico NH(1)-CO(6) di un'altra molecola, l'altro basato su legami ad idrogeno tra i due gruppi amidici NH(7)-CO(8) di due molecole e tra i due gruppi amidici NH(1)-CO(6) di due molecole. Il primo modello porta ad un assemblato tipo G-quartetto o elica continua, il secondo modello porta invece un assemblato tipo nastro. Per dimostrare che l'arrangiamento supramolecolare ad elica, ipotizzato attraverso gli esperimenti di diffrazione dei raggi X, esiste anche in soluzione isotropica,

siamo partiti dalla considerazione che, in accordo con i modelli, un tale arrangiamento implica una distanza intermolecolare tra l'NH(7) di una molecola di inosina e l'H(2) di un'altra inosina, situata ad un livello differente nella struttura ad elica, più piccola della distanza intramolecolare che è di 5.9 Å. Pertanto, se fosse presente la struttura ad elica, si dovrebbe osservare un cross-peak ROESY tra l'NH(7) e l'H(2) in cloroformio e non in DMSO. Gli esperimenti ROESY eseguiti hanno segnalato l'effettiva presenza di questo cross-peak solo in cloroformio con un segno contrario a quello della diagonale, a dimostrazione della genuinità del segnale ROE. Questo dato, se preso da solo, non certifica l'esistenza in soluzione della super-elica, tuttavia esclude in modo definitivo la possibilità dell'esistenza di un aggregato tipo nastro in cloroformio. Possiamo quindi concludere che gli accoppiamenti NOE, citati sopra e riportati in figura 5.19, si generano per l'accoppiamento degli idrogeni appartenenti a molecole impaccate in una configurazione ad elica continua o a G-quartetto.

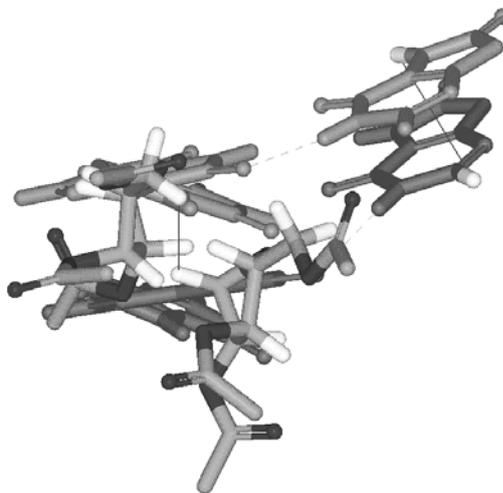


figura 5.19 *Rappresentazione molecolare di un frammento di elica supramolecolare del composto 9. Le linee rappresentano i contatti ROE tra H(1')-H(5'/5'') e H(2)-NH(7)*

L'autoassemblaggio del composto **9** è stato studiato anche attraverso il dicroismo circolare, i cui spettri in solventi differenti sono riportati in figura 5.20. Questo composto mostra una prima intensa banda di assorbimento intorno a 250-260 nm (con una gobba a 275nm) e una seconda banda intorno a 215 nm. In metanolo (in cui le strutture supramolecolari della guanosina sono generalmente assenti), lo spettro CD mostra un segnale debole per entrambe le lunghezze d'onda. Al contrario, lo spettro CD registrato in solventi idrocarburici mostra un segnale molto più forte nella regione intorno ai 230-280 nm e un segnale eccitonico bi-segnato molto intenso centrato a 215 nm. Questo spettro non cambia con la concentrazione in un range di 0.01-1 mM, indicando che la struttura della specie in soluzione è indipendente dalla concentrazione.

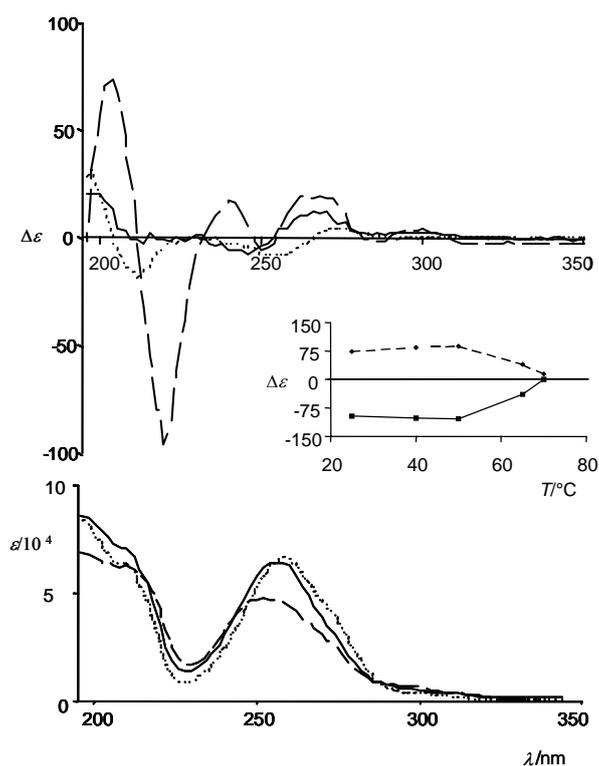


Figura 5.20 Spettri CD e assorbimento di una soluzione 1 mM del composto **9** in metanolo (25°C, linea punteggiata), in cicloesano a 25°C (linea tratteggiata) e a 70°C (linea continua). Nel riquadro: il profilo di melting in cicloesano a 203 nm (linea tratteggiata) e a 220 nm (linea continua)

Con l'aumento della temperatura, la forma dello spettro CD cambia drasticamente e a 70°C l'accoppiamento eccitonico a 215 nm è praticamente scomparso. Siccome gli assegnamenti delle transizioni elettroniche per il cromoforo della 8-oxoipoxantina non sono disponibili e, inoltre, nel composto **9** il cromoforo benzilico contribuisce al segnale CD, un'analisi dettagliata dello spettro non è possibile. Comunque, possono essere fatte alcune considerazioni importanti: 1) gli andamenti degli spettri in metanolo e cicloesano assomigliano a quelli registrati per gli 8-oxoG derivati³⁰; 2) l'intensità del segnale CD e il g-factor ($\Delta\epsilon/\epsilon$) in cicloesano sono compatibili solo ammettendo l'esistenza di una struttura altamente chirale, molto più che le strutture chirali formate dai G-quartetti impilati.

5.4 Conclusioni

Considerando che 1) i G-quartetti sono incapaci di impilarsi senza la presenza degli ioni metallici⁴¹, 2) il fattore di anisotropia, g, è molto più alto di quello visto per i G-quartetti impilati, 3) gli spettri ¹H-NMR mostrano un singolo set di segnali diversamente da quelli registrati per le strutture colonnari basate su G-quartetti impilati che mostrano set multipli¹⁷, è verosimile ipotizzare che la struttura supramolecolare adottata preferenzialmente dal derivato **9** della 8-oxoinosina sia quella ad elica continua e che l'amminogruppo esociclico non sia quindi indispensabile per la formazione di questa.

CAPITOLO 6 – AUTOASSEMBLAGGIO DI UN DERIVATO 5'-O-ALCHILATO DI GUANOSINA

6.1 Introduzione

In assenza di ioni metallici, le guanosine senza sostituenti al C(8) autoassemblano, sia in soluzione che allo stato solido, in strutture a nastro con una orientazione *anti* della base intorno al legame glicosidico. Queste strutture possiedono proprietà interessanti, tra le quali ricordiamo quelle di formare, in soluzione, delle mesofasi liotropiche nei comuni solventi organici. Allo stato solido i nastri, se depositati tra due elettrodi d'oro, hanno mostrato la capacità di condurre e rettificare la corrente e di comportarsi da veri e propri transistor ad effetto di campo.

Araki e Yoshikawa recentemente, introducendo dei gruppi alchil-sililici apolari e flessibili sulla 2'-desossiguanosina, hanno ottenuto degli efficienti organogelatori per alcani⁴². Da un'attenta analisi strutturale, hanno concluso che in questi gel la struttura base è un assemblato tipo foglietto: questa struttura supramolecolare, rappresentata in figura 6.1, è formata da nastri anti-paralleli di guanosina legati tra loro attraverso due legami ad idrogeno aggiuntivi tra l'NH(2) e l'N(3) di una guanosina presente su un nastro e quelli di una guanosina nel nastro adiacente. Dopo riscaldamento, si osserva una transizione di fase da gel a cristallo-liquido dovuta alla rottura di questi ponti ad idrogeno.

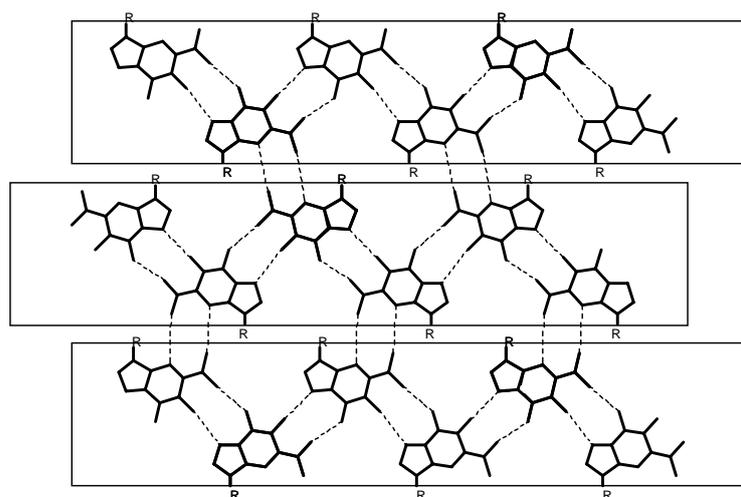


Figura 6.1

Negli studi fin qui effettuati, dal nostro gruppo di ricerca, sulla formazione di nanonastri di derivati di guanosina 5'-*O*-acilati, non è mai stata osservata questo tipo di architettura. E' stato, quindi, preparato il derivato **10** 5'-*O*-alchilato di guanosina (figura 6.2), privo del gruppo carbonilico che nei nastri formati dai derivati 5'-*O*-acilati è stato dimostrato interagire nella formazione dei nastri attraverso la formazione di un legame ad idrogeno intra-nastro con l'NH(2).

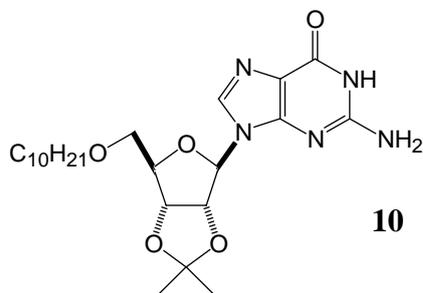


Figura 6.2

6.2 Autoassemblaggio in soluzione

Il comportamento supramolecolare del composto **10** è stato studiato attraverso la spettroscopia NMR⁴⁶. Gli spettri sono stati registrati a temperatura ambiente in CHCl₃ e una miscela CHCl₃/DMSO 1:3 in un range di concentrazioni compreso tra 8 x 10⁻³ e 7 x 10⁻² M. I chemical shift, riportati in tabella 2, sono stati assegnati sulla base di esperimenti 2D COSY e NOESY.

