

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Ambientali: Tutela e Gestione delle Risorse

Naturali

Ciclo XXIV

Settore concorsuale: Chimica Organica: O3/C1

Settore Scientifico disciplinare: CHIM/06

**SVILUPPO DI MATERIALI INNOVATIVI E STUDIO
DELLA LORO INTERAZIONE CON SISTEMI
BIOLOGICI E BIOMIMETICI**

Presentata da: Danilo Malferrari

Coordinatore:

Prof. Enrico Dinelli

Tutor:

Prof. Emilio Tagliavini

Relatore:

Dott. Paola Galletti

Co-Relatore:

Prof. Daniele Fabbri

Esame finale anno 2012

Indice

1 Introduzione	pg. 3
2 Scopo della tesi	pg. 10
3 Sintesi di liquidi ionici ed indagini delle interazioni con sistemi biologici e modelli di membrane cellulari:	pg. 15
3.1 liquidi ionici	pg. 15
3.2 Batteria di test eco-tossicologici sui liquidi ionici	pg. 26
3.3 Liquidi ionici e fusione di membrana	pg. 58
3.4 Polidiacetilene come sonda di membrana	pg. 86
4 Prodotti da pirolisi:	pg. 117
4.1 Prodotti da fonti rinnovabili	pg. 117
4.2 LAC: metodiche di isolamento	pg. 130
4.3 Analisi in offline e preparativa del 4-AcLG come substrato per la sintesi di LAC	pg. 150
4.4 Un nuovo δ -amminozucchero da LAC	pg. 166
5 Conclusioni	pg. 186

1. Introduzione

La chimica sostenibile, o Green Chemistry, è ormai accettata come nuova branca della chimica e costituisce da quindici anni un approccio alternativo alle problematiche che l'utilizzo dei prodotti chimici comportano nella vita di tutti i giorni e per l'ambiente inteso nella sua interezza¹. L'utilizzo di risorse rinnovabili e la diminuzione dell'immissione di sostanze inquinanti in ambiente sono elementi fondamentali per avviare il processo di diminuzione e razionalizzazione del peso della "chimica" a livello industriale.

I primi concetti di chimica sostenibile come *corpus* nascono negli Stati Uniti all'inizio dell'ultimo decennio del XX secolo, tramite l'impegno svolto da alcuni ricercatori dell'U.S. EPA (Environmental Protection Agency)², e poi da organismi quali l'Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT)³ e la National Science Foundation (NSF) che nel 1991 crearono il Green Chemistry Program (GCP).

Un tentativo di sistematizzazione degli strumenti ed obiettivi di questa nuova visione della chimica è nato all'inizio degli anni '90 del Ventesimo secolo ad opera di Paul Anastas, che ha coniato l'espressione green chemistry ed espresso, insieme a John Warner, tali idee con 12 principi basilari⁴:

¹ Green Chemistry, Theory and Practice, Paul T. Anastas e John C. Warner, Oxford Univ. press, 2000.

² www.epa.gov/greenchemistry/

³ http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/epa_gc.html/

⁴ Green Chemistry: An Introductory Text, Mike Lancaster, RCS Publishing, 2010.

1. **Prevenzione.** E' meglio prevenire la formazione di inquinanti che trattarli dopo che sono stati creati.
2. **Atom Economy** ⁵. I metodi sintetici dovrebbero essere progettati per massimizzare l'incorporazione dei materiali utilizzati nei prodotti.
3. **Metodi sintetici meno dannosi.** Quando possibile, i metodi sintetici dovrebbero essere progettati per utilizzare e generare meno sostanze ed il meno tossiche possibile.
4. **Progettazione di prodotti intrinsecamente meno tossici.** I prodotti chimici dovrebbero essere progettati per mantenere le funzioni desiderate diminuendone la pericolosità.
5. **Solventi e ausiliari più sicuri.** L'utilizzo di solventi e sostanze ausiliarie (solventi, agenti di separazione) dovrebbe essere resa non necessaria ed innocua quando possibile.
6. **Progettazione per efficienza energetica.** Le richieste energetiche per i processi chimici dovrebbero essere rivalutate nell'ottica dell'impatto energetico ed economico. Se possibile le reazioni dovrebbero essere condotte a pressione e temperatura ambiente.
7. **Utilizzo di risorse da fonti rinnovabili.** Le risorse e le materie prime dovrebbero essere ottenute da fonti rinnovabili, quando economicamente e tecnicamente fattibile.
8. **Riduzione dei derivati.** La produzione non necessaria di prodotti di derivatizzazione (reagenti derivanti da protezioni, deprotezioni di funzionalità

⁵ B. M. Trost, Science, 1991, 254, 5037, 1471-1477.

chimiche) dovrebbe essere minimizzata in quanto tali tecniche di sintesi determinano la produzione di scarti non necessari.

9. **Catalisi.** I reagenti catalitici (quando possibile selettivi) sono da preferire ai reagenti stechiometrici.
10. **Progettazione per la degradazione.** I prodotti chimici dovrebbero essere progettati per essere degradabili in sostanze innocue alla fine del loro utilizzo in un processo produttivo.
11. **Analisi in tempo reale delle reazioni chimiche.** Le metodologie analitiche dovrebbero essere sviluppate per l'analisi in tempo reale delle reazioni, per il monitoraggio e la prevenzione della formazione di sostanze chimiche pericolose.
12. **Reazioni chimiche più sicure per la prevenzione degli incidenti.** Le sostanze chimiche usate in un processo chimico dovrebbe essere progettate per minimizzare il potenziale di incidenti chimici, inclusi gli incendi e le esplosioni.

Questi principi possono essere applicati a qualsiasi livello del ciclo di vita di un prodotto, dalle materie prime usate per ottenere i reagenti fino alle sostanze di scarto della reazione, adottando quindi un approccio completo ad una reazione chimica.

Guardando alle definizioni di chimica sostenibile, i primi concetti che possono essere espressi sono quelli di progettazione (*design*) e creazione (*invention*). Gli impatti di una sostanza chimica e della via di sintesi della stessa sono in parte contenuti e prevedibili attraverso lo studio dei criteri di progettazione della via sintetica⁶. La definizione di chimica sostenibile contiene anche il termine *pericoloso*. Questo termine va inteso nel senso più ampio; una linea guida relativa alla sostenibilità cerca di unire la prevenzione

⁶ Chemistry for Sustainable Technologies, Neil Winterton, RCS Press, 2010.

dell'inquinamento con la riduzione del rischio, valutando in primo luogo la pericolosità intrinseca delle sostanze utilizzate ed in seguito gli aspetti di pericolosità legati alle condizioni di sintesi. In questo senso quindi in una reazione chimica va considerato il rischio relativo alla reazione nel suo complesso, che risulta essere il prodotto del pericolo e dell'esposizione:

$$\text{Rischio} = \text{Pericolo} \times \text{Esposizione}$$

Un obiettivo generale sarebbe la riduzione del rischio tramite una diminuzione del pericolo ad esso associato; il termine pericolo non è ristretto alla gamma dei pericoli "fisici" di una reazione, come l'esplosività, l'infiammabilità e la corrosività dei reagenti, ma include anche la tossicità acuta e cronica, la cancerogenicità, l'eco-tossicità⁷. Il termine pericolo include anche problematiche legate a fenomeni cosiddetti globali, che si manifestano o agiscono su larga scala geografica, quali il riscaldamento globale, la diminuzione dell'ozono stratosferico, la diminuzione di risorse (con particolare attenzione a quelle non rinnovabili) e fenomeni di bioaccumulo o persistenza delle sostanze chimiche.

Nello specifico, al mio lavoro sono attinenti quei principi della chimica sostenibile riguardanti l'impiego di solventi alternativi ai solventi tradizionali e le sintesi a basso impatto ambientale. Esempi di questi solventi sono i liquidi ionici, l'anidride carbonica in fase supercritica, i solventi fluorurati. L'abbandono o una diminuzione dell'impiego

⁷ Anastas, P., Eghbali, N., 2009, Chem. Soc. Rev., 39, 2010, 301-312.

dei solventi è un elemento importante per la prevenzione dell'inquinamento, inoltre i solventi sono sostanze spesso esplosive e questo determinerebbe una diminuzione dell'impiego di sostanze pericolose. Su questa linea si pone una tendenza della green chemistry che consiste nello svolgere reazioni prive di solventi o che ne impieghino di alternativi, in altre parole solventi dotati di proprietà chimico-fisiche differenti.

Nel campo dell'industria chimica infatti un "peso ambientale" importante è rappresentato dal consumo di grandi volumi di solventi, che sono spesso sostanze dannose per la salute umana, facilmente infiammabili, esplosive, inquinanti diretti o indiretti dell'atmosfera. I liquidi ionici sono una classe di solventi organici alternativi che presentano dei punti di fusione relativamente bassi (al di sotto dei 100 °C) ed hanno attratto interesse come fonte di solventi sostenibili. Tuttavia alcune proprietà di grandi gruppi di liquidi ionici, quali la forte solvatazione di molecole polari e un'alta solubilità in acqua, li rende sostanze pericolose per gli organismi viventi, in particolare da quando è stato dimostrato che molti liquidi ionici sono tossici verso un'ampia gamma di organismi che vivono in ambiente acquatico.

Un'altra branca della ricerca si basa sull'utilizzo dei principi della chimica sostenibile per la produzione di nuove molecole partendo da reagenti ottenuti da fonti rinnovabili.

La ricerca di vie di sintesi alternative a quelle canoniche, che impiegano reagenti da fonti rinnovabili (quali sono le biomasse), che cercano di incorporare al massimo grado i reagenti nei prodotti finali e che quindi producono meno sottoprodotti indesiderati è una parte importante della chimica sostenibile. La pirolisi è una tecnica che consiste nel trattamento termico di un substrato in presenza di atmosfera inerte. Il trattamento pirolitico può essere applicato a diverse tipologie di substrati, tra questi la cellulosa. La cellulosa è il costituente principale delle piante vascolari, e può essere considerata un

combustibile fondamentale se si pensa che a livello mondiale la biomassa soddisfa circa il 10% delle richieste energetiche. Il vantaggio principale della pirolisi come tecnica consiste nella possibilità di convertire in un solo passaggio la biomassa solida in un liquido, il bio-olio, che può essere utilizzato come combustibile o come fonte di sostanze chimiche ad alto valore aggiunto, in quanto composto da molecole versatili, già in parte funzionalizzate.

Oltre ad essere un combustibile il bio-olio può venir utilizzato come fonte di composti chimici, alcuni dei quali hanno strutture promettenti in termini di utilizzi pratici. Tra i composti importanti derivati dalla pirolisi della cellulosa possono essere citati il levoglucosano, il levoglucosenone ed altri composti variamente ossigenati principalmente a 5 e 6 atomi di carbonio, tra i quali una sostanza precedentemente identificata, qui denominata per semplicità LAC ((1R, 5S)-1-idrossi-3,6-dioxa-biciclo [3.2.1] ottan-2-one), ma che ha ricevuto scarsa attenzione in termini di potenzialità sintetiche (Figura 1).

Sono state analizzate diverse vie sintetiche, che prevedono prevalentemente l'impiego della pirolisi catalitica per la sintesi di LAC, confrontando l'effetto catalitico di diverse famiglie di catalizzatori in termini di rese di prodotto e di selettività di reazione.

La sintesi di LAC è stata testata anche in solventi alternativi quali i liquidi ionici, con l'impiego di catalizzatori, partendo da substrati diversi dalla cellulosa.

Nell'ambito di queste ricerche è stato scoperto che quando la pirolisi della cellulosa viene condotta in presenza di nano particelle di alluminio titanato o catalizzatori meso-strutturati (MCM-41) drogati con metalli di transizione - quali lo stagno - si forma LAC, che presenta le caratteristiche giuste per essere un versatile building block. La letteratura scientifica presenta un solo studio su questa sostanza, in cui viene proposta la struttura molecolare⁸.

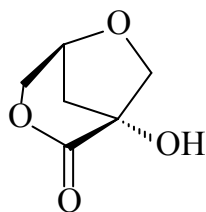


Figura 1: 1'((1R, 5S)-1-idrossi-3,6-dioxa-biciclo [3.2.1] ottan-2-one – LAC.

Questa molecola può essere una buona base di partenza per la produzione di nuove molecole con possibili applicazioni nella chimica fine e farmaceutica.

Lo studio di nuovi liquidi ionici e della loro interazione con membrane cellulari ed il miglioramento delle fasi di sintesi ed isolamento di prodotti ottenuti tramite tecniche di pirolisi catalitica di biomasse vegetali sono state quindi le due tematiche di ricerca affrontate in questo lavoro di tesi.

2. Scopo della tesi

Il lavoro di ricerca svolto durante questa tesi di dottorato si è sviluppato seguendo due tematiche principali. In prima istanza, allo scopo di sviluppare solventi e prodotti più sicuri (4° e 5° principio della Chimica Sostenibile), sono stati sintetizzati una serie di liquidi ionici, famiglia di sostanze che hanno ricevuto negli ultimi decenni considerevole attenzione come solventi alternativi. I liquidi ionici presentano svariati vantaggi applicativi (Capitolo 3.1). Un elenco dei liquidi ionici utilizzati è riportato in Appendice, degli esempi delle molecole sintetizzate sono riportati in Appendice ed in Tabella 2.1.

Successivamente alla sintesi si è posta l'attenzione sullo studio degli effetti biologici di queste sostanze, volendo indagare gli effetti e le tipologie di interazioni che i liquidi ionici hanno con i doppi strati fosfolipidici, componenti base delle membrane cellulari, primi sistemi biologici di difesa degli organismi viventi⁸.