Table 1. ¹H NMR (400 MHz) chemical shifts (ppm) for solutions of **1** at RT. Assignments were made on the basis of COSY and NOESY spectra.

c (solvent)	NH(1)	H(8)	NH(2)	H(1')	H(2')	H(3')	H(4')	H(5'/5'') ^[a]	OCH ₂	isopropylidene CH ₃ ^[a]
8 × 10 ⁻³ M (CDCl ₃)	12.02	7.76	6.01	6.02	5.15	4.92	4.43	3.64– 3.57	3.43	1.62–1.39
3 × 10 ⁻² M (CDCl ₃)	12.02	7.76	6.25	6.02	5.18	4.92	4.42	3.62– 3.57	3.43	1.62–1.39
7 × 10 ⁻² M (CDCl ₃)	12.02	7.77	6.28	6.02	5.18	4.92	4.42	3.63– 3.57	3.43	1.62–1.39
5 × 10 ⁻² M ([D ₆]DMSO/ CDCl ₃)	10.64	7.73	6.17	5.91	5.03	4.90	4.27	3.55– 3.48	3.35	1.49–1.28

[a] Diastereotopic protons have not been assigned.

Tabella 2

Aumentando la concentrazione in CHCl₃ si osserva un modesto allargamento delle linee. Lo spettro al protone nella miscela DMSO/CHCl₃ mostra il segnale NH(1) a $\delta = 10.64$ ppm. Questo segnale in cloroformio puro si sposta a $\delta = 12.02$ e rimane invariato all'aumentare della concentrazione. Il segnale NH(2) appare come un singoletto appiattito a $\delta = 6.17$ ppm in DMSO/CHCl₃ e a $\delta = 6.01$ ppm nella soluzione in CHCl₃ più diluita, e si sposta leggermente a campi più bassi all'aumentare della concentrazione. Mentre l'NH(1) in cloroformio sembra essere sempre coinvolto nella formazione di legami ad idrogeno, l'NH(2) invece è impegnato in legami ad idrogeno solo ad alte concentrazioni. Mentre gli spettri NOESY registrati per soluzioni diluite in CHCl₃ e in DMSO mostrano dei cross-peak con la fase opposta a quella della diagonale, soluzioni

intorno a 3×10^{-2} M mostrano invece dei cross-peak con la stessa fase. Dato che il peso molecolare del composto **10** è 463, e considerando lo spostamento a campi più bassi osservato per l'NH(1) in CHCl_3 , rispetto al segnale in DMSO, possiamo concludere che il composto, per soluzioni diluite in cloroformio, esiste come dimero, un comportamento già osservato prima per composti analoghi²⁴. A concentrazioni maggiori lo scenario è marcatamente differente: con l'aumento della concentrazione abbiamo osservato la formazione di aggregati oligomerici/polimerici supramolecolari di elevato peso molecolare, come è evidenziato dalla presenza dei cross-peak negativi negli spettri NOESY. Informazioni sulla struttura degli aggregati supramolecolari possono essere raccolte da una più attenta analisi degli spettri NOESY e ROESY. Lo spettro NOESY di una soluzione 7×10^{-2} M in cloroformio (mixing time 100 ms) mostra dei cross-peak tra NH(1) e H(8) e tra NH(2) e H(8). Questi segnali sono caratteristici per un arrangiamento a nastro secondo il modello riportato in figura 6.3.

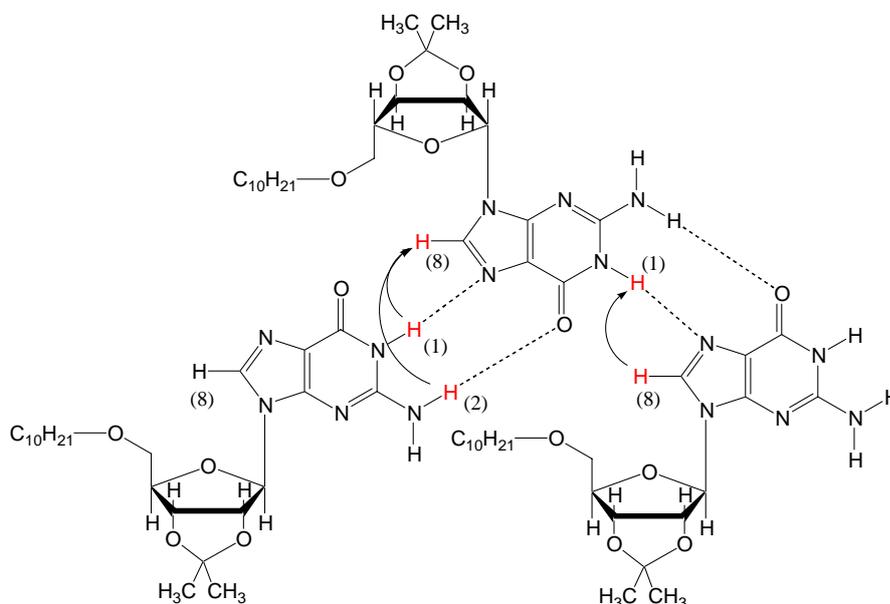


Figura 6.3

E' da notare che i cross-peak tra NH(2) e H(2') o H(1') sono molto deboli e i cross-peak tra il CH₃ dell'isopropilidene e NH(2) sono assenti. La mancanza di questi segnali esclude invece la possibilità di aggregazione della molecola sia secondo il modello a nastro riportato in figura 6.4, sia secondo il modello a foglietto proposto da Araki (figura 6.1).

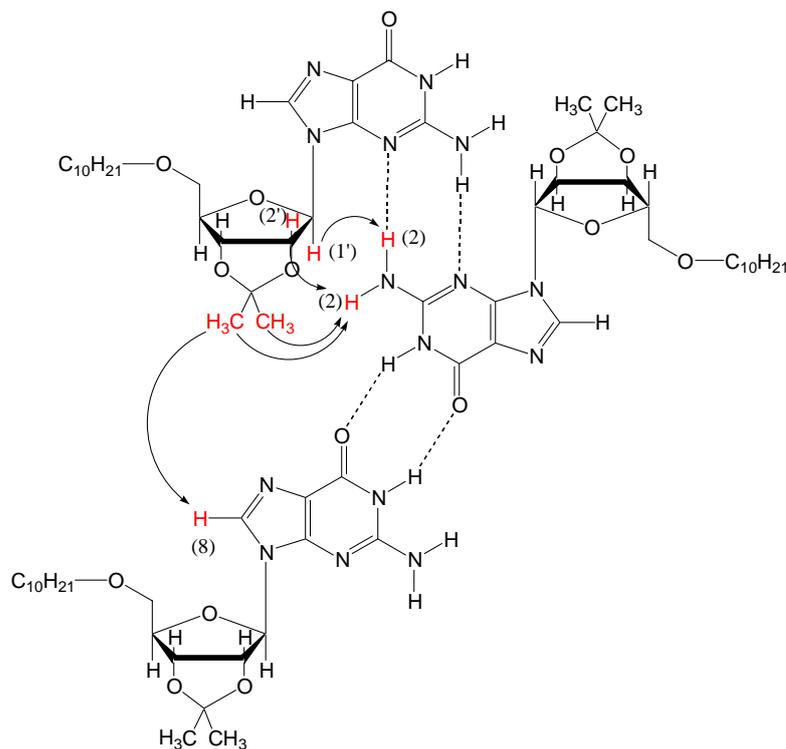


Figura 6.4

Lo spettro CD del composto **10** registrato in cloroformio (figura 6.5) mostra un debole segnale nella regione a lunghezza d'onda compresa tra 300-220 nm, che corrisponde alle transizioni a più bassa energia del cromoforo della guanina. Questo comportamento è in accordo con i precedenti dati ottenuti sulle strutture a nastro formate dalle guanosine²⁵ e in contrasto con l'ipotesi di formazione di strutture ad elica, le quali mostrano una banda CD molto più intensa come riportato per le 8-oxoguanosine.

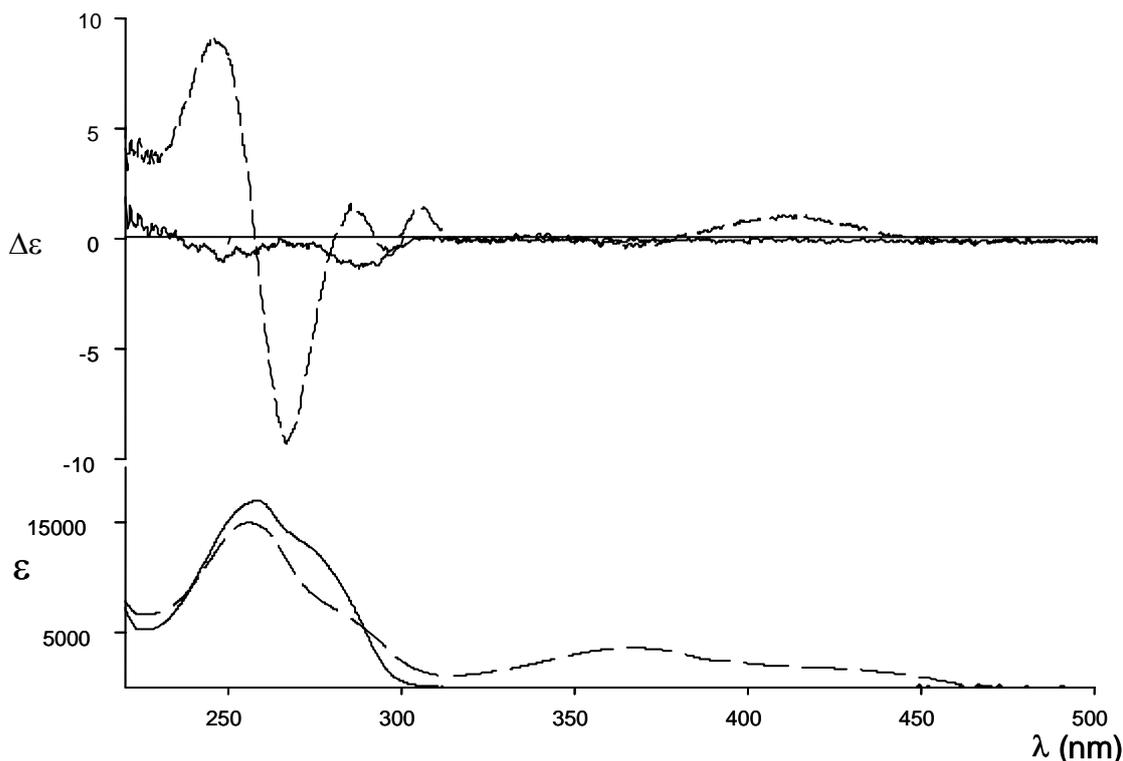


Figura 6.5 Spettri CD e UV di una soluzione $4.2 \times 10^{-3} M$ in cloroformio prima (linea continua) e dopo (linea tratteggiata) estrazione solido/liquido di un eccesso di picrato di potassio