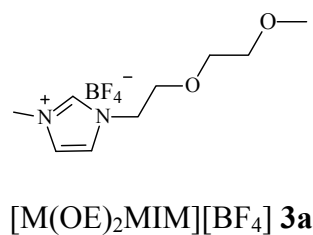
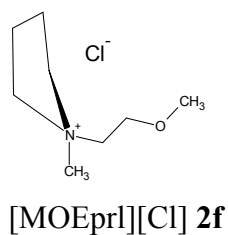
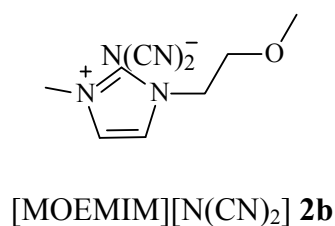
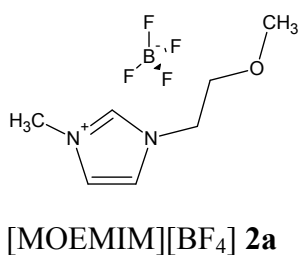
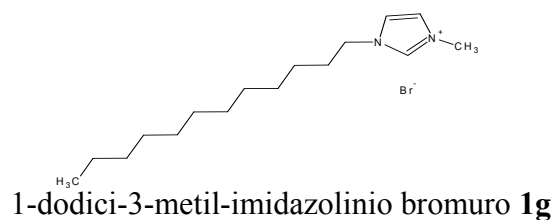
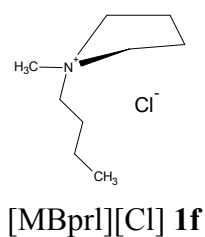
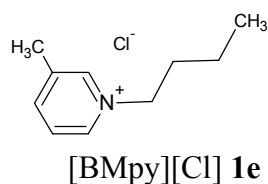
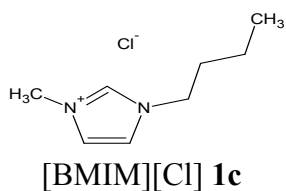
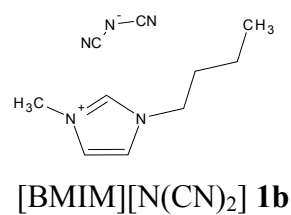
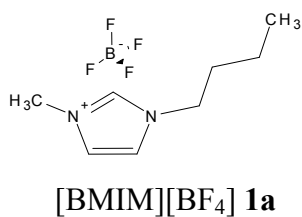
Lo studio degli effetti sulle membrane è stato condotto con il seguente approccio:

- Analisi della tossicità di un gruppo di liquidi ionici tramite una batteria di test eco-tossicologici.
- Studio dell'effetto di liquidi ionici con differente struttura cationica su modelli di membrana, tramite l'impiego di sonde fluorescenti.

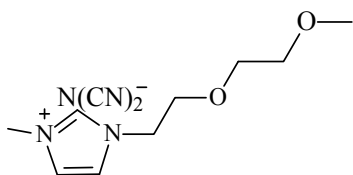
⁸ Engelman, D.M., Nature, 438, 2005, 578-580.

- Analisi degli effetti su diverse strutture lipidiche di membrana, per mezzo di test biochimici che impiegano domini composti dalla sonda biomimetica polidiacetilene (PDA)⁹.

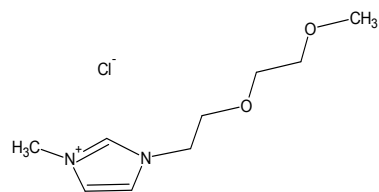
Tabella 2.1: Strutture dei liquidi ionici sintetizzati od utilizzati in questa tesi.



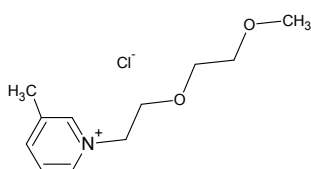
⁹ Okada, S., Peng, S., Spevak, W., Charich, D., Acc. Chem. Res., 1998, 31, 5, 229–239.



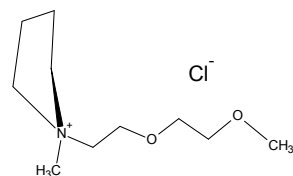
[M(OE)₂MIM][N(CN)₂] 3b



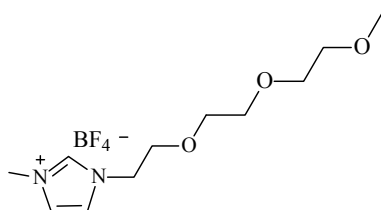
[M(OE)₂MIM][Cl] 3c



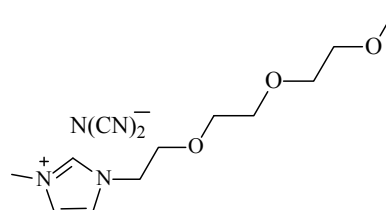
[M(OE)₂py][Cl] 3e



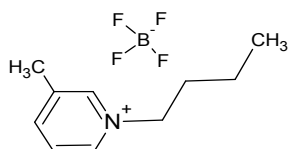
[M(OE)₂prl][Cl] 3f



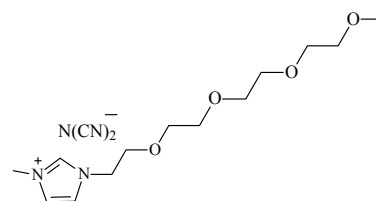
[M(OE)₃MIM][BF₄] 4a



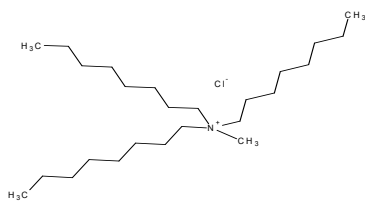
[M(OE)₃MIM][N(CN)₂] 4b



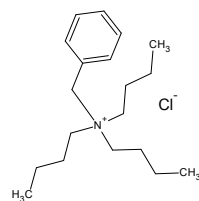
[BMpy][BF₄] 4e



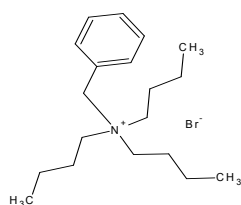
[M(OE)₄MIM][N(CN)₂] 5b



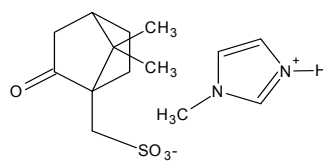
Aliquat 366 Cl 6a



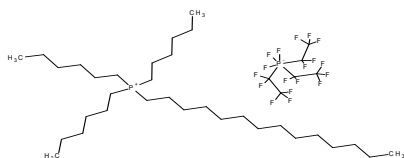
BTAC 6b



BTAB 6c



**Acido H-metilimidazolinio
canforsolfonico 6d**



C66614 6e

Questa parte di lavoro di ricerca è fondata sulla necessità di identificare quelli che sono i meccanismi di interazione di queste sostanze con le membrane cellulari, al fine di progettare molecole, da impiegare come solventi e come materiali, maggiormente sicuri e meno tossici per gli organismi viventi e per l'ambiente.

Il 7° principio della chimica sostenibile ha trovato applicazione nello studio dei metodi di purificazione, nell'ottenimento e nell'aumento delle rese di prodotti ottenuti tramite tecniche di pirolisi catalitica di biomasse vegetali.

Nello specifico ci si è concentrati principalmente sull'ottenimento di due molecole dalla pirolisi di cellulosa condotta con catalizzatori mesostrutturati drogati con stagno (Sn-MCM). Per le sostanze ottenute, due anidro-zuccheri, rispettivamente LAC e l'1,6-3,4-β-dianidroglicopiranoside (DGP) sono state indagate le migliori tecniche di purificazione ed alcune applicazioni.

- Ottenimento della sostanza LAC ad un alto grado di purezza, per poterla utilizzare in sintesi di composti ad attività biologica (Capitolo 4.4).
- Analisi delle vie di sintesi alternative, che includono substrati differenti, ma ugualmente ottenibili da fonti rinnovabili, la cellulosa ed il levoglucosano (LG).
- Sintesi di composti a valore aggiunto dalle molecole isolate dal bio-olio.

- Impiego di varie tipologie di catalizzatori, solventi e ausiliari di reazione quali i liquidi ionici. L'azione di queste condizioni di reazione è stata valutata insieme all'utilizzo di tecniche alternative quali le microonde.

3 Sintesi di liquidi ionici ed indagini delle interazioni con sistemi biologici e modelli di membrane cellulari

3.1 I liquidi ionici

I liquidi ionici vengono definiti come dei sali organici che si trovano allo stato liquido a temperatura ambiente, sono costituiti da ioni asimmetrici ed ingombrati che rendono difficile l'impaccamento necessario alla cristallizzazione. In quanto sali hanno una tensione di vapore non misurabile con dispersione nell'ambiente più facilmente controllabile e minimizzabile rispetto ai solventi tradizionali. Essendo molto elevato il numero di combinazioni ottenibili modificando l'anione ed il catione è facilmente comprensibile che con il termine liquidi ionici si intende un numero indefinito di diverse entità chimiche. La ricerca in questo campo è nata all'inizio del novecento, con la scoperta che l'etilammonio nitrato è liquido a temperatura ambiente¹⁰. Durante il corso degli anni sessanta e settanta i liquidi ionici sono stati studiati in applicazioni nel campo dell'elettrochimica mentre l'analisi delle proprietà chimico fisiche è un campo che sta venendo sviluppato recentemente.

Fino ad oggi l'attenzione verso questa classe di solventi e composti si è concentrata principalmente sulla sintesi di sostanze con proprietà chimico-fisiche particolari (ILs di prima generazione), quali l'assenza di volatilità o la maggiore stabilità termica e sulla progettazione di nuove sostanze che posseggano proprietà particolari (ILs di seconda generazione)¹¹. Il raggiungimento di specifiche e desiderabili proprietà biologiche (ILs

¹⁰ Walden, P., 1914, Bull. Acad. Sci. St. Petersburg, 405-422.

¹¹ Yadav, J.S, Reddy,B.V.S, Basak, A.K, Narsaiah V., Tetrahedron, 60, 9, 2004, 2131–2135.

di terza generazione) è recentemente cresciuto di interesse, diventando uno dei principali obiettivi per la progettazione di sostanze specifiche¹².

La scelta del catione e dell'anione è fondamentale nel selezionare le proprietà chimico-fisiche di queste sostanze, come ad esempio la solubilità in acqua, la viscosità, variabili importanti per la selettività di una reazione, per l'impiego di catalizzatori, per la tossicità verso gli organismi viventi, la persistenza in ambiente¹³.

In Figura 3.1 sono riportate alcune delle strutture più diffuse di liquidi ionici.

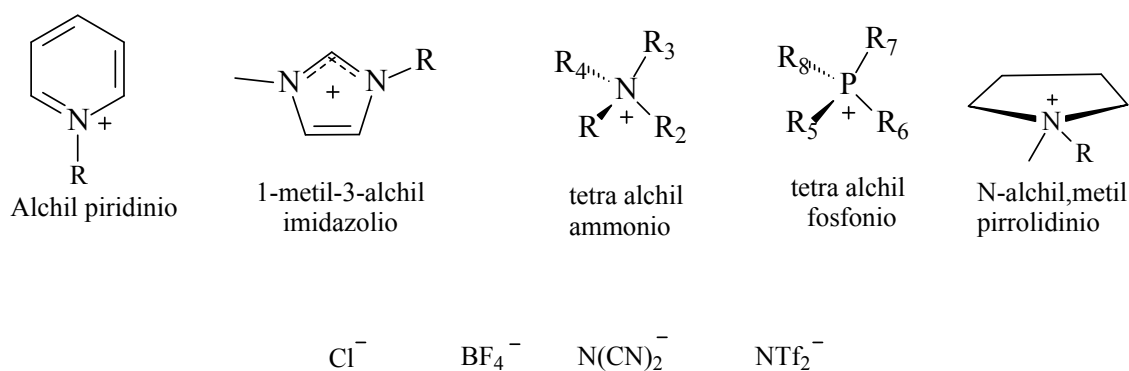


Figura 3.1: Cationi ed anioni comuni di liquidi ionici.

Queste sostanze hanno ricevuto considerevole attenzione da parte della comunità scientifica negli ultimi decenni grazie alle loro uniche proprietà fisico-chimiche come la scarsa volatilità, un'ampia finestra elettrochimica, la non infiammabilità (anche se questa proprietà non è sempre presente¹⁴) un'alta stabilità termica ed un ampio intervallo di temperatura in cui si trovano allo stato liquido^{15 16}.

¹² Hough, W.L., Smiglak, M., Rodri'guez, H., Swatloski, R.P., Spear, S.K., Daly, D.T., Pernak, J., Grisel, J.E., Carliss, R.D., Soutullo, M.D., Davis, J.H., Rogers, R.D., 2007. *New J. Chem.* 31, 1429–1436.

¹³ Ranke, J., Stolte, S., Störmann, R., Arning, J., Jastorff, B., 2007. *Chem. Rev.* 107, 2183-2206.

¹⁴ Marcin Smiglak, W. Mathew Reichert, John D. Holbrey, John S. Wilkes, Luyi Sun, Joseph S. Thrasher, Kostyantyn Kirichenko, Shailendra Singh, Alan R. Katritzky and Robin D. Rogers, *Chem. Commun.*, 2006, 2554-2556.

¹⁵ Rogers, R. D.; Voth, G. A. *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 1077–1078.

¹⁶ *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 1079-1236.

Essendo liquidi a temperatura ambiente ed essendo generalmente accomunati da tensioni di vapore nulle, non sono rilasciati facilmente in atmosfera, diversamente da molti solventi organici (sostanze clorate, eteri, etc) comunemente impiegati in sintesi di prodotti chimici ed altre applicazioni in impianti a livello industriale^{17 18}.

Per la stragrande maggioranza dei liquidi ionici devono ancora essere chiarite le metodiche di interazione con i “sistemi biologici”, le diverse tipologie di tossicità che possono generare, specialmente se rilasciati in ambienti acquatici.

In letteratura l’impatto ambientale dei liquidi ionici e la loro reale sostenibilità è stata analizzata in una serie di studi interdisciplinari^{19 7 20}, riassunta recentemente²¹ sottolineando l’importanza di un’analisi preventiva nella fase di progettazione della struttura dei liquidi ionici, da un punto di vista tecnologico, tossicologico ed ecotossicologico. In particolare il rischio associato ai liquidi ionici dovrebbe essere analizzato considerando una serie di fattori, tra i quali il rilascio in ambiente, la biodegradabilità e l’attività biologica.

Sono stati sviluppati degli studi recenti che riguardano la biodegradabilità²² e l’attività biologica di un ampio gruppo di liquidi ionici. L’attività biologica dei liquidi ionici è stata investigata in profondità in molti studi riguardanti le alghe^{23 24 25 7 26 27 28 29 30 31}

¹⁷ Welton, T. 1999. *Chem. Rev.* 99, 2071-2083.

¹⁸ Wasserscheid, P., Welton, T., 2007 Wiley-VCH, Weinheim, 2nd ed.

¹⁹ Matzke, M., Stolte, S., Thiele, K., Juffernholz, T., Arning, J., Ranke, J., Welz-Biermann, U., Jastorff, B., 2007. *Green Chem.* 9, 1198-1207.

²⁰ Stolte, S., Matzke, M., Arning, J., Bösch, A., Pitner, W.R., Welz-Biermann, U., Jastorff, B., Ranke, J., 2007. *Green Chem.* 9, 1170-1179.

²¹ Thuy Pham, T. P., Cho, C.-W., Yun, Y.-S., 2010. *Water Research.* 44, 352-372.

²² Coleman, D., Gathergood, N., 2010. *Chem. Soc. Rev.* 39, 600-637.

²³ Latała, A., Stepnowski, P., Nęddzi, M., Mroziak, W., 2005. *Aquat. Toxicol.* 73, 91-98.