6.3 Fasi liquido-cristalline

Nei solventi organici il composto **10** ha mostrato proprietà liquido-cristalline liotropiche. La microscopia ottica in luce polarizzata ha rivelato la presenza di una fase fluida birifrangente in toluene e cloroformio per $c > 2.5 \%$ (p/p). Esperimenti di diffrazione dei raggi X hanno confermato la presenza di un ordine liquido-cristallino. Il composto è stato studiato in cloroformio e toluene a diverse concentrazioni e in forma di film, ottenuto per evaporazione lenta di soluzioni in cloroformio. Mentre gli spettri di diffrazione in cloroformio hanno mostrato un'intensità molto debole (dovuta all'assorbimento del cloroformio), in toluene hanno mostrato uno o due picchi intensi nella regione a più basso angolo ed una banda larga nella regione a più alto angolo. I profili di

diffrazione migliori sono stati ottenuti per concentrazioni maggiori del 50% (p/p) o per il film. In particolare come mostrato in figura 6.6 la regione a basso angolo è caratterizzata da una serie di picchi allargati che suggeriscono un impiccamento degli aggregati secondo una simmetria rettangolare⁴³, in cui la distanza dipende dalla quantità di solvente. La regione di diffrazione ad alto angolo è caratterizzata da due bande, una più stretta centrata a $Q = (5.46 \text{ \AA})^{-1}$ e l'altra più larga centrata a $Q = (4.5 \text{ \AA})^{-1}$ che indica la conformazione disordinata delle catene idrocarburiche, mentre la banda stretta indica la presenza di un aggregato la cui caratteristica distanza ripetitiva è di 5.5 \AA .

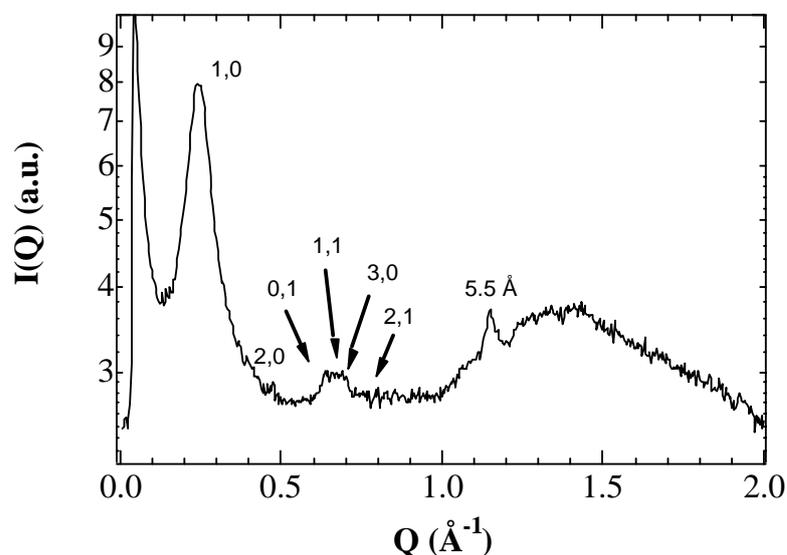


Figura 6.6 *Profilo di diffrazione dei raggi X ottenuto per il film secco*

In accordo coi precedenti risultati²⁵, i dati osservati e il comportamento che dipende dalla concentrazione sono un'evidenza dell'esistenza di una fase in cui gli elementi strutturali sono dei nastri, di lunghezza infinita e paralleli tra loro, impaccati secondo una simmetria 2D rettangolare come rappresentato in figura 6.7.

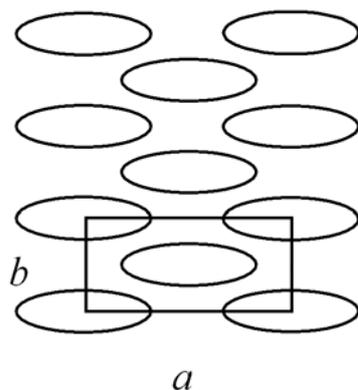


Figura 6.7 *Modello geometrico per la fase 2D-rettangolare. La sezione degli aggregati è rappresentata da un'ellisse*

I nastri, nella conformazione estesa, contengono i residui di guanina mentre le catene alchiliche, insieme al solvente in cui sono disciolte, riempiono lo spazio laterale tra i vari nastri. Sulla base della struttura a nastro, il picco di diffrazione centrato a $Q = (5.5 \text{ \AA})^{-1}$ potrebbe essere correlato alla distanza di ripetizione delle guanosine all'interno del nastro.

6.4 Autoassemblaggio all'interfaccia solido-liquido

Visto gli interessanti risultati ottenuti con metodi indiretti, sull'autoassemblaggio del derivato 10 in soluzione, abbiamo esteso i nostri studi all'STM al fine di fornire una mappatura spaziale reale. Infatti, le immagini STM forniscono una risoluzione d'immagine sub-molecolare dell'adsorbato molecolare all'interfaccia con la superficie⁴⁴. L'STM è stata impiegata con successo in esperimenti ad alto vuoto per studiare gli aggregati della guanina in cui le singole unità sono impegnate in legami ad idrogeno per formare un G-quartetto su Au(111), che stabilizza i legami ad idrogeno per risonanza⁴⁵. La versatilità della tecnica STM permette l'esplorazione *in situ*

dell'autoassemblaggio di una molecola organica all'interfaccia tra la propria soluzione in un solvente poco polare e un substrato solido che conduce.

La figura 6.8 mostra un'immagine STM ad alta risoluzione dell'assemblato del derivato **10** all'interfaccia grafite-soluzione. L'immagine rivela una struttura 2D lamellare cristallina con una geometria rettangolare. I parametri di cella determinati sono $a = 2.20 \pm 0.20$, $b = 1.43 \pm 0.15$ nm, $\alpha = 83 \pm 4^\circ$.

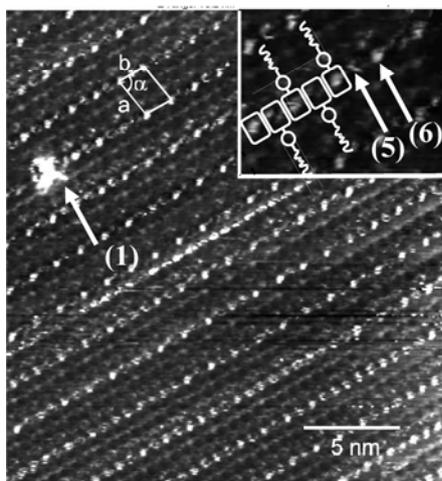


Figura 6.8

I parametri di cella calcolati, indicano la presenza di una struttura supramolecolare a nastro ed il valore del parametro di cella a , che corrisponde alla metà della larghezza stimata di un nastro, suggerisce che le code alchiliche siano interdigitate tra nastri adiacenti. Nonostante la risoluzione elevata delle immagini STM ottenute per il composto **10**, i parametri di cella calcolati non sono in grado da soli di distinguere quale nastro, tra i due possibili, sia presente all'interfaccia soluzione/grafite.

Per concludere, attraverso differenti strumenti di indagine quali STM, diffrazione dei raggi X e NMR abbiamo dimostrato che il carbonile, presente nei derivati 5'-O-acilati e che sappiamo interagire attraverso un legame ad idrogeno intramolecolare con l'NH(2), non è un prerequisito indispensabile

per la formazione di strutture supramolecolari a nastro. Inoltre l'aggregato supramolecolare osservato per il composto **10** indica la presenza di nastri paralleli tra loro con dei dipoli probabilmente paralleli. Pertanto, questo tipo di nanostrutture monodimensionali risultano essere interessanti per un loro potenziale utilizzo in (opto)elettronica.

CAPITOLO 7 – FUNZIONALIZZAZIONE DI GUANOSINE LIPOFILE CON OLIGOMERI TIOFENICI

7.1 Introduzione

Gli oligomeri del tiofene sono stati oggetto di studi interdisciplinari nelle ultime due decadi grazie alle loro proprietà ottiche ed elettroniche. In particolare, le caratteristiche di mobilità di carica ad effetto di campo, comparabili a quelle del silicio amorfo, hanno orientato la ricerca nei settori di applicazione dei semiconduttori, dei FET (field effect transistor) e di componenti elettronici fotoluminescenti come i LED⁴⁷ e le celle fotovoltaiche⁴⁸. In particolare la fluorescenza di tali molecole sembra aver galvanizzato l'attenzione negli ultimi anni. I metodi basati sulla determinazione di fluorescenza rappresentano una delle principali tecniche di diagnostica a livello medico e biologico, per l'identificazione e l'analisi quantitativa di biomolecole⁴⁹, per lo studio dei meccanismi alla base dei processi cellulari, nell'immunoistochimica, negli studi genomici e di marcatura degli acidi nucleici⁵⁰. In tal senso il successo degli oligotiofeni è dovuto certamente all'elevata assorbanza in soluzione, alla buona resa quantica di fotoluminescenza, generalmente vicina al 50%, e alla possibilità di disporre di un ampio range di frequenze di emissione luminosa che varia da 400 nm a 600 nm (rispettivamente per il trimero e per l'esamero) modificando il numero di unità che costituiscono l'oligomero e il tipo di sostituzione. La figura 7.1 mostra l'emissione di fluorescenza di film (a sinistra) e di soluzioni (a destra); i vari colori corrispondono ai diversi oligomeri sintetizzati. Entrambe le immagini sono state ottenute attraverso irradiazione di una singola sorgente UV ($\lambda = 364$ nm).

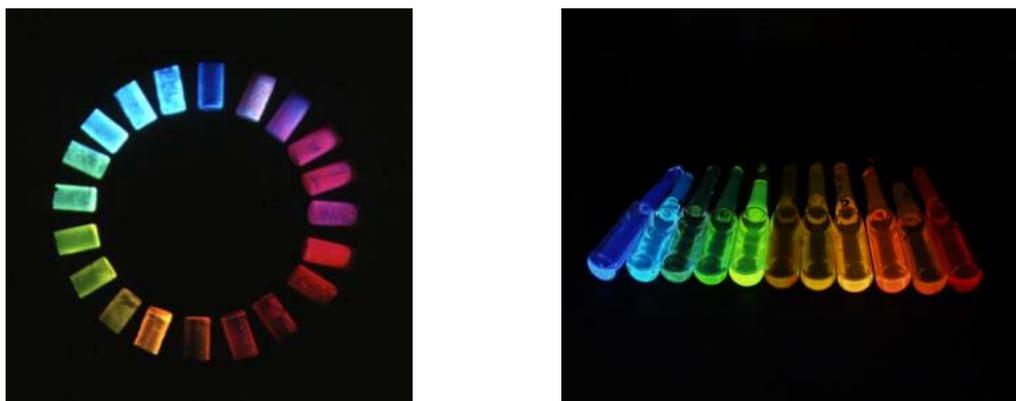


Figura 7.1

A completamento del profilo generale di questa classe di molecole vanno ricordate la tendenza all'autoaggregazione che porta a strutture altamente ordinate e stabili ed i rilevanti sviluppi nei procedimenti sintetici che attualmente consentono di isolare facilmente un'ampia varietà di prodotti puri. Pertanto è stato iniziato uno studio di sintesi e caratterizzazione di esteri guanosinici in 5' con oligomeri tienilici al fine di costruire dei dispositivi bio-elettronici ibridi basati su autoassemblati di guanosina con proprietà optoelettroniche più efficienti. In particolare è stato sintetizzato il derivato **11** (figura 7.1). Le proprietà autoassemblanti del derivato **11** sono state indagate attraverso studi di dicroismo circolare, di diffrazione ai raggi X, NMR e spettroscopia a scansione di sonda.