²⁴ Wells, A.S., Coombe, V.T., 2006. *Org. Process Res. Dev.* 10, 4, 794-798.

²⁵ Cho, C.W., Pham, T.P.T., Jeon, Y.C., Vijayaraghavan, K., Choe, W.S., Yun, Y.S., 2007. *Chemosphere.* 69, 6, 1003-1007.

²⁶ Cho, C.; Jeon, Y.; Pham, T.; Vijayaraghavan, K.; Yun, Y., 2008. *Ecotox. Environ. Safe.* 71, 1, 166-171.

²⁷ Cho, C., Pham, T., Jeon, Y., Yun, Y., 2008. *Green Chem.* 10, 67-72.

²⁸ Kulacki, K.J., Lamberti, G.A., 2008. *Green Chem.* 10, 104-110.

³² ³³ ³⁴, piante terrestri ³⁵ ³⁶, pesci ³⁷ ²³, mammiferi ed anfibi ³⁸ ³⁹, invertebrati del terreno ⁴⁰ ⁴¹ ¹⁰ ⁴², molluschi e crostacei ⁴³ ⁴⁴ ⁴⁵ ⁴⁶ ⁴⁷ ⁴⁸ ²⁵, funghi ⁴⁹ ⁵⁰, e batteri ⁵¹ ⁵² ⁵³.

Tutti questi studi hanno indicato che i liquidi ionici possono esser dannosi per gli organismi acquatici terrestri ed è stata trovata una relazione lineare tra la lipofilità delle specie cationiche e gli effetti tossici dei liquidi ionici. Il contributo alla tossicità dei liquidi ionici è dato principalmente dalle caratteristiche strutturali dei cationi, benché il contributo dell'anione può contribuire significativamente verso alcuni organismi, ad esempio verso la microalga d'acqua dolce *Selenastrum capricornutum* ¹⁷.

Altri studi hanno mostrato che i liquidi ionici hanno un effetto sulle strutture cellulari e subcellulari a diversi livelli biologici. Gli effetti di vari liquidi ionici sono stati indagati

²⁹ Pham, T.P.T, Cho, C.W., Min, J., Yun, Y.S., 2008. J. Biosci. Bioeng. 105, 4, 425–428.

³⁰ Latała, A., Nędzi, M., Stepnowski, P., 2009. Green Chem. 11, 580-588.

³¹ Latała, A., Nędzi, M., Stepnowski, P., 2009. Green Chem. 11, 1371-1376.

³² Pretti, C., Chiappe, C., Baldetti, I., Brunini, S., Monni, G., 2009. Ecotoxicol. Environ. Safe. 72, 4, 1170-1176.

³³ Latała, A., Nędzi, M., Stepnowski, P., 2010. Green Chem. 12, 60-64.

³⁴ Ventura, S.P.M., Goncalves, A.M.M., Goncalves, F., Coutinho, J.A.P., 2010. Aquat. Toxicol. 96, 290–297.

³⁵ Larson, J.H., Frost, P.C., Lamberti, G.A., 2008. Environ. Toxicol. Chem. 27, 3, 676–681.

³⁶ Matzke, M., Stolte, S., Arning, J., Uebers, U., Filser, J., 2008. Green Chem. 10, 584–591.

³⁷ Pretti, C., Chiappe, C., Pieraccini, D., Gregori, M., Abramo, F., Monni, G., Intorre, L., 2006. Green Chem. 8, 238–240.

³⁸ Li, X.Y., Zhou, J., Yu, M., Wang, J.J., Pei, Y.C., 2009. Ecotox. Environ. Safe. 72, 552-556.

³⁹ Yu, M., Li, S., Li, X., Zhang, B., Wang, J., 2008. Ecotoxicol. Environ. Safe. 71, 903–908.

⁴⁰ Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., Memon, S.B., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Rogers, R.D., 2004. Chem. Commun. 668-669.

⁴¹ Bernot, R.J, Brueseke, M.A., Evans-White, M.A., Lamberti, G.A., 2005. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1, 87-94.

⁴² Luo, Y.R., Wang, S.H., Yun, M.X., Li, X.Y., Wange, J.J., Sun, Z.J., 2009. Chemosphere. 77, 313–318.

⁴³ Bernot, R.J, Kennedy, E.E., Lamberti, G.A., 2005. Environ. Toxicol. Chem. 24, 7, 1759-1765.

⁴⁴ Garcia, M.T., Gathergood, N., Scammells, P.J., 2005. Green Chem. 7, 1, 9-14.

⁴⁵ Couling, D.J., Bernot, R.J., Docherty, K.M., Dixon, J.K., Maginn, E.J., 2006. Green Chem. 8, 1, 82–90.

⁴⁶ Samori, C., Pasteris, A., Galletti, P., Tagliavini, E., 2007. Environ. Toxicol. Chem. 26, 11, 2379-2382.

⁴⁷ Luo, Y., Li, X., Chen, X., Zhang, B., Sun, Z., Wang, J., 2008. Environ. Toxicol., 23, 6, 736-744.

⁴⁸ Costello, D.M., Brown, L.M., Lamberti, G.A., 2009. Green Chem. 11, 4, 548-553.

⁴⁹ Petkovic, M., Ferguson, J., Bohn, A., Trindade, J., Martins, I., Carvalho, M.B., Leitão, M.C., Rodrigues, C., Garcia, H., Ferreira, R., Seddon, K.R., Rebelo, L.P.N., Silva Pereira, C., 2009. Green Chem. 11, 889–894.

⁵⁰ Petkovic, M., Ferguson, J., Gunaratne, H.Q.N., Ferreira, R., Leitão, M.C., Seddon, K.R., Rebelo, L.P.N., Silva Pereira, C., 2010. Green Chem. 4, 643-649.

⁵¹ Ranke, J., Molter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczobutt, J., Hoffmann, J., Ondruschka, B., Filser, J., Jastorff, B., 2004. Ecotoxicol. Environ. Safe. 58, 396–404.

⁵² Docherty, K.; Kulpa, C., 2005. Green Chem. 7, 185–189.

⁵³ Romero, A., Santos, A., Tojo, J., Rodríguez, A., 2008. J. Hazard. Mater. 151, 1, 268–273.

con differenti linee cellulari ed umane a varie condizioni di esposizione^{42 54 55 56 57 58}
^{59 60 61}. Sono stati riportati anche gli effetti sull'attività enzimatica
dell'acetilcolinesterasi (AChE)^{62 63 33}, dell'AMP deaminasi⁶⁴ e gli effetti sull'attività
detossificante di enzimi ad attività antiossidante^{65 30 66}. In tutti i casi, un aumento della
lipofilicità della sostanza è corrisposto ad un aumento della tossicità, a diversi livelli di
organizzazione biologica, così come per gli organismi interi. In particolare certi ILs
hanno determinato una forte inibizione dell'attività dell'AChE, suggerendo che la neuro
tossicità è un effetto da tenere in considerazione per quel che riguarda la tossicità di
queste sostanze, in particolare di quelle dotate di lunghe catene alchiliche. I dati raccolti
riguardo la tossicità dei ILs sottolineano la necessità della comprensione degli effetti
biologici di queste sostanze a diversi livelli di organizzazione biologica. Una buona
conoscenza delle loro proprietà è critica per la selezione e la modulazione delle loro
caratteristiche, al fine di ridurre il rischio per la salute umana e per l'ambiente; inoltre è
cruciale la conoscenza delle loro caratteristiche biologiche, al fine della realizzazione
delle metodiche REACH (EC 1907/2006; Registration, Evaluation, Authorization of

⁵⁴ Stepnowski, P., Skladanowski, A.C., Ludwiczak, A., Laczyńska, E., 2004. *Hum. Exp. Toxicol.* 23, 11, 513-517.

⁵⁵ Stolte, S., Arning, J., Bottin-Weber, B., Matzke, M., Stock, F., Thiele, K., Uerdingen, M., Welz-Biermann, U., Jastorff, B., Ranke, J., 2006. 8, 621-629.

⁵⁶ Frade, R.F.M., Matias, A., Branco, L.C., Afonso, C.A.M., Duarte, C.M.M., 2007. *Green Chem.* 9, 8, 873-877.

⁵⁷ Garcia-Lorenzo, A., Tojo, E., Tojo, J., Teijeira, M., Rodriguez-Berrocal, F., Pérez González, M., Martinez-Zorzano, V., 2008. *Green Chem.* 10, 508-516.

⁵⁸ Ranke, J., Müller, A., Bottin-Weber, U., Stock, F., Stolte, S., Arning, J., Störmann, R., Jastorff, B., 2007. *Ecotox. Environ. Safe.* 67, 430-438.

⁵⁹ Wang, X., Ohlin, C.A., Lu, Q., Fei, Z., Hub, J., Dyson, P.J., 2007. *Green Chem.* 9, 1191-1197.

⁶⁰ Kumar, A., Papaiconomou, N., Lee, J., Salminen, J., Clark, D., Prausnitz, J., 2008. *Environ. Toxicol.* 388-395.

⁶¹ Frade, R.; Rosatella, A.; Marques, C.; Branco, L.; Kulkarni, P.; Mateus, N.; Afonso, C.; Duarte, C., 2009. *Green Chem.* 11, 1160-1165.

⁶² Stock, F., Hoffmann, J., Ranke, J., Störmann, R., Ondruschka, B., Jastorff, B., 2004. *Green Chem.* 6, 286-290.

⁶³ Arning, J., Stolte, S., Bösch, A., Stock, F., Pitner, W.R., Welz-Biermann, U., Jastorff, B., Ranke, J., 2008. *Green Chem.* 10, 47-58.

⁶⁴ Skladanowski, A.C., Stepnowski, P., Kleszczyński, K., Dmochowska, B., 2005. *Environ. Toxicol. Phar.* 19, 2, 291-296.

⁶⁵ Lan Tee, K., Roccatano, D., Stolte, S., Arning, J., Jastorff, J., Schwaneberg, U., 2008. *Green Chem.* 10, 117-123.

⁶⁶ Yu, M., Wang, S.H., Luo, Y.R., Han, Y.W., Li, X.Y., Zhang, B.J., Wang J.J., 2009. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72, 1798-1804.

Chemical substances)⁶⁷. La normativa REACH nasce per la creazione di un sistema integrato di registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche, e istituisce un'agenzia europea per tali prodotti (ECHA). Obbliga le imprese che fabbricano e importano sostanze chimiche a valutare i rischi derivanti dal loro uso ed a prendere le misure necessarie per gestire qualsiasi rischio venga individuato. L'onere della prova con riguardo alla sicurezza delle sostanze chimiche fabbricate o commercializzate spetta all'industria.

In questa prospettiva la riduzione della produzione e della movimentazione dei classici solventi organici - o la ricerca di alternative a questi - si inserisce a pieno nelle tendenze e nella visione che sostengono tale normativa. Anche se la sostituzione delle sostanze maggiormente dannose è un elemento chiave della normativa REACH, allo stesso tempo, al fine di ridurre il numero di test su organismi animali, la direttiva REACH incoraggia fortemente l'utilizzo di alternative, ad esempio lo sviluppo e lo utilizzo di tecniche in vitro per l'identificazione delle potenzialità tossiche di una sostanza a livello cellulare e subcellulare.

Seguendo questa linea concettuale in lavori precedenti del gruppo di ricerca dove ho svolto il dottorato e durante questa tesi sono stati sintetizzati un pool di liquidi ionici con catione imidazolino e catene polietossilate nel catione, ed accomunati dalla presenza di anioni che li rendono solubili in ambiente acquoso. Sono stati analizzati gli effetti che queste sostanze hanno su cellule in coltura di diverse linee cellulari, tramite saggi di inibizione enzimatica e di vitalità cellulare. Si è cercato in questo senso di raccogliere un pool di informazioni che dessero un quadro degli effetti tossici a diversi livelli di organizzazione biologica. In generale sono state riscontrate delle differenze

67 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm

significative tra l'effetto dei liquidi ionici con strutture alchiliche, più lipofili e più tossici, e liquidi ionici con catene etossilate e polietossilate (Capitolo 3.2).

3.1.1 Liquidi ionici imidazolinici

I liquidi ionici di tipo imidazolinico sono una promettente classe di sostanze con importanti proprietà solventi, come un'alta solubilità per le sostanze polari (ad esempio i carboidrati)⁶⁸, caratteristiche interessanti come mezzi di reazione per processi catalitici e biocatalitici⁶⁹ e per le reazioni di catalisi asimmetrica⁷⁰, alta selettività di sostanze gassose come la CO₂¹¹, utilizzata in processi di separazione gassosa, e la possibilità di essere utilizzate in celle fotoelettriche come pigmenti fotosensibili⁷¹, e come stabilizzanti di nano particelle⁷². Come accennato, in lavori precedenti è stato dimostrato che l'introduzione di un singolo atomo di ossigeno nella catena laterale della struttura imidazolinica diminuisce la tossicità rispetto ai ILs corrispondenti costituiti da analoghe strutture ma con sostituenti alchilici verso il crostaceo *Daphnia magna* ed il batterio *Vibrio fischeri*³⁷, benché diminuisca anche la degradabilità nel terreno⁷³.

68 Pinkert, A., Marsh, K.N., Pang, S., Staiger, M.P., 2009. Chem. Rev. 109, 6712-6728.

69 Galletti, P., Moretti, F., Samori, C., Tagliavini, E., 2007. Green Chem. 9, 987-991.

70 Branco, L., Afonso, C.A.M., 2004. J. Org. Chem. 69, 13, 4381- 4389.

71 Stathatos, E., Lianos, P., Jovanovski, V., Orel, B., 2005. J. Photoch. Photobio. A.. 169, 1, 57-61.

72 Schrekker, H.S., Gelesky, M.A., Stracke, M.P., Schrekker, C.M.L., Machado, G., Teixeira, S.R., Rubim, J.C., Jairton, Dupont J., 2007. J. Colloid Interf. Sci. 316, 1, 189-195.