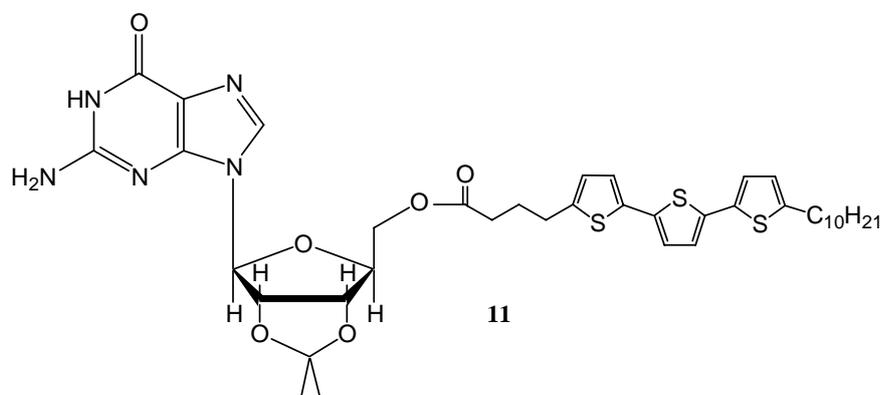


figura 7.1

7.2 Autoassemblaggio in soluzione

L'autoassemblaggio del derivato **11** è stato studiato inizialmente attraverso il dicroismo circolare, in differenti condizioni sperimentali, per verificare se la presenza della coda oligotienilica potesse in qualche modo interferire con l'autoaggregazione tipica della guanosina. Gli spettri CD registrati per il derivato **11** sono riportati in figura 7.2. Gli spettri sono stati registrati in presenza ed in assenza di cationi metallici e in condizioni disaggreganti. Dopo estrazione di KI in cloroformio lo spettro CD mostra, in corrispondenza dell'assorbimento della guanosina, un segnale CD intenso ad indicare la formazione di un aggregato a G-quartetti impilati, mentre lo spettro della stessa soluzione registrato prima dell'aggiunta del sale mostra un segnale CD molto più debole, in accordo con l'ipotesi di formazione di aggregati a nastro. In metanolo, un solvente che compete nella formazione di legami ad idrogeno, il segnale CD è assente a dimostrazione della disaggregazione dell'assemblato. E' da notare che lo spettro eseguito di una soluzione, in realtà non completamente limpida, in acetonitrile in presenza di ioni mostra, un debole eccitone in corrispondenza dell'assorbimento della guanosina, un segnale eccitonico relativamente intenso in corrispondenza dell'assorbimento dei tiofeni. Tuttavia una volta filtrata la soluzione (*pore size* dei filtri di 0.45 μm) il segnale CD scompare e l'assorbimento diminuisce sensibilmente, segno che l'eccitone registrato prima della filtrazione è dovuto con ogni probabilità all'eventuale presenza di piccole particelle in sospensione che danno origine a fenomeni di light scattering. Un'interpretazione di questo fenomeno potrebbe essere che in un solvente poco affine ai tiofeni come l'acetonitrile questi tendano ad aggregarsi tra loro per dare stacking. Si passerebbe quindi, per via gerarchica, da un complesso mediato dalle interazioni tra le guanosine ad un complesso, poco solubile, guidato dalle interazioni tra tiofeni. Ulteriori approfondimenti su questo fenomeno sono attualmente in corso.

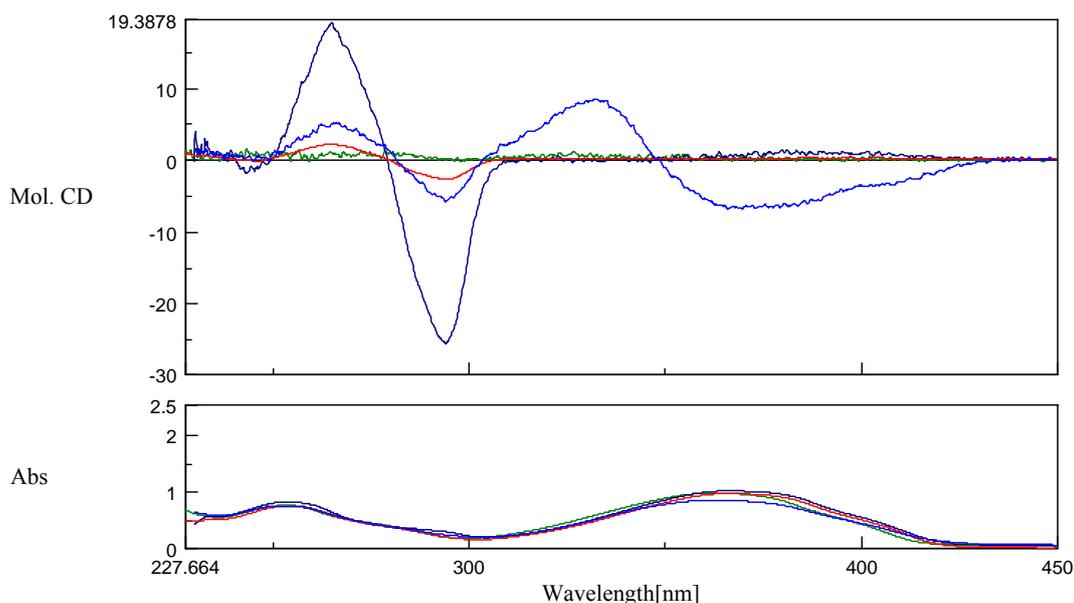


Figura 7.2 Spettri CD di una soluzione $3.6 \times 10^{-4} M$ in cloroformio (linea rossa), in cloroformio dopo estrazione di KI (linea viola), in metanolo (linea verde) e in acetonitrile dopo estrazione di KI (linea blu).

Per comprendere meglio la natura degli aggregati supramolecolari originati nelle diverse condizioni sperimentali sono stati effettuati anche degli studi NMR. In particolare è stato studiato l'autoassemblaggio del derivato **11** prima e dopo estrazione di sali di metalli alcalini. Per studiare la formazione e la stechiometria dei complessi in presenza di ioni attraverso l'NMR è necessario utilizzare un sale di potassio il cui anione fornisca un segnale NMR distinguibile dai segnali caratteristici della molecola in esame. Inizialmente è stato scelto il picrato di potassio, un sale già utilizzato per la caratterizzazione dei complessi della guanosina descritti nei capitoli precedenti. Sono stati registrati spettri NMR in $CDCl_3$ con stechiometrie differenti [G-tertiofene/picrato 8:1 e 4:1]. In entrambi gli esperimenti il picrato è stato sempre estratto in quantità superiore a quella attesa per la formazione dei complessi supramolecolari. Probabilmente il fatto è dovuto alla presenza dei tiofeni che, dando interazioni di stacking con l'anione aromatico picrato, ne

aumentano l'estrazione nella fase cloroformica. Pertanto è stato scelto il sale di potassio formiato, il cui anione non è aromatico e il segnale NMR del protone cade ad una frequenza distinta da quelle dei protoni della guanosina in esame. Sono stati registrati gli spettri NMR di una soluzione in cloroformio prima e dopo estrazione di formiato di potassio. Lo spettro NMR in cloroformio prima dell'estrazione mostra dei segnali piuttosto allargati ed i chemical shift di NH(1) e NH(2) sono tipici per molecole impegnate in legami ad idrogeno a formare aggregati supramolecolari di dimensioni significative. Aggiungendo infatti alla stessa soluzione pochi microlitri di DMSO- d_6 , un solvente disaggregante, i segnali NMR diventano più stretti e l'NH(1) e l'NH(2) si spostano a campi più alti segno evidente di disaggregazione. Tuttavia questi soli dati non sono sufficienti ad individuare quale tipo di architettura supramolecolare sia presente in soluzione. Esaminando invece lo spettro NMR in cloroformio dopo estrazione solido/liquido di formiato di potassio si possono ricavare delle informazioni importanti sulla formazione della specie presente in soluzione. Il fatto che sia presente un solo set di segnali, contrariamente a quanto ci si aspettasse, indica uno stacking simmetrico (testa-testa o coda-coda) di G-quartetti. Inoltre tutti i segnali sono stretti ad indicare che la specie presente non è molto grande. La stechiometria del complesso dopo estrazione con un eccesso di formiato risulta essere 4:1 che dopo un lavaggio con H₂O diventa 8:1 mentre i chemical shift dei segnali non cambia. Quindi sembra formarsi un ottamero con due cationi, uno intrappolato e uno mobile, il quale dopo lavaggio della soluzione cloroformica con acqua tende a scomparire (figura 7.4)⁵¹.

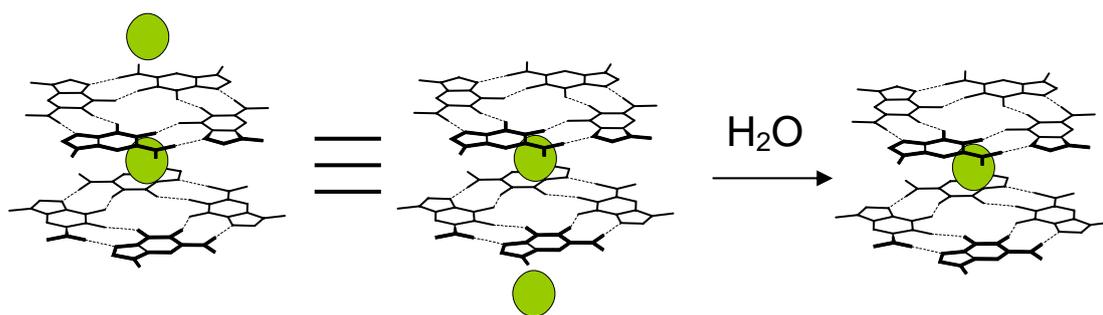


Figura 7.4

Dati che sono stati confermati anche da esperimenti NMR di diffusione (DOSY) in cui i complessi della soluzione 4:1 e 8:1 sembrano diffondere allo stesso modo, indicando la presenza in soluzione di un'unica specie. Per approfondire i dati preliminari ottenuti dai semplici spettri $^1\text{H-NMR}$, sono stati effettuati anche esperimenti NOESY-2D nelle diverse condizioni sperimentali. Lo spettro NOESY a temperatura ambiente di una soluzione cloroformica del composto **11** in presenza di un eccesso di formiato ha mostrato un forte cross-peak intra-quartetto tra l' $\text{NH}(2)$ e l' $\text{H}(8)$ caratteristico della formazione di G-quartetti (figura 7.5)⁵². In aggiunta è stato registrato anche un forte cross-peak intramolecolare tra l' $\text{H}(8)$ e l' $\text{H}(1')$ che è indicativo di una conformazione *syn* rispetto al legame glicosidico $\text{N}_9\text{-C}_1'$. In ultimo è stato evidenziato anche un forte cross-peak inter-quartetto tra l' $\text{H}(8)$ e l' $\text{H}(5'')$ a supporto del fatto che i G-quartetti all'interno dell'ottamero sono leggermente ruotati l'uno rispetto all'altro⁵³.