73 Modelli, A., Sali, A., Galletti, P., Samori, C., 2008. Chemosphere. 73, 1322-1327.

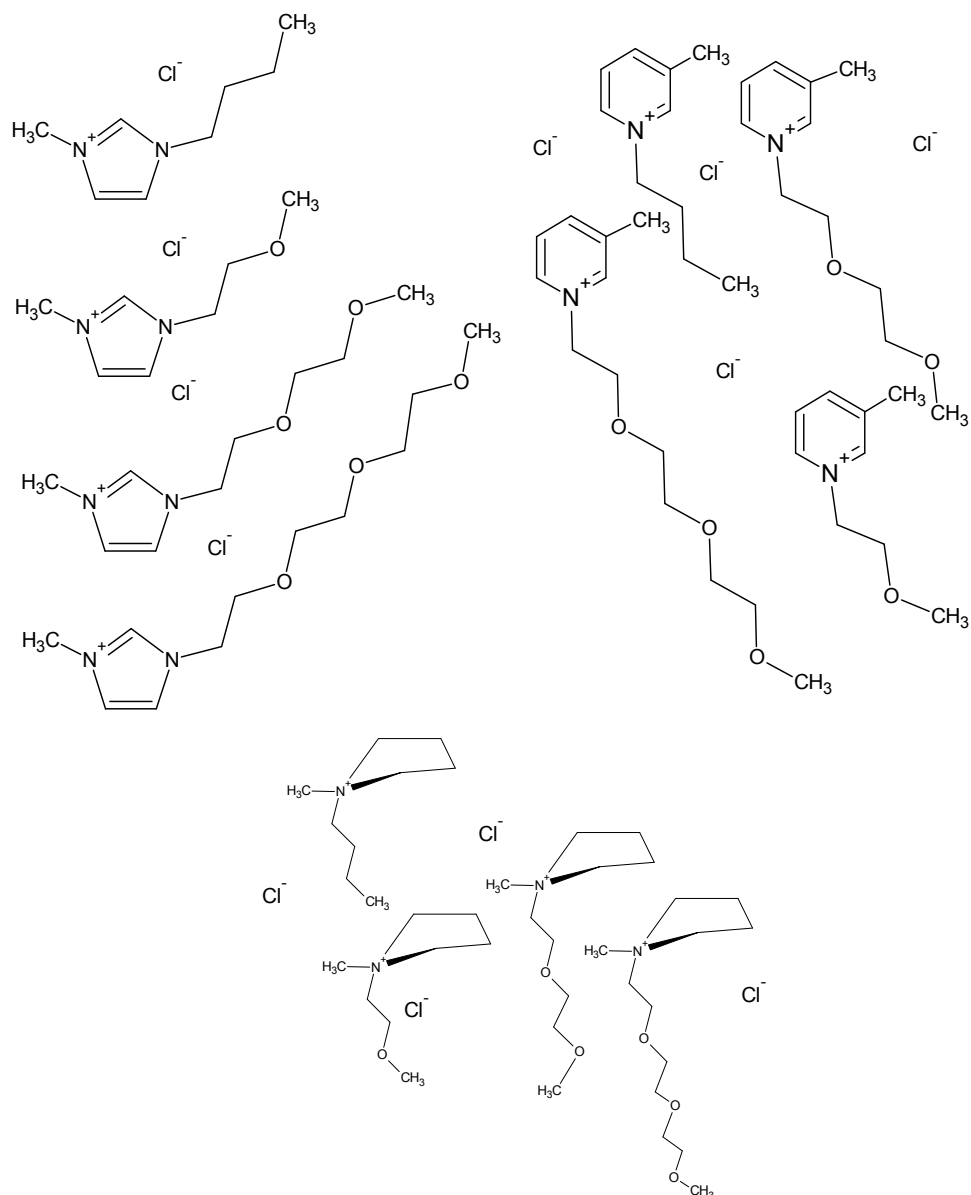


Figura 3.1.1: Alcuni esempi di ILs con catene laterali ossigenate nella struttura

cationica utilizzati in questo lavoro e nei successivi capitoli.

Durante questo lavoro di tesi è stato ulteriormente indagato quale peso abbia la lunghezza della catena polietossilata nel determinare la tossicità del liquido ionico, per capire se questo parametro causa gli stessi effetti a diversi livelli di organizzazione biologica, e segue la tendenza di riduzione della tossicità diminuendo la lipofilicità del catione³⁷. Abbiamo sintetizzato una serie di liquidi ionici ossigenati, con un numero crescente di atomi di ossigeno nella catena laterale, da 1 a 4, e valutato gli effetti biologici su varie funzioni cellulari. I risultati sono stati confrontati con gli effetti di tipo

liquidi ionici con catene alchiliche come il classico 1-butil-3-metilimidazolinio (BMIM). Come contro ione abbiamo utilizzato l'anione tetrafluoroborati (BF₄) e dicianamide N(CN)₂. E' stato indicato che la maggior parte delle specie anioniche non hanno influenza sull'inibizione della bioluminescenza del batterio *V. fischeri* e sull'attività dell'AChE^{74 54}. Al contrario alcuni studi sulla tossicità *in vitro* dei liquidi ionici^{45 46 52 49} ed i loro effetto acuti sul crostaceo *Daphnia magna*^{34 36} hanno mostrato che l'effetto dell'anione non è trascurabile, anche se in entrambe i casi gli anioni tetrafluoroborato e dicianamide hanno effetti simili e confrontabili.

Gli effetti dei liquidi ionici polietossilati sono stati quindi valutati attraverso test di tossicità acuta con *D. magna* (immobilizzazione) ed il batterio *V. fischeri* (inibizione della luminescenza). Per investigare gli effetti a livelli cellulari e subcellulari è stata condotta una serie di test impiegando cellule di linee cellulari PC12 da feocromocitoma di ratto; la vitalità cellulare è stata analizzata impiegando un test spettrofotometrico MTT-Test, il leakage dell'enzima lattato deidrogenasi è stato valutato come end-point dell'integrità di membrana, e l'analisi dell'AChE è stata misurata per analizzare se l'enzima è un possibile target dei liquidi ionici. La misura del rilascio dell'LDH è stato invece utilizzato come end-point di tossicità cellulare vò sottolineato come questo sia il primo studio che coinvolge questo particolare test con liquidi ionici.

Inoltre, questo è stato il primo studio in cui l'inibizione dell'AChE viene misurata su linee cellulari, dal momento che molti studi riportano in letteratura l'inibizione dell'AChE isolata dall'organo elettrico dell'anguilla elettrica eel^{53 54}, e l'AChE viene misurata attivamente nell'omogenato cellulare³³. In uno studio recente Luo et al.⁴²

⁷⁴ Luis, P., Ortiz, I., Aldaco, R., Irabien, A., 2007. Ecotoxicol. Environ. Safe. 67, 423–429.

hanno mostrato che l'inibizione dell'attività dell'AChE in organismi viventi (vermi terricoli) esposti ad una serie di liquidi ionici imidazolinici con anione bromuro, nei quali le sostanze sono state assorbite attraverso la pelle.

Per finire, i liquidi ionici più e meno tossici sono stati confrontati attraverso un test di anisotropia di membrane, per valutare i cambiamenti di fluidità nei doppi strati lipidici, in membrane modello di dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), utilizzando la sonda fluorescente difenilesatriene (DPH), a diverse temperature e concentrazioni di liquidi ionici.

A causa della natura micellare dei liquidi ionici con catene alchiliche, sono stati utilizzati come solventi e mezzi in sistemi auto-organizzanti, dotati di proprietà anfifiliche, in sistemi micellari⁷⁵, come catalizzatori a trasferimento di fase⁷⁶ e come cristalli liquidi⁷⁷. In letteratura c'è abbondanza di dati riguardo a misure di proprietà micellari di liquidi ionici dotati di lunghe catene alchiliche⁷⁸, ma sono ancora scarse le conoscenze riguardo al comportamento dei liquidi ionici con corte catene alchiliche, o che presentano atomi di ossigeno nelle catene laterali del catione. E' stata rivolta scarsa attenzione agli effetti che i liquidi ionici hanno sulle proprietà delle membrane citoplasmatiche, o con modelli di membrana, sebbene molti liquidi ionici hanno delle caratteristiche strutturali che li fanno rassomigliare molto a sostanze anfifiliche, che presentano un comportamento del tutto simile a quello dei surfattanti^{79 80}. Sono state condotte delle ricerche preliminari sugli effetti di liquidi ionici con diverse lunghezze delle catene alchiliche dal gruppo di Evans⁹⁹, evidenziando che i liquidi ionici

⁷⁵ Sifaoui, H.; Lugowska, K.; Domańska, U.; Modaressi, A.; Rogalski, M. *J Colloid Interf Sci* 2007, 314, 643-650.

⁷⁶ Derea, R. T.; Pala, R. R.; Patila, S. P.; Salunkhe, M. *Tetrahedron Lett* 2003, 44, 5351-5353.

⁷⁷ Neve, F.; Francescangeli, O.; Crispini, A.; Charmant, J. *Chem. Mater.* 2001, 13, 2032-2041.

⁷⁸ Anderson, J. L.; Pino, V.; Hagberg, E. C.; Shares, V. V.; Armstrong, D. W. *Chem. Commun.* 2003, 2444-2445.

⁷⁹ Samori, C.; Malferrari, D.; Valbonesi, P.; Montecavalli, A.; Moretti, F.; Galletti, P.; Sartor, G.; Tagliavini, E.; Fabbri, E.; Pasteris, A. *Ecotox Environ Safe* 2010, 73, 1456-1464.

⁸⁰ Evans, K. O. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2006, 274, 11-17.

imidazolinici con catene alchiliche più lunghe di 6 atomi di carbonio alterano fortemente la membrana plasmatica, inducendo un esteso fenomeno di leakage del contenuto cellulare (a concentrazioni superiori a 100 mM), fino a distruggere completamente le membrane modello. I liquidi ionici con corte catene alchiliche (fino 4 atomi di carbonio), anche a concentrazioni che raggiungono i 500 mM, inducono un basso valore di leakage, e non sono responsabili di fenomeni di distruzione di membrana cellulare. Un altro studio che impiega liposomi come modelli di membrana⁸¹ ha mostrato che liquidi ionici di tipo *N,N,N*-trialchilammoniodecaidroborato sono in grado di indurre all'incirca un leakage dell'80% del contenuto anche a basse concentrazioni (0.05-0.5 mM per sostanze con 4 o 6 atomi nelle catene laterali). In tutti i casi i dati raccolti hanno dimostrato che la capacità di queste sostanze di indurre leakage è correlata con le caratteristiche della catena laterale, ma sarebbe fortemente riduttivo semplificarle solo con la lunghezza.

⁸¹ Schaffran, T.; Justus, E.; Elfert, M.; Chen, T.; Gabel, D. *Green Chem.* 2009, 11, 1458-1464.

3.2 Batteria di test eco-tossicologici su liquidi ionici

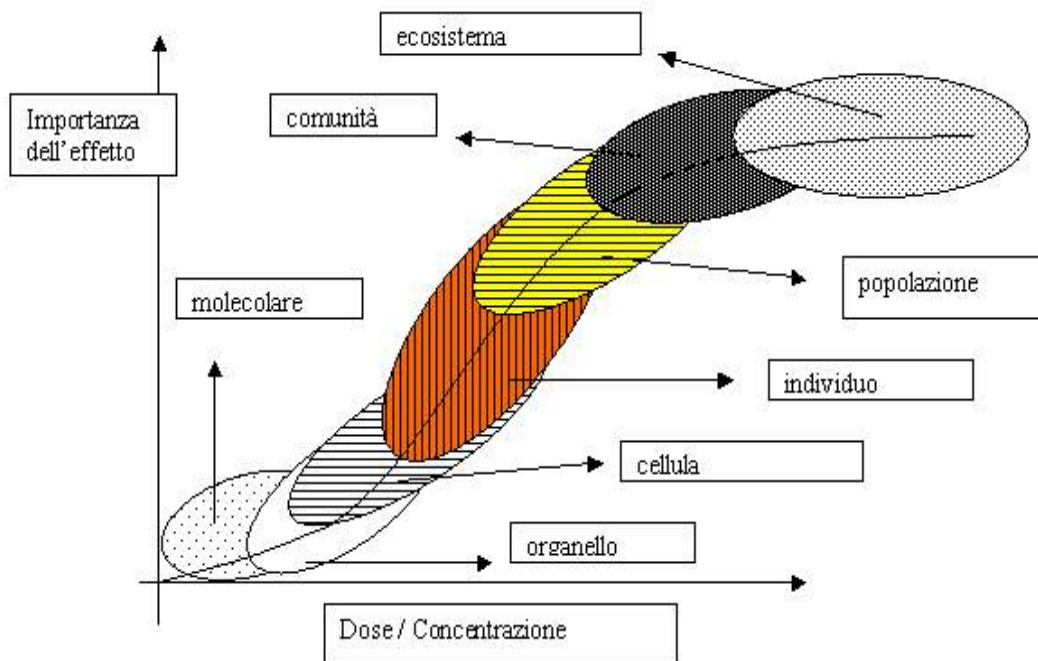
Il campo delle indagini di tipo biologico è quello che ha ricevuto finora il maggior interesse nello studio degli effetti dei liquidi ionici, insieme alla necessità di raccogliere le variabili chimico fisiche riguardanti questa tipologia di sostanze. La necessità di individuare e quantificare le fonti e gli effetti dell'inquinamento è alla base della nascita degli studi di monitoraggio ambientale, strategia che è interessante applicare ad una categoria di sostanze quali i liquidi ionici, di cui si prevede un rilascio in ambiente, soprattutto in ambiente acquatico, relativamente ai liquidi ionici idrofilici, e di adsorbimento ai sedimenti.

Storicamente il monitoraggio dell'inquinamento ambientale si è basato sull'uso di strumentazioni chimico-fisiche, che mirano ad individuare e quantificare il superamento di concentrazioni limite di determinate sostanze nei diversi comparti ambientali. Gli strumenti di monitoraggio biologico sono numerosi e possono essere caratterizzati a seconda del livello di organizzazione biologica su cui si basano e al tipo di esposizione:

- analisi della struttura e della funzione dei popolamenti in sito (Indici Biotici).
- test di tossicità o saggi biologici in laboratorio.
- test di bioaccumulo in organismi raccolti in sito o esposti in laboratorio.
- valutazione delle risposte a livello biochimico, cellulare, fisiologico (biomarker).

La tossicità di un agente (o miscela) è generalmente individuabile, in un primo momento, a livello biochimico e molecolare e solo successivamente a livello di cellula,

tessuto, organismo ed infine popolazione. In una ricerca ecotossicologica quindi potenziali bioindicazioni di un danno sono, oltre alle differenti risposte omeostatiche, sia gli effetti a livello subcellulare (biomarker), che effetti a livello di individuo, popolazione e comunità (Schema 3.2.1). In questo capitolo vengono indagati gli effetti di un gruppo di ILs sulla funzionalità cellulari quali l'integrità di membrana, la vitalità cellulare legata all'attività di enzimi di membrana, la funzionalità enzimatica ed effetti di tossicità acuta su microorganismi (*Vibrio fischeri*) ed organismi in ambiente acquatico (*Daphnia magna*).

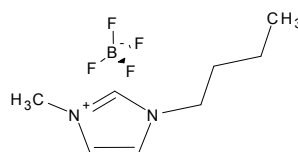


Schema 3.2.1: Diagramma schematico della relazione gerarchica tra le risposte ecotossicologiche misurate a diversi livelli di organizzazione biologica ⁸².