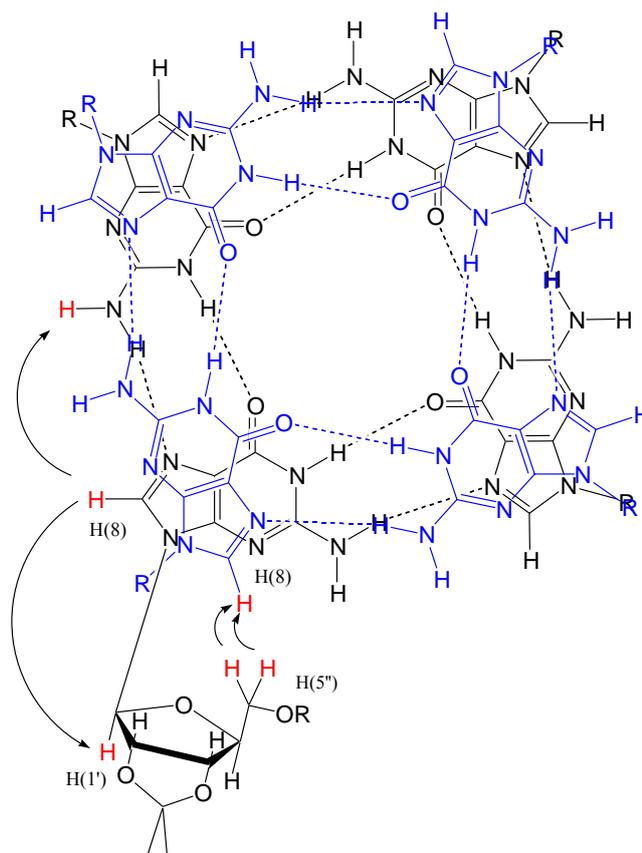


Figura 7.5 *Rappresentazione di un ottamero simmetrico (testa-testa) e in evidenza le interazioni NOE intra-quartetto tra NH(2) e H(8), intramolecolare tra H(8) e H(1') e inter-quartetto tra H(8) e H(5''). Per semplicità sono state omesse le catene laterali oligotiofeniche*

Sono stati eseguiti anche gli spettri NOESY di una soluzione del composto **11** in assenza di ioni per determinare il tipo di nastro presente in soluzione. Inizialmente sono stati registrati una serie di spettri, a differente concentrazione, utilizzando il cloroformio come solvente, ma data la larghezza di banda dei segnali caratteristici, anche modificando diversi parametri nell'acquisizione degli spettri, non si è riusciti ad identificare nessun segnale diagnostico interessante. Passando al deutero dicloroetano i segnali NMR sono risultati più stretti e meglio risolti, questo ha permesso di identificare i segnali caratteristici della specie a nastro. Da notare che i campioni utilizzati per

registrare gli spettri contenevano tutti tracce di sali provenienti dai vari processi di sintesi. Quindi oltre ai cross-peak dovuti alla presenza degli aggregati tipo nastro sono stati registrati anche i cross-peak relativi alla specie ottamerica (con chemical shift diversi) e i cross-peak di scambio tra le due specie. Per sottrazione dei cross-peak precedentemente assegnati al complesso con gli ioni si sono ricavati i cross-peak diagnostici per l'aggregato a nastro. In particolare sono stati evidenziati i cross-peak intermolecolari tra l'NH(2) e l'H(8) e l'NH(1) e l'H(8), che sono caratteristici del nastro schematizzato in figura 7.6, il quale corrisponde al nastro in fase solida precedentemente caratterizzato per i derivati lipofili della desossiguanosina. Da notare la comparsa anche di un forte cross-peak intramolecolare tra l'H(8) e l'H(1'), segno che la conformazione adottata dalle molecole non è *anti*, come nel nastro solido della desossiguanosina, ma vi è una leggera rotazione dello zucchero attorno al legame glicosidico che conferisce un parziale carattere *syn* alle molecole impegnate nella formazione dell'aggregato a nastro.

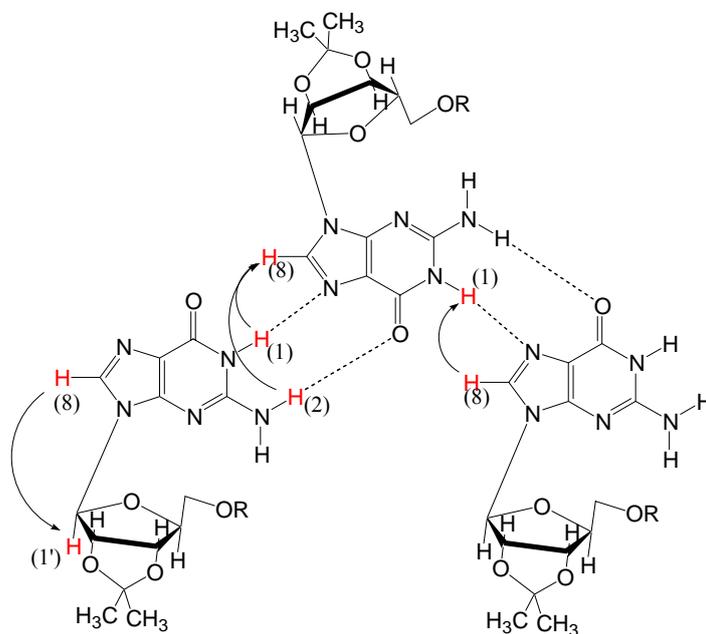


Figura 7.6 *Interazioni NOE intermolecolari tra NH(2) e H(8), tra NH(1) e H(8) e intramolecolari tra H(8) e H(1'). Per semplicità sono state omesse le catene oligotiofeniche.*

7.3 Fasi liquido-cristalline

Il derivato **11** ha mostrato proprietà liquido-cristalline nei comuni solventi organici. In figura 7.7 vengono mostrate le tessiture osservate al microscopio ottico delle fasi liquido cristalline in toluene al 5% p/p (a) e in cicloesano al 5% p/p (b).

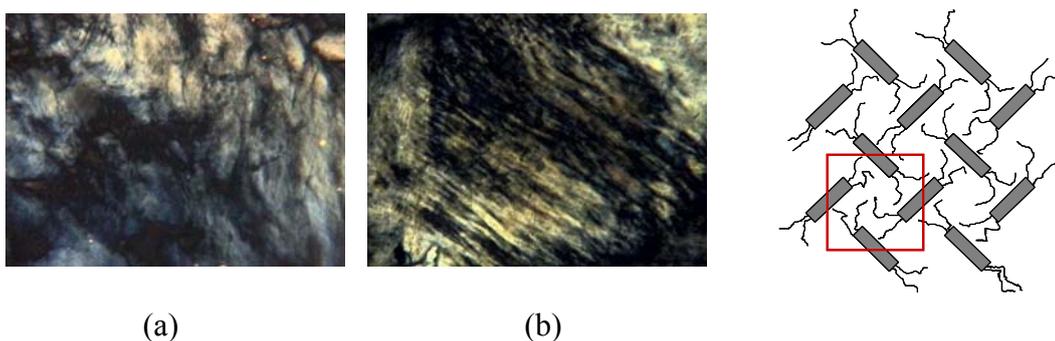


Figura 7.7 Tessiture osservate al microscopio ottico della fase liquido cristallina di **11** in toluene al 6% p/p (a) e in cicloesano al 5% p/p (b).

Nelle foto si osserva una mesofase debolmente birifrangente la cui intensa colorazione ha reso difficile l'interpretazione della tessitura. Dati preliminari di diffrazione dei raggi X consentono di confermare la natura liquido cristallina della fase e di assegnarne una simmetria bidimensionale quadrata in accordo con una struttura supramolecolare tipo nastro.

7.4 Autoassemblaggio su superficie

Uno studio preliminare in fase solida del derivato **11** è stato condotto mediante tecniche di microscopia a scansione di sonda (Scanning Probe Microscopy).

7.4.1 Studi AFM

La microscopia a forza atomica (AFM), sfrutta l'interazione di forza in un sistema punta-superficie per tracciare una mappa topografica del campione caratterizzandone la struttura e morfologia. La punta è microfabbricata tramite tecniche litografiche e montata su una leva di silicio chiamata cantilever. L'interazione punta-superficie, in modalità Tapping Mode, provoca un'oscillazione del cantilever che viene rilevata e tradotta in un'immagine topografica di superficie. Sottili film del derivato **11**, preparati su differenti superfici solide ultrapiatte, rivelano una morfologia che può ricondurre ad una struttura a nastro per tutta la superficie del campione (figura 7.8). Per i depositi preparati da cloroformio (a), si osservano chiaramente dei nastri aventi larghe variazioni in lunghezza (da poche decine a centinaia di nm), ma nello stesso tempo larghezza e spessore sono costanti, 18 ± 3 nm e 0.6 ± 0.2 nm rispettivamente. Per i depositi preparati da 1,2,4-tricloro-benzene, si osservano direttamente lunghi e larghi nastri, la cui larghezza varia da pochi nm a decine di nm (b), la cui struttura è costituita da due nastri adiacenti, il più largo è intorno a 30 nm di larghezza, il più piccolo intorno ai 15 nm.