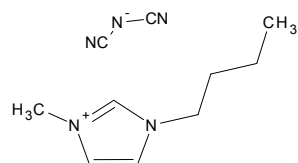
⁸² Spurgeon D., Ricketts H., Svendsen C., Morgan A. J., Kille P, Environ. Sci. Technol., 39, 2005, 5327-5334.

Schema 3.2.2: Liquidi ionici di N-metilimidazolinio (**1a-b**) o che presentano catene laterali ossigenate (**2a-b**, **3a-b**, **4a-b**, and **5b**).

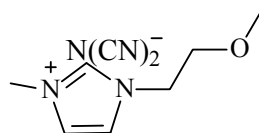
[BMIM][BF₄] **1a**



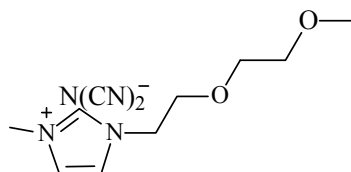
[BMIM][N(CN)₂] **1b**



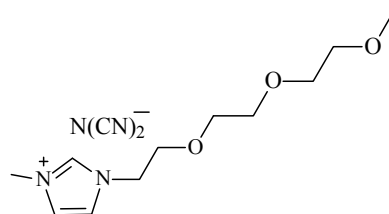
[MOEMIM][N(CN)₂] **2b**



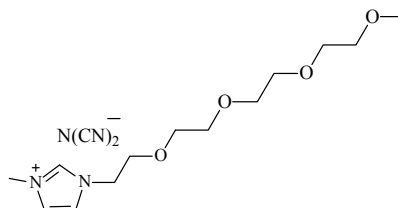
[M(OE)₂MIM][N(CN)₂] **3b**



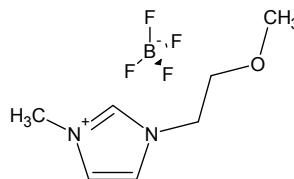
[M(OE)₃MIM][N(CN)₂] **4b**



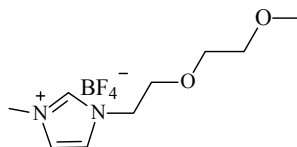
[M(OE)₄MIM][N(CN)₂] **5b**



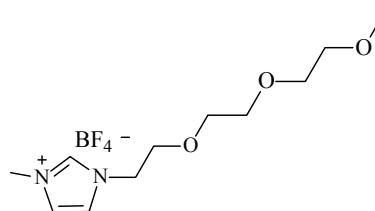
[MOEMIM][BF₄] **2a**



[M(OE)₂MIM][BF₄] **3a**



[M(OE)₃MIM][BF₄] **4a**



Test di tossicità acuta su D. Magna

Nello Schema 3.2.2 sono riportati i liquidi ionici utilizzati in questo studio.

La Tabella 3.2.2 riporta i valori di EC₅₀ (in mg/L e mM) degli ILs per *D. magna* e *V. fischeri*; i valori riportati sono stimati raggruppando insieme tutti i dati disponibili dal primo e dal secondo esperimento. I valori EC₅₀ per *D. magna* da 0.05 mM (95% C.I.: 0.03-0.11 mM) per **1a** a 1.14 mM (95% C.I. : 1.05-1.24 mM) per il **3b**. Nel primo esperimento con *D. magna* entrambi i fattori, catione ed anione, sono stati considerate significativi ($P < 0.001$ e $P = 0.032$ rispettivamente), mentre la loro interazione non è stata considerata significativa. I sali con anione BF₄ sono stati leggermente, ma consistentemente e significativamente, più tossici dei corrispondenti sali con anione N(CN)₂. In un secondo esperimento con *D. magna* le differenze tra i cationi sono state considerate altamente significative (ANOVA $P < 0.001$). In entrambe gli esperimenti il test *post-hoc* SNK ha discriminato il BMIM, consistentemente i più tossici rispetto agli altri cationi che non differiscono significativamente dagli altri.

Tabella 3.2.2: Valori di EC50 (espressi come concentrazione μM) dei liquidi ionici **1a-b**, **2a-b**, **3a-b**, **4a-b** e **5b** in test di immobilizzazione di *Daphnia magna* a 48 h e di inibizione della luminescenza di *Vibrio fischeri* a 15 min. I valori riportati sono le medie con i relative intervalli di confidenza associate per 3 esperimenti indipendenti (4 esperimenti nel secondo per *V. fischeri*).

Liquido ionico	<i>Daphnia magna</i>		<i>Vibrio fischeri</i>	
	1°	2°	1°	2°
	esperimento	esperimento	esperimento	esperimento
1a BMIM BF ₄	54 (28–107)	—	1635 (1442–1854)	—
1b BMIM N(CN) ₂	72 (29–179)	87 (49–155)	1353 (723–2530)	—
2a MOEMIM BF ₄	774 (589–1018)	—	8093 (904–72493)	—
2b MOEMIM N(CN) ₂	862 (687–1083)	1010 (816–1250)	12078 (5660–25770)	8431 (6160– 11540)
3a M(OE) ₂ MIM BF ₄	930 (669–1291)	—	6151 (549–68959)	—
3b M(OE) ₂ MIM N(CN) ₂	1140 (910–1428)	1137 (923–1402)	8253 (3266–20856)	7011 (4726– 10400)
4a M(OE) ₃ MIM BF ₄	650 (440–960)	—	2823 (284–28046)	—
4b M(OE) ₃ MIM N(CN) ₂	808 (413–1583)	1185 (869–1616)	5311 (1229–22964)	4588 (2918–7215)
5b M(OE) ₄ MIM N(CN) ₂	—	926 (784–1095)	—	448 (319–631)

I primi dati sperimentali riguardo all'attività tossica dei liquidi ionici ossigenati verso *Daphnia magna* sono stati eseguiti in un precedente studio³⁷; d'altro canto gli effetti tossici dei liquidi ionici alchilici, come **1a** sono stati ampiamente indagati in letteratura, ed il valore di EC50 per **1a** trovato nei nostri esperimenti, 0.05 mM (95% C.I.: 0.03 - 0.11 mM) è in accordo con il valore riportato in letteratura da Bernot et al.³⁴ per lo stesso intervallo di concentrazioni (0.05 - 0.08 mM), mentre per i liquidi ionici con atomi di ossigeno nella catena laterale sono si trovano nell'ordine del millimolare (0.65 - 1.14 mM). Questi esperimenti hanno mostrato che l'introduzione di un atomo di ossigeno nella catena laterale di cationi imidazolinici porta ad una riduzione della tossicità di dieci volte verso *D. magna*, sia per i liquidi ionici tetra fluoro borati che per i dicianamide. Il maggior contributo alla tossicità è dato dall'introduzione del primo atomo di ossigeno nella catena laterale come chiaramente indicato dai valori di EC50 per i composti ossigenati: un ulteriore aumento negli atomi di ossigeno non ne diminuisce la tossicità. Un'ulteriore analisi statistica non è stata in grado di stabilire un livello di demarcazione tra questi, ma conferma le differenze tra i cationi ossigenati ed il BMIM, valori che sono statisticamente significativi da analisi di tipo ANOVA e post-hoc SNK test.

Questo dimostra chiaramente che la catena laterale alchilica è maggiormente tossica. Anche i crostacei appaiono sensibili al tipo di anione, con l'anione BF₄ leggermente ma significativamente più tossico del dicianamide. Inoltre, avendo preparato le soluzioni di liquidi ionici un'ora prima dello svolgimento dei test, si può escludere ragionevolmente la formazione di acido fluoridrico dall'idrolisi degli anioni BF₄. Una parziale idrolisi può avvenire nel corso delle 48 ore di test e contribuire all'aumento della tossicità. L'anione di cianamide è stato confermato essere uno dei meno tossici nei confronti di

D. magna, confrontabile con l'attività degli anioni esafluorofosfato, (il valore di EC50 per il BMIM PF₆ è compreso tra 70 mM⁴⁴, e 84 mM).

Test di tossicità acuta su V. fischeri

I valori di EC50 per *V. fischeri* sono compresi nell'intervallo 0.45 mM (95% C.I.: 0.32-0.63 mM) per il liquido ionico 9.8 mM (95% C.I.: 7.5-12.9 mM) per **2b** (Tabella 2). Nel primo esperimento con *V. fischeri* il catione è stato l'unico fattore significativo (P < 0.001), non è stato possibile identificare l'effetto dell'anione. Il test post-hoc SNK ha identificato differenze significative tra i liquidi ionici ossigenati ed il BMIM. Benché il test SNK non ha rilevato differenze significative tra i liquidi ionici ossigenati, questi hanno mostrato una tendenza all'aumento della tossicità seguendo la lunghezza della catena alchilica. In un secondo esperimento le differenze si sono mostrate altamente significative (P < 0.001). La tossicità aumenta chiaramente con la lunghezza della catena alchilica e tutte le differenze sono risultate significative, secondo il test SNK, ad eccezione delle differenze tra i M(OE)₂MIM (**3a-b**) ed i MOEMIM (**2a-b**).

I valori pubblicati di EC50 per **1a** (3.5 ± 0.33 mM,⁵¹) e **1b** (4.7 ± 1.1 mM,⁵²) sono di circa due ordini di grandezza maggiori per gli stessi composti (per il BMIM BF₄ 1.6 mM, 95% C.I.: 1.4-1.9 mM, per **1b** 1.3 mM, 95% C.I.: 0.7-2.5 mM).

Considerando i limiti di confidenza, queste differenze sono statisticamente significative. In aggiunta, il valore di EC50 per i cationi MOEMIM **2a** e **2b** dai nostri esperimenti (8.0 mM per **2a** e 9.8 mM per **2b**) sono inferiori del valore di EC50 riportato in letteratura per gli stessi cationi accoppiati con un anione cloruro, benché le differenze

in questo caso sono da ascrivere all'effetto presumibile di aumento della tossicità del BF_4 e del $\text{N}(\text{CN})_2$ rispetto all'anione cloruro. In accordo con Stolte et al.³⁶ i dati mostrano che un aumento della polarità dato dall'introduzione di un atomo di ossigeno nella catena laterale del catione dei liquidi ionici imidazolinici riduce l'effetto tossico dei liquidi ionici verso *Vibrio fischeri* di circa un ordine di grandezza. Sorprendentemente, l'ulteriore aggiunta di un funzionalità etossi, aumentando la polarità totale del catione, causa un aumento nella tossicità: **5b** è il liquido ionico più tossico delle sostanze ossigenate, con un valore di EC50 (0.45 mM, 95% C.I.: 0.32-0.63 mM), anche inferiore di **1b** (1.3 mM, 95% C.I.: 0.7-2.5 mM). Questi risultati mostrano che il batterio mostra un livello di sensibilità diverso nei confronti dell'allungamento della catena laterale. *Vibrio fischeri* non è sensibile alla tipologia di anione, mentre all'opposto *Daphnia magna* lo è.

Test di citotossicità

I valori di EC50 per il liquido ionico **1a** (Tabella 3.2.2) sono stati calcolati seguendo almeno 3 serie indipendenti di esperimenti, condotti in serie da 4. Gli effetti di citotossicità in relazione sono stati calcolati da almeno 3 esperimenti indipendenti, condotti in serie da 4. Gli effetti di citotossicità sono messi in relazione all'allungamento della catena e all'aumento del numero di atomi di ossigeno sono stati valutati in una seconda serie di esperimenti dove le cellule sono state esposte a tutti i liquidi ionici usando una concentrazione di 1 mM, scelta sulla base dei valori di EC50 ottenuti da **1a** in tutti i test (Figura 3.2.1).

Tabella 3.2.2: Valori di EC50 (mM) del liquido ionico **1a** con relative errore standard associato (SE) determinate usando MTT test, rilascio dell'LDH e saggio di inibizione dell'AChE.

<i>MTT test</i>	<i>Rilascio LDH</i>	<i>Inibizione AChE</i>
EC50 ± SE (n=7)	EC50 ± SE (n=3)	EC50 ± SE (n=4)
1.06 ± 0.07	1.66 ± 0.22	0.54 ± 0.13

n = numero di esperimenti indipendenti. Quattro sono state considerate per le 11 concentrazioni testate nei vari esperimenti.

Saggio MTT

Tramite il test MTT di vitalità cellulare, è stato calcolato un valore di EC50 di 1.06 ± 0.07 (mM) per **1a** (Tabella 3.3.2). I risultati presentati in Figura 3.2.1A hanno indicato un valore di citotossicità più alto per il catione del BMIM, accoppiato sia con anione BF₄ o N(CN)₂, ed un effetto minore dovuto ai sali dei cationi ossigenati, indipendentemente dall'anione e dal numero di unità etossi nella catena laterale.

Gli effetti di vari liquidi ionici sulla vitalità cellulare è stata investigata in studi precedenti in una serie di linee cellulari, umane ed animali, includendo cellule derivate da tessuti che subiscono un primo contatto tra tossina e sistema cellulare, come cellule MCF7⁵¹, cellule epiteliali umane HeLa, HT-29 and Caco-2^{45 57 83 58 62} cellule

⁸³ Wang, J., Wang, H., Zhang, S., Zhang, H., Zhao, Y., 2007. J. Phys. Chem. B. 111, 22, 6181-6188.

promielotiche di ratto IPC-81 e cellule di glioma C6^{52 63 59}. Questi studi hanno mostrato che sia il catione che le specie anioniche contribuiscono ad una riduzione della vitalità cellulare, ed è stata riscontrata una correlazione tra la citotossicità e l'aumento della lipofilità. Nello specifico la lipofilità del catione non sembra giocare un ruolo fondamentale nell'inibizione della crescita fino ad un numero pari a 6, ma un ulteriore aumento i problemi di tossicità. Inoltre i liquidi ionici a catena corta mostrano una finestra di concentrazione in cui passano da non avere effetti tossici ad essere fortemente tossici, mentre i liquidi ionici a catena lunga mostra una relazione lineare tra la tossicità e la concentrazione di esposizione. E' interessante notare che Ranke e colleghi⁵² hanno trovato una relazione tra tossicità e lunghezza della catena verso svariate linee cellulari ed in test di tossicità acuta con il batterio *Vibrio fischeri* (anche se a tempi diversi di incubazione: 48 ore e 30 minuti rispettivamente).

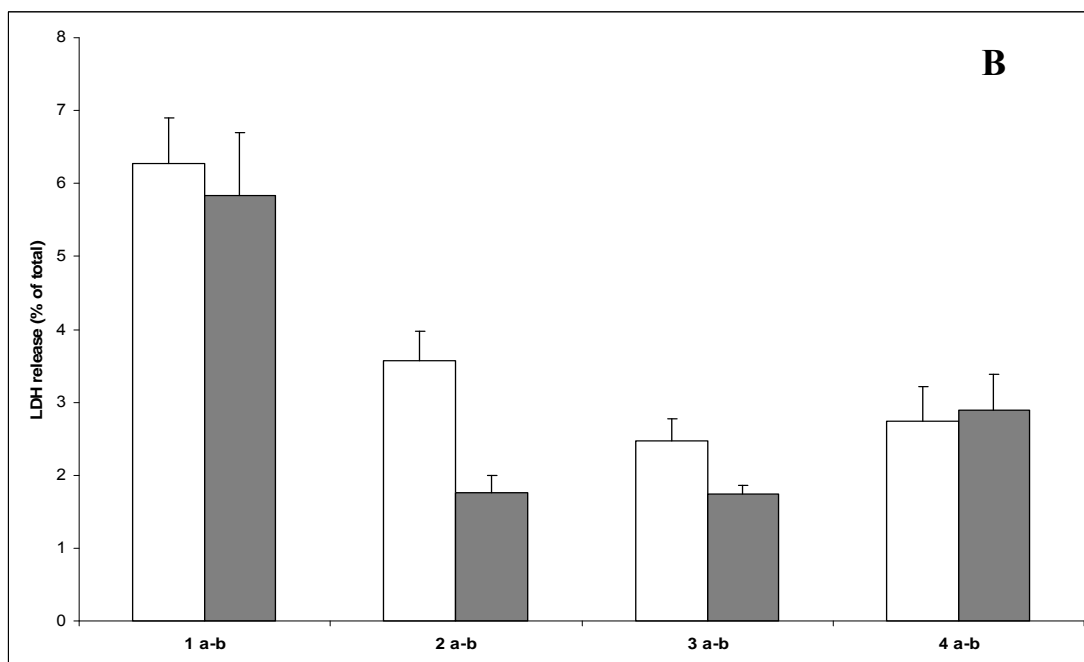
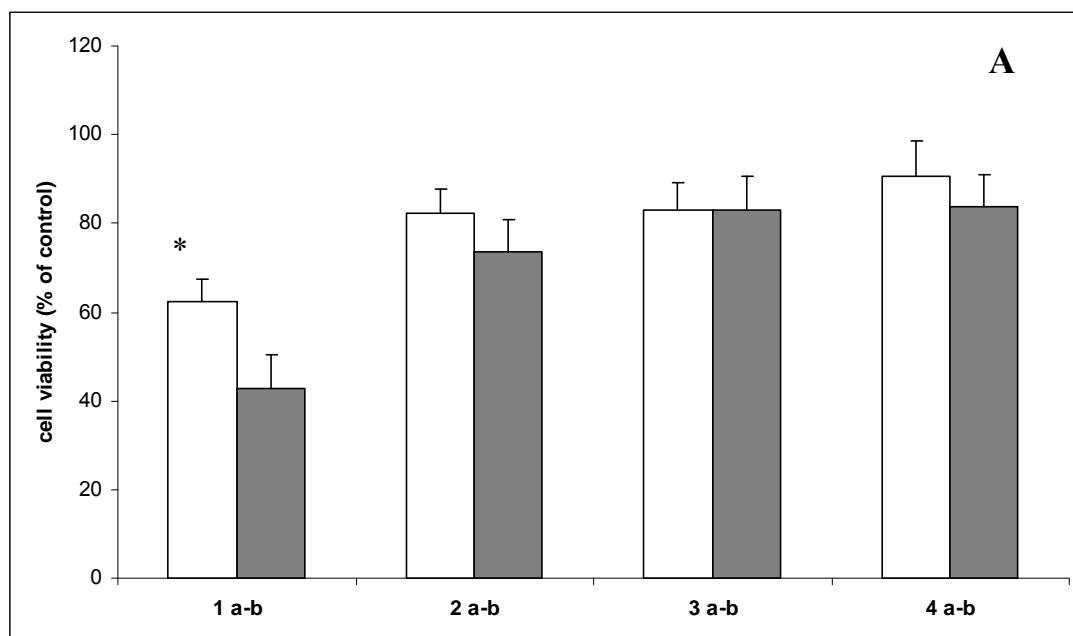
I valori di EC50 qui ottenuti per il BMIM BF₄ attraverso l'MTT test usando cellule di pheocromocitoma di ratto PC12 (1.06 ± 0.07 mM) sono in buon accordo con quelle ottenute con altre linee cellulari, ad esempio con cellule IPC-81 (valore di EC50 di 1.37 ± 0.06 mM⁵²). I risultati presentati in Figura 3.2.1A indicano un'alta citotossicità del catione BMIM, accoppiato sia con BF₄ **1b** che con l'anione N(CN)₂ **1c**, rispetto ai rispettivi liquidi ionici con una funzionalità etossi. Il catione BMIM infatti è l'unico ad avere un effetto significativamente maggiore rispetto al controllo. Questa tendenza è in accordo con quella riportata da Frade et al.⁵⁷, che hanno mostrato che la presenza di un gruppo polare nella catena laterale aumenta tutti i valori di vitalità cellulare rispetto al

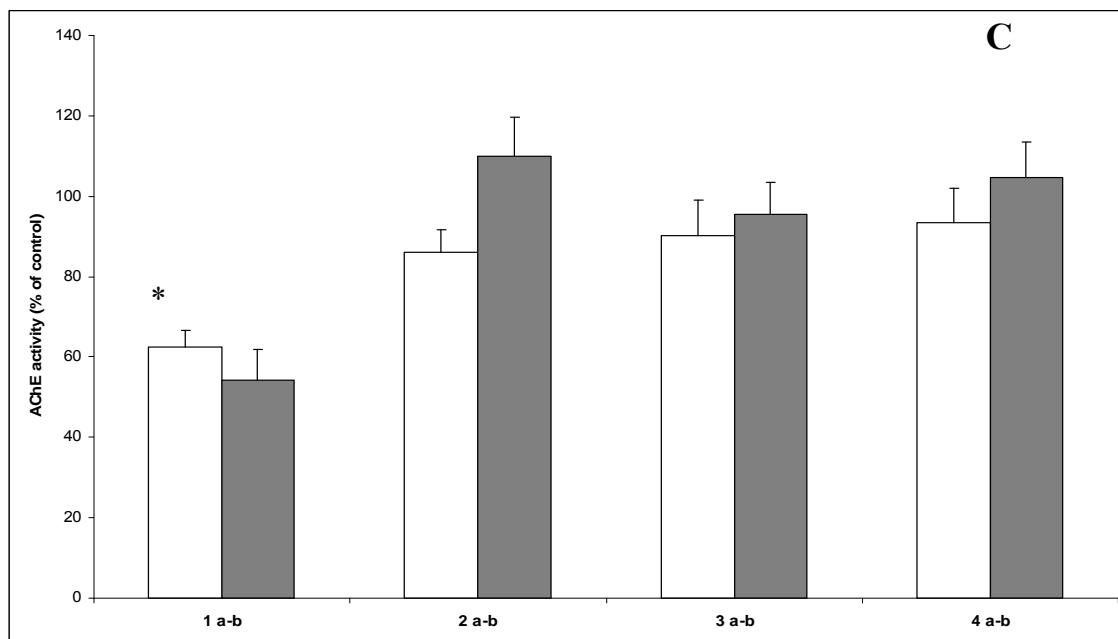
controllo, trovando che **3a** ed il M(OE)₂MIM PF₆ sono molto meno tossici degli analoghi alchilici.

Rilascio dell'LDH

I valori di EC50 calcolati per il rilascio dell'LDH per il liquido ionico **1a** sono stati di 1.66 ± 0.22 (Tabella 3.2.2) in buon accordo con il valore ottenuto relativamente alla vitalità cellulare. Come precedentemente osservato per il saggio di vitalità cellulare, **1a** e **1b** sono stati i soli due unici liquidi ionici che hanno provocato un effetto significativo confrontato con i valori di controllo (Figura 3.2.1B).

Figura 3.2.1: Effetti di diversi liquidi ionici sulla vitalità cellulare (A), rilascio dell'LDH (B) e attività dell'AChE (C) valutate su linee cellulari PC12 di ratto. **A.** I dati sono espressi come medie \pm SE di 7 esperimenti indipendenti, ognuno condotto in serie di 4, * = $P < 0.001$ rispetto cellule non esposte (controllo). **B.** I dati sono espressi come medie \pm SE di 7 esperimenti indipendenti, ognuno condotto in serie di 4, * = $P < 0.001$ rispetto cellule non esposte (valore di controllo = 2.60 ± 0.31 , $n=4$). **C.** I dati sono espressi come medie \pm SE di 3 esperimenti indipendenti, ognuno condotto in serie di 3, * = $P < 0.001$ rispetto cellule non esposte (valore di controllo = 6.20 ± 0.58 nmol min^{-1} mg proteina^{-1} , $n=3$).





Il presente lavoro è il primo che valuta il rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) dopo l'esposizione a liquidi ionici di cellule in coltura. Il rilascio della lattato deidrogenasi è un ben conosciuto end-point di integrità e funzionalità della membrana plasmatica, elemento che lo rende molto utilizzato in test di vitalità cellulare. In letteratura, il rilascio di LDH associato all'esposizione a surfattanti è stato misurato in colture di cellule umane come cheratinociti e fibroblasti^{84 85}; tra tutti i surfattanti in cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB) ed il benzetonio cloruro sono quelli che presentano le maggiori similarità strutturali con i liquidi ionici, essendo presenti sia una testa carica positivamente che una lunga catena alchilica lipofila. Il valore di EC50 riportato per questi due sali di ammonio quaternari (0.008 mM per il CTAB e 0.01 mM per il benzetonio cloruro) sono di due ordini di grandezza più piccoli di quelli misurati in questo lavoro per **1a** 1.66 ± 0.22 mM); questi dati sostengono il tipico trend di

⁸⁴ Van Ruissen, F., Le, M., Carroll, J.M., van der Valk, P.G.M., Schalkwijk J., 1998. *J. Invest. Dermatol.* 110, 358–363.

⁸⁵ Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L., de Roeck-Holtzauer, Y., 1999. *J. Appl. Toxicol.* 19, 163–165.

tossicità che segue l'allungamento della catena alchilica all'aumentare degli atomi di carbonio.

Il valore di EC50 per **1a** è in accordo con il valore calcolato in questo lavoro per la vitalità cellulare con l'MTT test, essendo 1.66 mM e 1.06 mM rispettivamente. I BMIM **1a** e **1b** non sono i soli due liquidi ionici che hanno causato un significativo effetto confrontato con il valore di controllo (Figura 3.2.1B), mentre in presenza di **2b** e **3b** il rilascio dell'LDH è nell'intervallo di concentrazioni del controllo. L'introduzione di una funzionalità etossi nella catena laterale sembra diminuire gli effetti sul rilascio dell'LDH.

Inibizione dell'AChE

I valori di EC50 per la sostanza **1a** nel test di inibizione dell'ACHE sono stati di 0.54 ± 0.13 mM (Tabella 3.2.2). I liquidi ionici ossigenati non hanno mostrato attività di inibizione dell'ACHe, indipendentemente dal tipo di anione e dal numero di unità etossiliche nella catena laterale.

L'influenza dei liquidi ionici sull'attività dell'enzima AChE è stato largamente studiato negli anni recenti dal gruppo del Professor Jastorff, Università di Brema^{63 64} è stato il primo gruppo ad aver ipotizzato questo enzima come un obiettivo per l'attività dei liquidi ionici, ed ha mostrato come i liquidi ionici con catene laterali ossigenate ed etossilate hanno una minore potenziale di inibizione dei loro analoghi alchilici. Gli effetti dei liquidi ionici sull'ACHe sono stati studiati esponendo delle cellule PC12. L'ACHe delle PC12 è rappresentata al 99% dalla AChE_t conosciuta anche come forma sinaptica. Quattro monomeri AChE_t sono organizzati in un tetramero globulare diretto

sulla superficie cellulare espletando la sua funzione colinergica come proteina ancorata alla membrana ⁸⁶.

I valori di EC50 di **1a** trovati nello studio con cellule di feocromocitoma di ratto (0.54 ± 0.13 mM) sono superiori di quelle riportate da Stock et al.⁶³. (0.105 ± 0.004 mM) utilizzando dell'AChE da anguilla elettrica (*Electrophorus electricus*) e questa differenza può essere imputata alla diversa procedura sperimentale. I risultati ottenuti sull'inibizione dell'AChE su cellula intera indicano un'interazione con membrane biologiche confermando i risultati ottenuti da Luo et al.⁴⁷ su vermi terricoli. La figura 3.2.1C mostra i sali dei cationi con funzionalità ossigenate che non inibiscono l'attività dell'AChE ad una concentrazione di 1 mM, indipendentemente dal tipo di anione e dal numero di funzionalità etossiliche nella catena laterale, l'attività misurata dell'AChE è risultata essere molto simile a quella del controllo. Questi risultati sono in linea con quelli ottenuti da Arning et al.⁶⁴ che hanno riportato l'aumento di un ordine di grandezza nell'EC50 del BMIM (0.082 ± 0.007 mM) quando un atomo di ossigeno è introdotto nella catena laterale come funzionalità eterea MOEMIM, EC50 0.38 ± 0.02 mM), e conferma la tendenza trovata in tutti i test di vitalità. Comunque Arning et al.⁶⁴ hanno trovato un'inibizione residuale dell'AChE mentre i nostri composti non hanno mostrato effetti, e questo può essere dovuto a differenti approcci sperimentali (enzima purificato rispetto ad una cellula integra) o al fatto che la singola concentrazione testata è al di sotto della dose effettiva.

⁸⁶ Choi, R. C. Y., Mok, M. K. W., Cheung, A. W.H., Siow, L.N., 2008. *Chemico-Biological Interactions* 175, 76-78.

Cambiamento di fluidità delle membrane modello in presenza di liquidi ionici

L'analisi dell'anisotropia di fluorescenza è stata condotta per valutare i cambiamenti nella fluidità di membrana dovuti all'effetto delle sostanze **1a** e **3b** che sono le sostanze più tossiche e meno tossiche rispettivamente secondo i test eco tossicologici (Figura 3.2.2).

Il liquido ionico ossigenato **3b** ha mostrato due differenti cambiamenti alle molarità più alte (50 e 200 mM) e le due più basse (0, 0.4 e 5 mM), fino alla temperatura di transizione (T_c) del DMPC ⁸⁷. Il liquido ionico **1a**, invece, non ha mostrato una relazione chiara identificata dall'anisotropia di fluorescenza e dalla concentrazione alle molarità testate. Il liquido ionico **3b** ha influenzato la T_c dei liposomi, diminuendola da 24 °C a 20 °C, ma questo comportamento non è stato osservato per il liquido ionico **1a**.