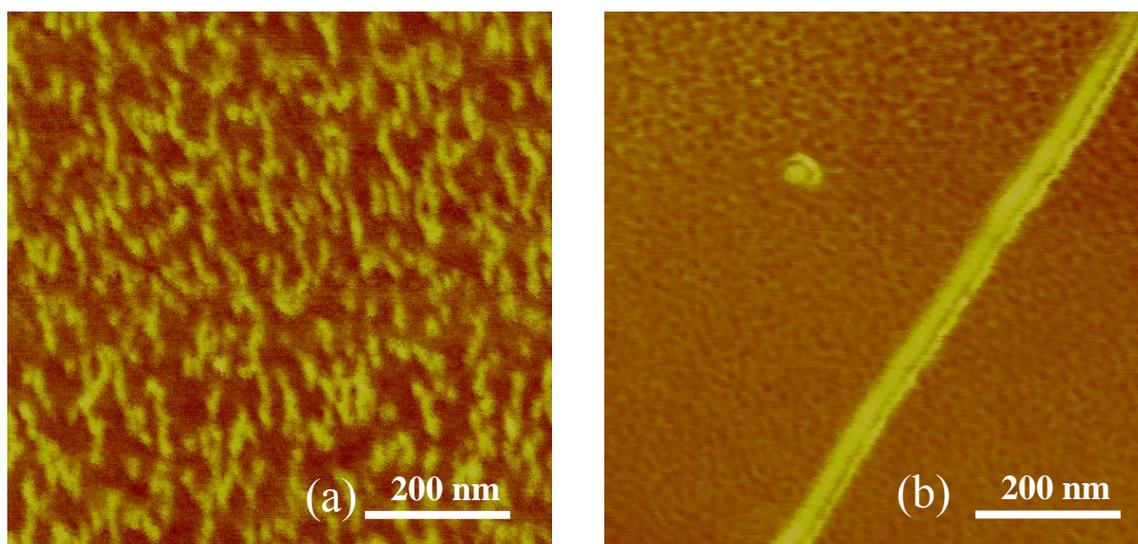


Figura 7.8 Immagini AFM di film depositati su mica da cloroformio (a) e da 1,2,4-tricloro-benzene (b).

Il cloroformio e il triclorobenzene sono buoni solventi per il derivato in esame, ma vi sono delle differenze nei depositi preparati dovuti ad un diverso processo di evaporazione. Il cloroformio evapora velocemente (tempo di ebollizione 61°C; tempo di evaporazione della goccia: pochi secondi), mentre il triclorobenzene evapora molto lentamente (tempo di ebollizione 213°C; tempo di evaporazione: più di un giorno), quindi il primo permette solo la formazione di piccoli nastri lungo una dimensione, mentre il secondo lascia il tempo per la formazione di lunghi e dritti nastri aggregati lateralmente.

7.4.2 Studi STM

Nelle immagini STM di film anidri preparati da cloroformio, si osservano linee luminose parallele regolarmente spaziate (figura 7.9).

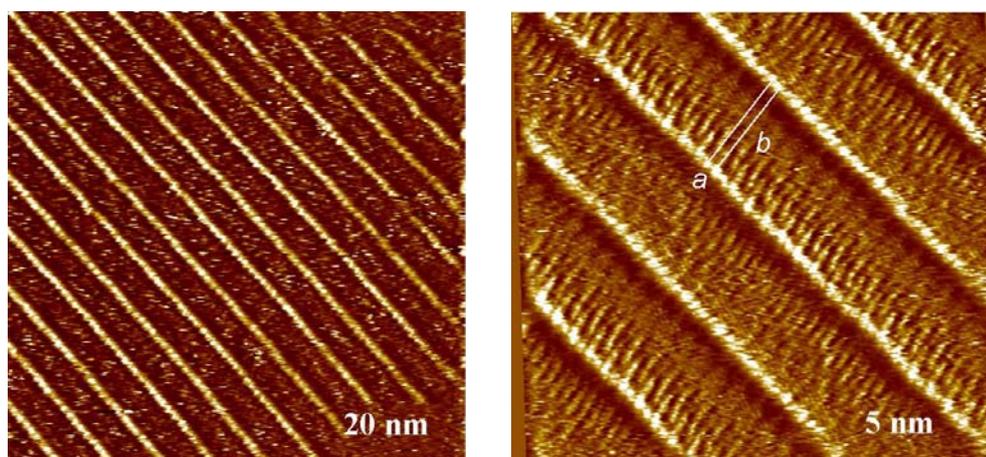


Figura 7.9 Immagini STM del composto 11 su HOPG. Nell'immagine su scala 5 nm è stata ricavata la cella unitaria con $a = 0.577$ nm, $b = 5.36$ nm e l'angolo = -97.35°

La larghezza delle linee chiare luminose è intorno ai 0.6-0.7 nm e da ciascuna linea si dipartono piccole strutture pressoché perpendicolari alla linea, che possono rappresentare i gruppi tiofenici o i gruppi alchilici. Per comprendere

meglio la disposizione molecolare sono state eseguite simulazioni di modelling molecolare, come spiegato qui di seguito.

7.4.3 Modello molecolare

Analizzando i livelli di energia e considerando che la larghezza delle linee luminose chiare (che corrispondono al tunneling degli elettroni) è intorno a 0.7 nm, un valore più vicino alle guanosine (intorno a 0.8 nm rispetto all'asse lungo) piuttosto che al residuo tertienilico (intorno a 1.16 nm rispetto all'asse lungo), queste si possono quindi attribuire alle guanosine. Sono state prese in considerazione le due possibili conformazioni a nastro delle guanosine, in relazione al numero e al tipo di legame a idrogeno. L'osservazione nelle immagini STM di una cella unitaria di tali dimensioni e l'interdigitazione delle catene tertieniliche lascia supporre una conformazione tale per cui la molecola è estesa e relativamente planare per massimizzare le interazioni di van der Waals con la grafite. In figura 7.10 viene riportato il nastro che meglio rappresenta le immagini STM registrate, in cui i gruppi decil-tertiofenici sono quasi perpendicolari all'asse lungo del nastro ed in stacking planare. Infatti, nell'immagine STM su scala 5 nm, si può osservare che dalle linee più luminose, le quali ricordiamo rappresentare le guanosine impegnate nei legami ad idrogeno, dipartono perpendicolarmente delle linee che rappresentano le code alchil-oligotiofeniche, le quali sono interdigitate con le catene laterali del nastro adiacente. E' da notare che il nastro rappresentato in figura 7.10 è diverso da quello caratterizzato in soluzione attraverso gli studi NMR.

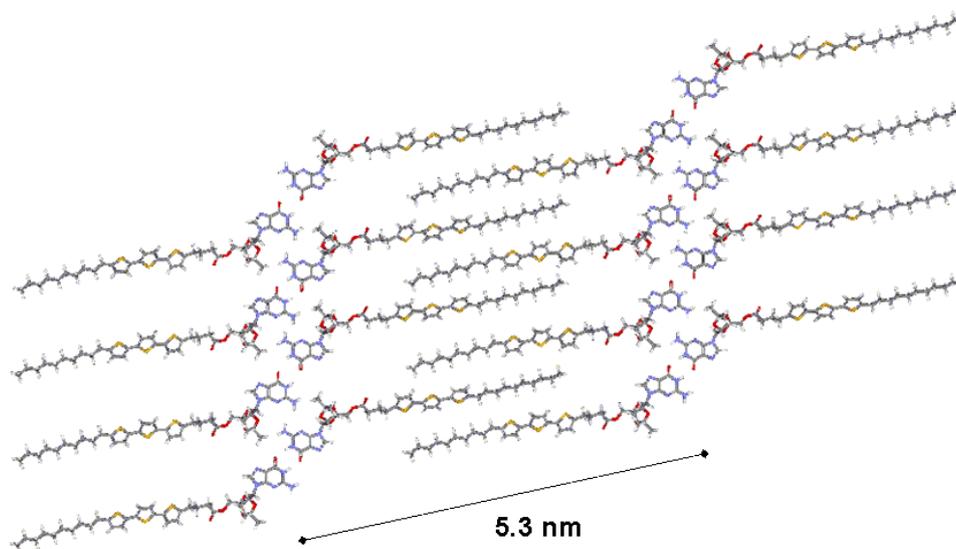


Figura 7.10 *Rappresentazione molecolare di due nastri adiacenti in cui le catene laterali sono interdigitate tra loro*

7.5 Conclusioni

Il composto **11** mostra nei diversi ambienti in cui è stato studiato, un evidente processo di autoassemblaggio per originare strutture a nastro. Lo spettro CD è compatibile con strutture di questo tipo ed evidenzia come l'aggiunta di metalli alcalini trasforma i nastri in strutture colonnari. A più elevata concentrazione in solventi organici, questi nastri si autoorganizzano per dare una fase liquido-cristallina presumibilmente di tipo quadrata. In questa fase i singoli nastri sono disposti parallelamente l'uno all'altro e separati dal solvente. L'organizzazione a nastro si manifesta anche su superficie di mica o di grafite; nel primo caso l'indagine AFM ha evidenziato singoli o piccoli fasci di nastri, mentre la microscopia STM ha consentito di risolvere anche le catene laterali, disposte quasi perpendicolarmente all'asse dei nastri. Attualmente, presso il London Centre for Nanotechnology, si stanno studiando

le proprietà opto-elettroniche di questo derivato al fine di costruire dei biodispositivi basati su questo tipo di derivato.

CAPITOLO 8 - PARTE SPERIMENTALE

Generale: Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-710 utilizzando celle di appropriata grandezza. Gli spettri NMR sono stati registrati con strumentazioni Varian Mercury a 300 o 400 MHz. Gli esperimenti di diffrazione dei raggi-X sono stati eseguiti utilizzando un generatore di raggi-X Philips PW1830 equipaggiato con una camera a focalizzazione in vuoto di tipo Guinier. Gli esperimenti STM sono stati eseguiti all'interfaccia solido-liquido a temperatura e pressione ambiente. Le immagini STM delle molecole sono state registrate in corrente con intervalli di scansione di circa 20-50 line s⁻¹. Le misure sono state effettuate utilizzando un picoAmp-Nanoscope IIIa.

8-Br-Adenosina. L'adenosina (5g, 18.7 mmol) è stata solubilizzata in 25 mL di soluzione tampone acetato di sodio/acido acetico 1M (pH = 4) a 50°C. La soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e poi addizionata di bromo (5g in 150 mL di H₂O). Dopo 5 ore il bromo in eccesso è stato neutralizzato con una soluzione di NaSO₃ 5N. Il pH è stato neutralizzato con una soluzione di NaOH 5N. Il precipitato è stato quindi filtrato (3.36 g, resa 52%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.64-3.95 (m, 3H, 4'H-5'H-5''H), 4.16-4.62 (m, 2H, 2'H-3'H), 5.20-5.72 (m, 3H, 2'-3'-5'-OH), 6.26 (d, 1H, 1'H), 7.41 (s, 2H, NH₂), 8.07 (s, 1H, 2-H) ppm.

8-Br-Inosina. Ad una sospensione di 8-Br-adenosina (1.00 g, 2.89 mmol) in 50 mL di acido acetico è stato aggiunto nitrito di sodio (1.00 g, 14.5 mmol) sciolto in 10 mL di H₂O. La reazione è stata lasciata reagire per 5 ore e poi è stato evaporato il solvente. Il grezzo è stato quindi cristallizzato da EtOH/H₂O. (0.56 g, resa 56.3%).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 3.42-3.71 (m, 2H, 5'H-5''H), 3.91 (m, 1H, 4'H), 4.18 (m, 1H, 3'H), 5.04 (t, 1H, 2'H), 5.80 (d, 1H, 1'H), 8.07 (s, 1H, Ar-H) ppm.