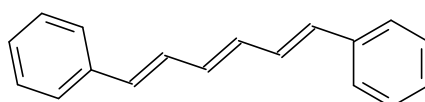
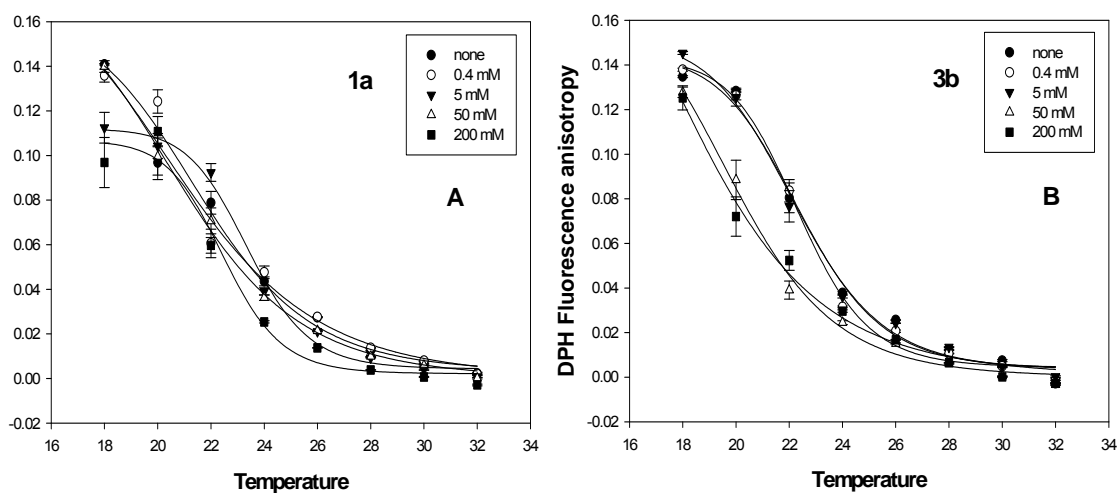
Un comune approccio nello studio della struttura e delle dinamiche di membrane lipidiche e degli effetti di molecole sui doppi strati lipidici è basata sull'utilizzo di sonde fluorescenti ⁸⁸, che si sono dimostrate utili nella comprensione dei processi che avvengono all'interno delle membrane cellulari. Le sonde idrofobiche, che sono solubili nella zona idrofobica costituita dalle catene idrocarburiche degli acidi grassi, come il DPH (difenilesatine), sono state spesso usate nelle misure di anisotropia di fluorescenza in cui il movimento rotazionale del DPH viene monitorato per fornire informazioni sulla fluidità di membrana e sull'organizzazione lipidica ^{89 90}.

⁸⁷ Parasassi T., Conti F., Glaser M., Gratton E., 1984. J. Biol. Chem. 259, 14011-14017.

⁸⁸ Lentz, B.R., 1993. Chem. Phys. Lipids. 64, 99-116.

⁸⁹ Lentz, B.R., 1989. Chem. Phys.. 50, 171-190.

⁹⁰ Borenstain, V., Barenholz, Y., 1993. Chem. Phys. Lipids. 64, 117-127.



Dph - 1,6 difenil- 1,3,5-esatriene

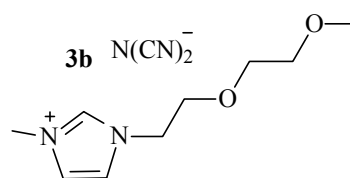
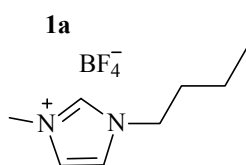


Figura 3.2.2: Anisotropia di fluorescenza del DPH in liposomi di DMPC in funzione della temperatura. La serie di temperatura include la temperatura di transizione (T_c) che è stata determinata utilizzando un programma di interpolazione non lineare. Ogni valore di anisotropia di fluorescenza è una media di 17 misure indipendenti \pm SE. I liposomi sono stati esposti a differenti molarità dei liquidi ionici **1a** (A) e **3b** (B) rispettivamente.

Questo campo riguardante le interazioni dei liquidi ionici non è stato sufficientemente studiato, in particolare per quanto riguarda l'interazione dei liquidi ionici a corte catene alchiliche o con una sola funzionalità eterea. Un primo studio dei liquidi ionici con lunghe catene alchiliche⁹¹ ha mostrato che solo i liquidi ionici con più di otto atomi di carbonio è stato capace di distruggere il doppio strato lipidico e di determinare un leakage di membrana del contenuto lipidico. Il liquido ionico **1c** in particolare ha

⁹¹ Evans, K.O., 2006. Colloid. Surface. A. 274, 11-17.

causato un lento rilascio (15% dopo 10 minuti) ed la conseguente fuoriuscita del materiale cellulare attraverso piccoli buchi nel doppio strato, ma questo effetto non è stato indicativo della rottura della membrana; questo fenomeno può essere connesso con cambiamenti nella fluidità di membrana alle diverse molarità di **1c**. Evans⁸⁰ e Schaffran⁹² hanno trovato delle correlazioni tra l'aumento della lunghezza delle catene alchiliche (ed il conseguente aumento della lipofilità dei liquidi ionici) ed un maggiore leakage nei liposomi.

In questo studio abbiamo confrontato il più tossico ed il meno tossico dei liquidi ionici presi dal nostro gruppo di sostanze (**1a** e **3b** rispettivamente). L'intervallo di molarità è stato scelto per includere la cmc di **1a** 960 mM⁷⁵, anche se queste concentrazioni sono maggiori di quelle a cui i liquidi ionici hanno mostrato effetti di tossicità rilevanti verso gli organismi. Le variazioni di anisotropia indicano che **3b** influenza variazioni di fluidità di membrana diversamente da **1a**. L'inserimento delle catene alchilate nel doppio strato è il più probabile meccanismo d'azione di queste sostanze verso le membrane lipidiche. I dati indicano che **1a** destabilizza proporzionalmente i doppi strati via che viene aumentata la sua concentrazione, mentre **5b** agisce sulla fluidità di membrana ad alte concentrazioni.

Il rilascio del contenuto cellulare è una conseguenza dell'interazione tra i liquidi ionici e le membrane cellulari sembra essere irrilevante per i liquidi ionici polietossilati, come è confermato anche dai risultati di leakage dell'LDH; si può comunque assumere che a concentrazioni molto elevate (200 mM) le differenze tra i liquidi ionici polietossilati e

⁹² Schaffran, T., Justus, E., Elfert, M., Chen, T., Gabel, D., 2009. Green Chem. 11, 1458-1464.

quelli alchilici con le analoghe catene laterali possono non essere così rilevanti, come indicato dai dati presenti in letteratura ⁸².

La spiegazione di questi effetti potrebbe essere fornita attraverso una migliore conoscenza del meccanismo di azione attraverso il quale queste sostanze interagiscono con la matrice biologica, che fornirebbe informazioni rilevanti riguarda a una futura strategia sintetica di liquidi ionici meno dannosi.

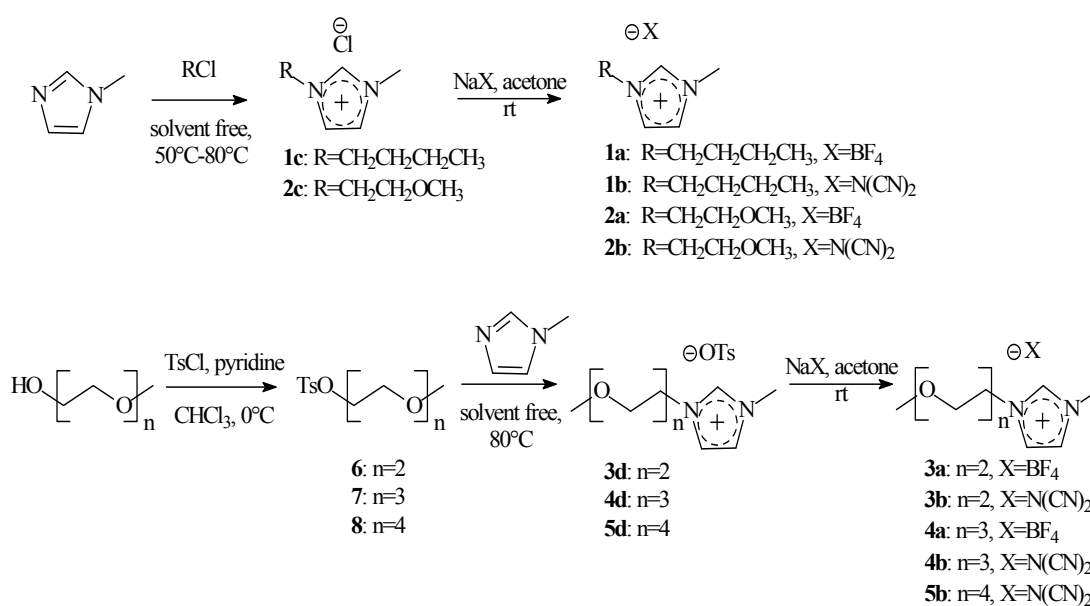
Una scelta appropriata della coppia catione ed anione è importante nella progettazione di liquidi ionici che abbiano delle proprietà fisico-chimiche adeguate e sostenibili da un punto di vista eco-tossicologico. Nel caso dei liquidi ionici ossigenati, i test qui presentati confermano che i composti ossigenati nella catena laterale del catione hanno una minore tossicità rispetto al BMIM a differenti livelli di organizzazione biologica. Infatti, la presenza di unità etossi sul catione riduce gli effetti biologici, benché quelli messi in relazione con la lunghezza della catena sono diversi a seconda del target biologico.

Considerati nel loro complesso i risultati indicano che la sensibilità ai liquidi ionici del batterio *Vibrio f.* (valore di EC50 nell'intervallo millimolare) o nelle cellule in coltura è inferiore rispetto al crostaceo *Daphnia m.* (valore di EC50 nell'intervallo micromolare)

La comprensione del meccanismo dettagliato non è stata ancora chiarita completamente e rappresenta uno dei principali obiettivi nella comprensione dei meccanismi di tossicità dei liquidi ionici. L'analisi dell'anisotropia di fluorescenza indica che i liquidi ionici portano ad una destabilizzazione nelle membrane, elemento di congiunzione per l'analisi di meccanismi di tossicità a livello cellulare.

Materiali e metodi

Le sostanze chimiche utilizzate sono state fornite dalla Aldrich ed utilizzate senza ulteriori purificazioni quando non specificato. Gli spettri NMR sono stati registrati con probe da 5 mm usando uno spettrometro Varian Inova 200, Varian Inova 300 o Varian Mercury 400; tutti i chemical shift sono misurati in base al chemical shift del solvente deuterato (δ_H , δ_C), dato in ppm; le costanti di accoppiamento (J) sono date in Hz. La purezza dei composti è stata identificata come almeno del 95 % attraverso risonanza magnetica nucleare $^1\text{H-NMR}$, per integrazione dei protoni rispetto al segnale dello standard interno. Tutti gli spettri per questo motivo sono stati acquisiti con l'aggiunta di una quantità definita di (TTMS) ed un tempo di delay di almeno 20 s per permettere un completo rilassamento protonico ed una integrazione quantitativa.



Schema 3.2.1: Vie sintetiche dei liquidi ionici ed intermedi di sintesi.

L'1-butil-3-metilimidazolinio tetrafluoroborato **1a** è stato fornito dalla Merck, 1-butil-3-metilimidazolinio dicianamide **1b**, 1-metossietil-3-metilimidazolinio tetrafluoroborato

2a e l'1-metossietil-3-metilimidazolinio dicianamide **2b** sono stati preparati come descritto in letteratura⁹³ partendo dai corrispondenti cloruri (**1c** e **2c**). **1c** e **2c** possono essere ottenuti in rese quasi quantitative facendo reagire N-metilimidazolo con 1.1 eq. dibutilcloruro o di 2-metossietilcloruro.

In una procedura sintetica tipica, l'1-metilimidazolo e l'1-butilcloruro vengono mescolati in un pallone a due colli sotto agitazione magnetica per 48 ore a 50 °C. Le procedure sintetiche sono state pensate in modo da ridurre l'impiego di solventi ed il dispendio energetico necessario per condurre le reazioni ad alte temperature. Il prodotto viene successivamente tritato e lavato (x3) in acetato di etile e dietilere. I solidi bianchi ottenuti sono stati purificati dagli alogenuri secondo le procedure riportate in letteratura⁹⁴ su colonna in gel di silice, eluendo con acetone-cloroformio (per i sali con anione tetrafluoroborato) o su acetone (per le dicianamidi). In Figura 3.2.1 sono visibili gli schemi delle sintesi dei liquidi ionici e degli intermedi sintetici impiegati.

1-butil-3-metilimidazolinio cloruro BMIM Cl **1c** resa 98%: δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.94-0.97 (3 H, m, CH₃CH₂), 1.31-1.40 (2 H, m, CH₃CH₂), 1.85-1.93 (CH₃CH₂CH₂), 3.94 (3 H, s, NCH₃), 4.23-4.26 (2 H, m, CH₂N), 7.49 (1 H, s, NCH=CHN), 7.54 (1 H, s, NCH=CHN), e 8.78 (1 H, s, N=CHN).

1-metossietil-3-metilimidazolinio cloruro MOEMIM Cl **2c** (92%): δ_{H} (400 MHz; D₂O) 3.42 (3 H, s, CH₃O), 3.87-3.90 (2 H, m, CH₃OCH₂CH₂), 3.95 (3 H, s, NCH₃), 4.43-4.46

⁹³ Branco, L.C., Rosa, J.N., Moura Ramos J.J., Afonso, C.A.M., 2002. Chem. Eur. J. 8, 16, 3671-3677.

⁹⁴ Liu, Q., Janssen, M.H.A., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., 2005. Green Chem. 7, 39-42.

(2 H, m, CH₃OCH₂CH₂), 7.50 (1 H, d, *J* 2, NCH=CHN), 7.56 (1 H, d, *J* 2, NCH=CHN), e 8.80 (1 H, s, N=CHN).

1-butil-3-metilimidazolinio dicianamide, BMIM N(CN)₂ **1b** (97%): δ_H (200MHz, CDCl₃) 0.98 (3H, t, *J* 7.4, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 1.30-1.49 (2H, m, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 1.82-1.97 (2H, m, CH₃CH₂CH₂CH₂N), 4.01 (3H, s, CH₃N), 4.23 (2H, t, *J* 7.4, CH₃(CH₂)₂CH₂N), 7.28-7.45 (2H, m, NCH=CHN), 9.12 (1H, s, N=CHN).

1-metossietil-3-metilimidazolinio tetrafluoroborato MOEMIM BF₄ **2a** (74%): δ_H (300MHz, acetone-*d*₆) 3.36 (3H, s, OCH₃), 3.74 (2H, t, *J* 4.5, OCH₂CH₂N), 3.96 (3H, s, CH₃N), 4.38 (2H, t, *J* 4.5, OCH₂CH₂N), 7.27 (1H, m, NCH=CHN), 7.40 (1H, m, NCH=CHN), 8.81 (1H, s, N=CHN).