2', 3', 5'-O-Triacetil-8-oxoinosina. (0.50 g, 1.44 mmol) di 8-Br-inosina sono stati aggiunti ad una soluzione di acetato di sodio (0.55 g, 6.70 mmol) in 13 mL di acido acetico/anidride acetica. La miscela è stata portata a refluxo (160 °C) per 24 h. La reazione è stata spenta con 10 mL di EtOH e portata a secco. Il residuo è stato ripreso in cloroformio e lavato con H_2O prima e con soluzione satura di bicarbonato di sodio dopo. La soluzione organica è stata portata a secco. (478 mg, 81%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 2.10 (m, 9H, CO-CH_3), 4.30-4.50 (m, 3H, 4'H-5'H-5''H), 5.75 (t, 1H, 2'H), 6.14 (d, 1H, 1'H), 6.20 (m, 1H, 3'H), 8.02 (s, 1H, Ar-H), 11.41 (s, 1H, NH), 12.58 (s, 1H, NH) ppm.

8-Oxoinosina. 2', 3', 5'-O-triacetil-8-oxoinosina (1.50 g, 3.80 mmol) è stata aggiunta ad una soluzione di Na (0.35 g, 15 mmol) in 15 mL di metanolo anidro. La reazione procede per 2 h ed il precipitato viene poi filtrato (0.54 g, resa 50%).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 3.40-3.70 (m, 2H, 5'H-5''H), 3.84 (m, 1H, 4'H), 4.10 (m, 1H, 3'H), 4.82 (m, 1H, 2'H), 5.64 (dd, 1H, 1'H), 7.89 (s, 1H, Ar-H) ppm.

2', 3', 5'-O-Tridecanoil-8-oxoinosina (8). 8-Oxoinosina (0.3 g, 1.0 mmol) è stata sospesa in 8 mL di acetonitrile anidro. Alla sospensione sono stati aggiunti Et_3N distillata (0.5 mL, 3.6 mmol), anidride decanoica (1.2 mL, 3.3 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata lasciata reagire per una notte. Dopo evaporazione del solvente, il grezzo è stato caricato in colonna di gel di silice. E' stato prima eluito con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acetone}$ (95:5) per togliere le tracce di acido decanoico, e poi con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96:4). Ottenuti 0.56 g (resa 76%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.84 (m, 9H, CH₃), 1.23 (m, 36H, CH₂), 1.49 (m, 6H, OC-CH₂CH₂), 2.30 (m, 6H, OC-CH₂), 4.12 – 4.22 (m, 2H, H5'-H5''), 4.33 (m, 1H, H4'), 5.58 (m, 1H, H3'), 5.81 (dd, 1H, H1'), 6.01 (m, 1H, H2'), 8.00 (s, 1ArH, H2), 11.61 (bs, 1H, NH), 12.60 (bs, 1H, NH) ppm.

4-(dodecilossi)benzoil cloruro. Il cloruro dell'acido 4-(dodecilossi)-benzoico è stato sintetizzato secondo le procedure standard.

2', 3', 5'-O-Tri(*p*-dodecilossibenzoil)-8-oxoinosina (9). 8-Oxoinosina (0.2 g, 0.7 mmol) è stata sospesa in 6 mL di acetonitrile anidro. Alla sospensione sono stati aggiunti Et₃N distillata (0.35 mL, 2.51 mmol), 4-(dodecilossi)benzoil cloruro (0.75 g, 2.31 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata lasciata reagire per una notte e spenta con MeOH. Dopo evaporazione del solvente il grezzo è stato cristallizzato da EtOH/CHCl₃ per dare 0.54 g di prodotto (resa 68%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.84 (m, 9H, CH₃), 1.23 (m, 48H, CH₂), 1.38 (m, 6H, O-CH₂CH₂CH₂), 1.69 (m, 6H, O-CH₂CH₂), 4.01 (m, 6H, O-CH₂), 4.46 – 4.70 (m, 3H, H4'-H5'-H5''), 6.06 (m, 1H, H3'), 6.09 (d, 1H, H1'), 6.32 (dd, 1H, H2'), 6.88 – 7.02 (m, 6ArH), 7.74 – 7.95 (m, 7ArH), 11.61 (s, 1H, NH), 12.70 (s, 1H, NH) ppm.

2', 3'-O-Isopropilidene-5'-O-decilguanosina (10). 2', 3'-O-isopropilidene-guanosina (Sigma) (0.4 g, 1.2 mmol) è stata sospesa in 10 mL di THF anidro. Alla sospensione sono stati aggiunti NaH (0.058 g, 2.4 mmol) e 1-bromodecano (1.24 mL, 6 mmol). La miscela è stata lasciata reagire a refluxo per una notte. Dopo aver lasciato raffreddare a temperatura ambiente la miscela, è stato evaporato il solvente e il residuo ripreso con CH₂Cl₂, lavato con H₂O, anidrificato con MgSO₄ e concentrato. Il grezzo è stato caricato in colonna di gel di silice ed eluito con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (94:6). Il prodotto è stato quindi cristallizzato da EtOH (0.26 g, resa 48%).

¹H-NMR (CDCl₃): 0.86 (t, 3H, CH₃), 1.25 (m, 14H, CH₂), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.53 (m, 2H, O-CH₂CH₂), 1.61 (s, 3H, CH₃), 3.43 (m, 2H, O-CH₂), 3.55-3.64 (m, 2H, H5'-H5''), 4.42 (m, 1H, H4'), 4.92 (m, 1H, H3'), 5.17 (m, 1H, H2'), 6.00 (d, 1H, H1'), 6.28 (s, 2H, NH₂), 7.76 (s, 1H, H8), 12.02 (s, 1H, NH) ppm.

Per la sintesi del tienil-derivato si è proceduto con la sintesi dell'acido 4-(5''-Decyl-[2,2';5',2'']tertiofene-5-yl)-butirrico modificando e adattando procedure già descritte⁵⁴⁻⁵⁵. L'esterificazione in 5' della guanosina è stata eseguita attraverso la formazione di un'anidride mista con il metansulfonil cloruro.

Estere benzilico dell'acido 4-Tiofen-2-yl-butirrico. Ad una soluzione di acido 4-tiofen-2-yl-butirrico (2.5 g, 14.7 mmol) in 60 mL di THF anidro sono stati aggiunti K₂CO₃ (4.14 g, 30 mmol), benzil bromuro (1.75 mL, 15 mmol) e 18-crown-6 (0.08 g, 0.3 mmol). La miscela eterogenea è stata lasciata a refluxo per una notte e poi raffreddata a temperatura ambiente. Il solvente è stato evaporato e il residuo ripreso con una miscela etile acetato/esano 1:3. La sospensione è stata poi filtrata su letto di silice e la soluzione portata a secco (3.7 g, resa 97%).

Estere benzilico dell'acido 4-(5-Bromo-tiofen-2-yl)-butirrico. (3.7 g, 14.2 mmol) di estere benzilico dell'acido 4-(5-Bromo-tiofen-2-yl)-butirrico sono stati solubilizzati in 30 mL di DMF anidra e la soluzione raffreddata a 0°C in bagno di ghiaccio. Proteggendo l'ambiente di reazione dalla luce è stata aggiunta la NBS (2.6 g, 15 mmol). La miscela è stata lasciata reagire tutta la notte a temperatura ambiente e diluita con 130 mL di etile acetato, lavata con 130 mL di brine (3 volte) e poi con 130 mL di H₂O (4 volte). La fase organica è stata anidrificata con MgSO₄, filtrata e portata a secco (4.74 g, resa 98.5%).

5-Decil-2,2'-bitiofene. Ad una soluzione di 2,2'-bitiofene (3.5 g, 21 mmol) in 20 mL di benzene anidro a 0°C in bagno di ghiaccio sono stati aggiunti decanoil cloruro (4.5 mL, 22 mmol) e SnCl₄ (2.6 mL, 22.5 mmol). La reazione è stata mantenuta a 0°C per 15 min e poi spenta con qualche cristallo di ghiaccio. La miscela di reazione è stata quindi diluita con CH₂Cl₂, lavata con H₂O e con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, anidrificata con MgSO₄ e portata a secco (6.4 g, resa 95%). Il prodotto è stato solubilizzato in 45 mL di toluene anidro ed aggiunto ad una sospensione di LiAlH₄ (6.0 g, 160 mmol) e AlCl₃ (5.3 g, 40 mmol) in 120 mL di etere etilico anidro a 0°C in bagno di ghiaccio. La miscela è stata lasciata reagire a temperatura ambiente per 1h e poi spenta con 30 mL di etile acetato e 70 mL di HCl 6 M. La fase organica è stata separata per decantazione e la fase acquosa estratta con etere etilico. Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con MgSO₄ e concentrate. Il residuo è stato caricato in colonna di gel di silice ed eluito con etere di petrolio per dare un olio incolore (4.87 g, resa 87%).

5-Decil-5'-tributilstannil-2,2'-bitiofene. Ad una soluzione di 5-decil-2,2'-bitiofene (4.66 g, 15.2 mmol) in 180 mL di THF anidro è stata aggiunta la N,N,N,N-tetrametil-1,2-etilendiammina (2,3 mL, 15.5 mmol). La soluzione è stata raffreddata a -78°C e a questa è stato gocciolato *n*-BuLi 2.0 M (7.75 mL, 15.5 mmol). La miscela è stata lasciata a reagire per 1h a -78°C e poi a questa è stata aggiunta una soluzione di tributilstagno cloruro (4.2 mL, 15.5 mmol) in 10 mL di THF anidro. La miscela di reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e sotto agitazione per altre 2h. E' stato rimosso il solvente per evaporazione ed il residuo liquido ripreso con 180 mL di etile acetato. La fase organica è stata quindi lavata con 180 mL di brine (3 volte) e 180 mL di H₂O (3 volte), anidrificata con MgSO₄ e concentrata al rotavapor (8.8 g, resa 97%).

Estere benzilico dell'acido 4-(5''-Decil-[2,2';5',2'']tertiofene-5-yl)-butirrico.

Una soluzione di 5-decil-5'-tributilstannil-2,2'-bitiofene (8.34 g, 14.0 mmol) e di estere benzilico dell'acido 4-(5-bromo-tiofen-2-yl)-butirrico (4.74 g, 14.0 mmol) in 40 mL di DMF anidra è stata degasata per 40 min. E' stato quindi aggiunto Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.4 g, 0.56 mmol) e la soluzione è stata nuovamente degasata per 40 min. La miscela è stata lasciata reagire per una notte a 80°C, raffreddata a temperatura ambiente e diluita con 200 mL di etile acetato. La fase organica è stata poi lavata con 200 mL di brine (2 volte), con 200 mL di H₂O (4 volte), anidrificata con MgSO₄ e concentrata al rotavapor. Il residuo solido è stato caricato in colonna di gel di silice ed eluito con etere di petrolio/diclorometano 7:3 (4.73 g, resa 60%).

Acido 4-(5''-decil-[2,2';5',2'']tertiofene-5-yl)-butirrico. L'estere (2.25 g, 4.0 mmol) è stato solubilizzato in 180 mL di THF, e alla soluzione sono stati aggiunti 70 mL di una soluzione al 10% di KOH. La miscela è stata lasciata reagire a 70°C per una notte sotto vigorosa agitazione, raffreddata a temperatura ambiente e portata a pH = 2 con HCl 0.5 M. Il solvente organico è stato evaporato e la sospensione acquosa filtrata. Il precipitato è stato lavato abbondantemente con H₂O, metanolo ed etile acetato e seccato sotto vuoto (1.6 g, resa 85%).

2', 3'-O-Isopropilidene-5'-O-4-(5''-decil-[2,2';5',2'']tertiofene-5-yl)-butirric guanosina (11). Ad una soluzione di acido 4-(5''-decil-[2,2';5',2'']tertiofene-5-yl)-butirrico (0.26 g, 0.55 mmol) in 4 mL di THF anidro è stata aggiunta Et₃N distillata (0.14 mL, 1.0 mmol). La soluzione è stata raffreddata a 0°C in bagno di ghiaccio, addizionata di CH₃SO₂Cl (0.04 mL, 0.50 mmol), lasciata reagire a 0°C per 20 min. e poi a temperatura ambiente per altri 60 min. Alla sospensione è stata quindi aggiunta la guanosina (0.16 g, 0.50 mmol), e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata lasciata reagire tutta la notte. La sospensione è stata filtrata e la soluzione concentrata al rotavapor. Il

residuo secco è stato prima cristallizzato da EtOH e poi da etile acetato (0.20 g, resa 50%).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 0.85 (t, 3H, CH_3), 1.31 (m, 14H, CH_2), 1.34 (s, 3H, CH_3), 1.51 (s, 3H, CH_3), 1.62 (m, 2H, CH_2), 1.85 (m, 2H, CH_2), 2.38 (m, 2H, CH_2), 2.79 (m, 4H, CH_2), 4.15 - 4.25 (m, 3H, $\text{H4}'\text{-H5}'\text{-H5}''$), 5.18 (m, 1H, $\text{H3}'$), 5.24 (m, 1H, $\text{H2}'$), 6.01 (d, 1H, $\text{H1}'$), 6.58 (s, 2H, NH_2), 6.80 (m, 2H, Ar-H), 7.16 (m, 4H, Ar-H), 7.87 (s, 1H, H8), 10.73 (s, 1H, NH).

BIBLIOGRAFIA

1. E. Menna, *Innovare*, **2001**, 1, 18.
2. E. Menna, *Innovare*, **2000**, 2, 22.
3. *Biotechnologie 2000*, **2003**, Marzo-Aprile.
4. C. Dekker, M. Ratner, *Physics World*, **2001**, August.
5. H. Han, H. Hurley, *TiPS*, **2000**, 21, 136.
6. S. Borman, *Science/Technology*, **1998**, 5, 42.
7. T. De Lange, *Science*, **1998**, 279, 33.
8. G. P. Spada, A. Carcuro, F. P. Colonna, A. Garbesi, G. Gottarelli, *Liq. Cryst.*, **1998**, 3, 651; P. Mariani, C. Mazabard, A. Garbesi, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 6369.
9. C. Robinson, *Tetrahedron*, **1961**, 13, 219; T. E. Strzelecka, M. W. Davidson, R. L. Rill, *Nature*, **1988**, 331, 457; F. Livolant, A. Levelut, J. Doucet, J. P. Benoit, *Nature*, **1989**, 339, 724.
10. S. Arnott, R. Chandrasekaran, C. M. Martilla, *Biochem. J.*, **1974**, 141, 537; S. B. Zimmermann, G. H. Cohen, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.*, **1975**, 92, 181.
11. G. Gottarelli, G. P. Spada, A. Garbesi, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry – Vol. 9 – Templating, Self-assembly and Self-organization*, edited by J. M. Lehn, Chair Ed. Board, J. P. Sauvage, M. W. Hosseini, Vol. Eds. (Pergamon, Oxford, **1996**), chpt. 13.
12. G. Laughlan, A. I. H. Murchie, D. G. Norman, M. H. Moore, P. C. E. Moody, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *Science*, **1994**, 265, 520.
13. G. Gottarelli, S. Masiero, G. P. Spada, *Enantiomer*, **1998**, 3, 429; G. Gottarelli, G. P. Spada, in *Circular Dichroism, - Principles and Applications*, 2nd ed., edited by N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody (Wiley-VCH, New York, **2000**), chpt. 19.
14. G. Gottarelli, G. Proni, G. P. Spada, *Enantiomer*, **1996**, 1, 201.

15. G. Gottarelli, S. Masiero, G. P. Spada, *Chem. Commun.*, **1995**, 2555.
16. L. A. Marlow, E. Mezzina, G. P. Spada, S. Masiero, J. T. Davis, G. Gottarelli, *J. Org. Chem.*, **1996**, 64, 5116.
17. E. Mezzina, P. Mariani, R. Itri, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, F. Spinozzi, J. T. Davis, G. Gottarelli, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 388.
18. S. L. Forman, J. C. Fettinger, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 4060.
19. S. Pieraccini, G. Gottarelli, P. Mariani, S. Masiero, L. Saturni, G. P. Spada, *Chirality*, **2001**, 13, 7.
20. M. M Cai, A. L. Marlow, J. C. Fettinger, D. Fabris, T. J. Haverlock, B. A. Moyer, J. T. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**, 39, 1283.
21. J. F. Dozol in *New Separation Chemistry Techniques for Radioactive Waste and Other Applications* (Eds. L. Cecile, M. Casati, L. Pietrelli), Elsevier, Amsterdam, **1991**, pp. 163 – 172.
22. S. C. Lee, J. D. Lamb, M. M. Cai, J. T. Davis, *J. Inclusion. Phenom. Macrocyclic Chem.*, **2001**, 40, 51.
23. M. S. Kaucher, W. A. Harrell, Jr and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 38.
24. G. Gottarelli, S. Masiero, E. Mezzina, S. Pieraccini, J. P. Rabe, P. Samorì, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 3242.
25. T. Giorgi, F. Grepioni, I. Manet, P. Mariani, S. Masiero, E. Mezzina, S. Pieraccini, L. Saturni, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 2143.
26. P. Samorì, S. Pieraccini, S. Masiero, G. P. Spada, G. Gottarelli, J. P. Rabe, *Colloids and Surfaces B*, **2002**, 23, 283.
27. R. Rinaldi, G. Maruccio, A. Biasco, V. Arima, R. Cingolani, T. Giorgi, S. Masiero, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Nanotechnology*, **2002**, 13, 398.
28. R. Rinaldi, E. Branca, R. Cingolani, S. Masiero, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Appl. Phys. Lett.*, **2001**, 78, 3541.

29. G. Mariuccio, P. Visconti, V. Arima, S. D'Amico, A. Biasco, E. D'Amore, R. Cingolani, R. Rinaldi, S. Masiero, T. Giorgi, G. Gottarelli, *Nanoletters*, **2003**, 3, 479.
30. T. Giorgi, S. Lena, P. Mariani, S. Masiero, S. Pieraccini, J. P. Rabe, P. Samori, G. P. Spada, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14741.
31. V. Luzzati, In *Biological Membranes*; D. Chapman, Ed.; Academic Press: London, **1968**, 71.
32. G. Gottarelli, G. P. Spada, P. Mariani, In *Crystallography of Supramolecular Compounds*; G. Tsoucaris, J. L. Atwood, J. Lipkowski, Eds., Kluwer: Netherlands, **1996**, 307.
33. P. Mariani, C. Mazabard, A. Garbesi, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 6369.
34. S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. De Morais, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. Ponzi Bossi, G. P. Spada, L. Tondelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 5809.
35. N. Sreerama, R. W. Woody, In *Circular Dichroism: Principles and Applications*; N. Berova, K. Nakanishi, R. Woody, Eds.; Wiley: New York, NY, **2000**, 601 and DNA (Johnson, W. C. In *ibid.*, 703).
36. The STM visualization of the missing quartet in the self-assembled crystal (see supporting information) provides unambiguous evidence that the visualized arrangement is not an imaging artefact.
37. R. Lazzaroni, A. Calderone, J. L. Brédas, J. P. Rabe, *J. Chem. Phys.*, **1997**, 107, 99.
38. S. Lena, M. A. Cremonini, F. Federiconi, G. Gottarelli, C. Graziano, L. Laghi, P. Mariani, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.*, **2007**.
39. D. Haldar, H. Jiang, J. M. Léger, I. Huc, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5609; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5483.

40. D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, Weinheim, **1989**.
41. J. L. Sessler, M. Sathiosatham, K. Doerr, V. Lynch, K. A. Abboud, *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 1356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1300; F. W. Kotch, V. Sidorov, Y. F. Lam, K. J. Kayser, H. Li, M. S. Kaucher, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15140; T. N. Pham, S. Masiero, G. Gottarelli, S. P. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16018.
42. K. Araki, I. Yoshikawa, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 256, 133.
43. *International Tables of X-ray Crystallography*, The Kynoch Press, Birmingham, **1952**.
44. A Yazdani, C. M. Lieber, *Nature*, **1999**, 401, 227. J. K. Gimzewski, C. Joachim, *Polim. Cienc. Tecnol. Science*, **1999**, 283, 1683. P. Samorì, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 1353.
45. R. Otero, M. Schock, L. M. Molina, E. Laegsgaard, I. Stensgaard, B. Hammer, F. Besenbacher, *Angew. Chem.*, **2005**, 117, 2310; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 2270.
46. S. Lena, G. Brancolini, G. Gottarelli, P. Mariani, S. Masiero, A. Venturini, V. Palermo, O. Pandoli, S. Pieraccini, P. Samorì, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.*, **2007**.
47. U. Mitschke, P. Bäuerle, *J. Mater. Chem.*, **2000**, 10, 1471.
48. C. Videlot, A. El Kassmi, D. Fichou, *Solar Energy Mater. Solar Cells*, **2000**, 63, 69.
49. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 7th Ed*, Ed: Molecular Probes NC, **1999**, Eugene, OR; *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-time Analysis*; Ed: W. T. Mason, Academic Press, **1999**.
50. P. B. Oldham, M. E. McCarrol, L. B. McGown, I. M. Warner, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 197; L. M. Wilhelmsson, A. Holmén, P. Lincoln, P.

- E. Nielsen, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 2434; T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6555.
51. M. S. Kaucher, Y. F. Lam, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 164
52. J. T. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, 43, 668.
53. X. Liu, I. C. M. Kwan, S. Wang, G. Wu, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3685.
54. J. Chen, A. R. Murphy, J. Esteve, D. F. Ogletree, M. Salmeron, J. M. J. Fréchet, *Langmuir*, **2004**, 20, 7703.
55. Y. Nicolas, P. Blanchard, E. Levillain, M. Allain, N. Mercier, J. Roncali, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 273.