1-metossietil-3-metilimidazolinio dicianamide MOEMIM N(CN)₂ **2b** (93%): δ_H (400MHz, acetone-*d*₆) 3.35 (3H, s, OCH₃), 3.81 (2H, t, *J* 5.2 Hz, OCH₂CH₂N), 4.07 (3H, s, CH₃N), 4.53 (2H, t, *J* 5.2, OCH₂CH₂N), 7.71 (1H, m, NCH=CHN), 7.75 (1H, m, NCH=CHN), 9.08 (1H, s, N=CHN).

I liquidi ionici **3a-b**, **4a-b** e **5b** sono stati preparati seguendo una procedura estratta da letteratura, con leggere modifiche⁹⁵.

I tosilati (*p*-toluensolfonati) dei polietilenglicoli monometileteri **6**, **7**, **8** sono stati preparati con rese comprese tra il 32-69% dagli alcol corrispondenti (30 mmol) ed i *p*-toluensolfonil cloruri (TsCl) (1.3 eq., 39 mmol, 7.43g) in diclorometano (30 mL) usando piridina (48 mmol, 3.9 mL) come basi; dopo l'aggiunta di un 5% di acido solforico (10 mL) i prodotti sono stati estratti con diclorometano e lavati con acqua

⁹⁵ Bara, J.E., Gabriel, C.J., Lessmann, S., Carlisle, T.K., Finotello, A., Gin, D.L., Noble, R.D., 2007. Ind. Eng. Chem. Res. 46, 16, 5380-5386.

varie volte (x3). I sali d'imidazolio tosilati **3d**, **4d** e **5d** sono stati preparati in rese del 36-90% aggiungendo il glicole tosilato **6**, **7** e **8** ad una soluzione di imidazolo in agitazione (1.1 eq.), scaldando la soluzione a refluxo per 48 h; le soluzioni sono state lasciate raffreddare a temperatura ambiente e lavate con dietilere per rimuovere i reagenti rimasti. I liquidi ionici **3a-b**, **4a-b** e **5b** sono stati ottenuti per reazioni di metatesi: una soluzione di sali di tosilati di imidazolinio (25 mmol) in acetone (8 mL) sono stati messi in agitazione magnetica per 48 h a temperatura ambiente con sodio tetrafluoroborato (1.2 eq., 30 mmol, 3.29 g) o sodio dicianamide (1.2 eq., 30 mmol, 2.67 g) per 48 h a temperatura ambiente; la sostanza prodotta è stata purificata dai cloruri rimasti seguendo le procedure riportate in letteratura¹⁰ tramite colonna cromatografica su gel di silice, eluendo con acetone-cloroformio (per i sali con anione tetrafluoroborato) o su acetone (per le dicianamidi).

2-(2-Metossietossi)etil)-*p*-toluensolfonato **6**, resa 69%: δ_{H} (200 MHz, CDCl_3) 2.46 (3H, s, CH_3), 3.36 (3H, s, OCH_3), 3.46-3.51 (2H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.57-3.61 (2H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.70 (2H, t, J 5.2, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 4.18 (2H, t, J 5.2, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 7.35 (2H, d, J 8.4, *arom*), 7.81 (2H, d, J 8.4, *arom*).

2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-*p*-tluensolfonato **7** (59%): δ_{H} (200 MHz, CDCl_3) 2.46 (3H, s, CH_3), 3.38 (3H, s, OCH_3), 3.52-3.56 (4H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3.62-3.65 (4H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.70 (2H, t, J 4.6, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 4.17 (2H, t, J 4.6, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 7.35 (2H, d, J 8.4, *arom*), 7.81 (2H, d, J 8.4, *arom*).

2-{2-[2-(2-metossi-etossi)-etossi]-etossi}-etil)-*p*-tluensolfonato **8** (34%): δ_{H} (200 MHz, CDCl_3) 2.46 (3H, s, CH_3), 3.35 (3H, s, OCH_3), 3.50-3.54 (4H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.61-3.63 (8H, m, $\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$), 3.79 (2H, t, J 5.0, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 4.11 (2H, t, J 5.0, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 7.34 (2H, d, J 8.4, *arom*), 7.80 (2H, d, J 8.4, *arom*).

1-[2-(2-Metossietossi)-etil]-3-metilimidazolio-*p*-toluensolfonato M(OE)₂MIM OTs **3d** (79%): δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 2.34 (3H, s, CH₃), 3.34 (3H, s, OCH₃), 3.46-3.50 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂O), 3.57-3.61 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂O), 3.80 (2H, t, *J* 4.8, OCH₂CH₂N), 3.95 (3H, s, NCH₃), 4.46 (2H, t, *J* 4.8, OCH₂CH₂N), 7.15 (2H, d, *J* 8.4, *arom*), 7.30-7.32 (1H, m, NCH=CHN), 7.49-7.50 (1H, m, NCH=CHN), 7.76 (2H, d, *J* 8.4, *arom*), 9.71 (1H, s, N=CHN).

1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3-metilimidazolio *p*-toluensolfonato M(OE)₃MIM OTs **4d** (90%): δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 2.34 (3H, s, CH₃), 3.37 (3H, s, OCH₃), 3.51-3.64 (8H, m, CH₃(OCH₂CH₂)₂O), 3.82 (2H, t, *J* 4.8, OCH₂CH₂N), 3.98 (3H, s, NCH₃), 4.48 (2H, t, *J* 4.8, OCH₂CH₂N), 7.15 (2H, d, *J* 8.2, *arom*), 7.25-7.26 (1H, m, NCH=CHN), 7.59-7.61 (1H, m, NCH=CHN), 7.78 (2H, d, *J* 8.2, *arom*), 9.76 (1H, s, N=CHN).

1-(2-{2-[2-(2-metossi-etossi)-etossi]-etossi}-etil)-3-metilimidazolio *p*-toluenesulfonate M(OE)₄MIM OTs **5d** (66%): δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 2.34 (3H, s, CH₃), 3.34 (3H, s, OCH₃), 3.50-3.65 (12H, m, CH₃(OCH₂CH₂)₃), 3.81 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 3.96 (3H, s, NCH₃), 4.47 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 7.15 (2H, d, *J* 8.2, *arom*), 7.31-7.33 (1H, m, NCH=CHN), 7.61-7.62 (1H, m, NCH=CHN), 7.78 (2H, d, *J* 8.2, *arom*), 9.76 (1H, s, N=CHN).

1-[2-(2-Metossietossi)-etil]-3-metilimidazolio tetrafluoroborato M(OE)₂MIM BF₄ **3a** (61%): δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 3.38 (3H, s, OCH₃), 3.52-3.57 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂O), 3.64-3.68 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂O), 3.87 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 3.97 (3H, s, NCH₃), 4.40 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 7.28-7.29 (1H, m, NCH=CHN), 7.48-7.50 (1H, m, NCH=CHN), 8.87 (1H, s, N=CHN).

1-[2-(2-Metossietossi)-etil]-3-metilimidazolio dicianammide M(OE)₂MIM N(CN)₂ **3b** (65%): δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) 3.35 (3H, s, OCH₃), 3.51-3.53 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂O),

3.63-3.65 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂O), 3.85 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 3.98 (3H, s, NCH₃), 4.41 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 7.37 (1H, d, *J* 3.4, NCH=CHN), 7.53 (1H, d, *J* 3.4, NCH=CHN), 9.06 (1H, s, N=CHN).

1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3-metilimidazolio tetrafluoroborato
M(OE)₃MIM BF₄ **4a** (89%): δ_H (300 MHz, CDCl₃) 3.37 (3H, s, OCH₃), 3.56-3.57 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂), 3.62-3.67 (6H, m, CH₃OCH₂CH₂OCH₂CH₂), 3.85 (2H, t, *J* 3.8, OCH₂CH₂N), 3.95 (3H, s, NCH₃), 4.38 (2H, t, *J* 3.8, OCH₂CH₂N), 7.32 (1H, d, *J* 1.4, NCH=CHN), 7.55 (1H, d, *J* 1.4, NCH=CHN), 8.83 (1H, s, N=CHN).

1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3-metilimidazolio dicianammide M(OE)₃MIM
N(CN)₂ **4b** (96%): δ_H (300 MHz, CDCl₃) 3.39 (3H, s, OCH₃), 3.56-3.60 (2H, m, CH₃OCH₂CH₂), 3.63-3.73 (6H, m, CH₃OCH₂CH₂OCH₂CH₂O), 3.87-3.91 (2H, m, OCH₂CH₂N), 4.03 (3H, s, NCH₃), 4.43-4.47 (2H, m, OCH₂CH₂N), 7.38-7.40 (1H, m, NCH=CHN), 7.62-7.64 (1H, m, NCH=CHN), 9.14 (1H, s, N=CHN).

1-(2-{2-[2-(2-metossi-etossi)-etossi]-etossi}-etil)-3-metilimidazolio dicianammide
M(OE)₄MIM N(CN)₂ **5b** (69%): δ_H (300 MHz, CDCl₃) 3.34 (3H, s, OCH₃), 3.54-3.56 (2H, m, CH₃OCH₂), 3.62-3.70 (10H, m, CH₃OCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₂O), 3.91 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 4.02 (3H, s, NCH₃), 4.45 (2H, t, *J* 4.6, OCH₂CH₂N), 7.40 (1H, d, *J* 3.2, NCH=CHN), 7.64 (1H, d, *J* 3.2, NCH=CHN), 9.15 (1H, s, N=CHN).

Tutti i liquidi ionici sono stati preparati pipettando la quantità richiesta di una soluzione stock un'ora prima delle misure.

Test di tossicità con D. Magna

D. Magna è stata cresciuta presso il Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali (CIRSA), Università di Bologna, (Ravenna, Italia) e mantenuta a 20 ± 1 °C per un fotoperiodo di 16:8 (luce : buio). La tossicità dei liquidi ionici verso *D. magna* è stata valutata utilizzando un test acuto a 48 ore di immobilizzazione secondo le procedure indicate dalla OECD (OECD, 2004). Cinque neonati (età < 24 h; nati per partenogenesi) sono stati introdotti in beaker da 100 mL. Sono state fatte due repliche per ogni becker e per le 8 concentrazioni (controllo più sette concentrazioni) e mantenuti a 20 ± 1 °C per un fotoperiodo di 16:8 ore. Ogni esperimento è stato analizzato alla ricerca di individui immobilizzati a 24 e 48 ore rispettivamente dall'inizio del test. Gli animali non in grado di nuotare nel giro di 15 secondi dall'agitazione del beaker sono stati considerati immobilizzati, anche se in grado di muovere le antenne. La tossicità verso i neonati è stata valutata in due esperimenti, ognuno comprendente 3 prove indipendenti. Nel primo esperimento sono stati indagati i liquidi ionici **1a-b**, **2a-b**, **3a-b** e **4a-b** (sia per gli anioni e tutti gli anioni ad eccezione del MOE₄MIM). Nel secondo esperimento, abbiamo testato gli anioni di cianamide della serie (**1b-5b**), aggiungendo M(OE)₄MIM, per analizzare l'effetto della catena laterale ossigenata. All'interno di ogni serie, tutte le sostanze sono state testate simultaneamente. Le concentrazioni dei test, identificate attraverso un'analisi preliminare per identificare l'intervallo, sono state scelte lungo la serie geometrica da 4 a 40 mg/L per **1a** e per **1b** da 100 mg a 400 mg per tutti i liquidi ionici ossigenati.

Test di tossicità acuta con V. fischeri

I batteri luminescenti *Vibrio f.* (NRRL B-11177), e le soluzioni sono state fornite da Azur Environmental (Carlsbad, CA, USA). I reagenti sono stati conservati a 20 °C e reidratati precedentemente il test. La tossicità verso *Vibrio f.* è stata misurata come inibizione della luminescenza utilizzando un'apparecchiatura Microtox® (Strategic Diagnostics, Newark, DE, USA). Il saggio è stato condotto in accordo con i test standard ed protocolli descritti in Microtox. Analogamente per *D. magna* sono stati condotti due esperimenti. Nel primo esperimento abbiamo confrontato le sostanze **1a-b**, **2a-b**, **3a-b** e **4a-b**. Nel secondo esperimento è stata testata la serie **2b-5b**. Nel primo esperimento 3 prove indipendenti sono state condotte utilizzando 3 vial del kit Microtox (*V. fischeri* liofilizzato). Sono state utilizzate nove concentrazioni per ogni sostanza in una serie di diluizione 1:2 ed un controllo. L'emissione luminosa dei batteri è stata misurata nell'intervallo 0-15 minuti di esposizione usando il modello Microtox 500 Toxicity analyzer. Le concentrazioni del test, identificate attraverso una serie di prove preliminari, sono state scelte nella serie geometrica da 14 a 3600 mg/L per il BMIM; da 70 a 18000 mg/L per i MOEMIM, M(OE)₂MIM e M(OE)₃MIM, e da 35 a 8900 mg/L per **5b**.

In entrambe i test le concentrazioni a cui si trova il 50% di effetto (EC50) sono state calcolate interpolando la curva dose-risposta utilizzando un modello logistico di regressione non lineare con il programma Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Le differenze nei valori di EC50 sono state valutate con il test ANOVA. Un sistema di analisi basato su fattori ortogonali è stato utilizzato nel secondo esperimento, dove un solo anione è stato testato.

Test di citotossicità

Il reagente 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromuro (MTT), l'acetilcolina ioduro (ASCh), NADH ed il piruvato sono stati forniti dalla Aldrich (Milano, Italia). High glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), i sieri sono stati forniti dalla Invitrogen (Milano, Italia).

Colture cellulari

Le cellule PC12 di feocromocitoma di ratto sono state fatte crescere in D-MEM , 1% di penicillina-streptomicina. Le cellule sono state coltivate a 37 °C in un incubatore con umidificatore e CO₂ al 5%. Approssimativamente 2.5×10^5 cellule sono state utilizzate per 2-3 giorni per ogni esperimento in pozzetti di coltura per il saggio dell'AChE, ed 1.25×10^5 cellule in pozzetti per i saggi di determinazione dell'MTT ed LDH. L'esposizione delle cellule ai liquidi ionici è stata condotta per periodi di 16 ore a 37 °C al 5% di CO₂.

Gli esperimenti sono stati organizzati in due gruppi. In una prima serie (intervallo di concentrazione tra 0.5 e 25 mM) i valori di EC50 per **1a**, in una seconda serie le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni.

Saggio MTT

L'MTT test è un saggio colorimetrico e quantitativo che misura la vitalità cellulare basandosi sulla capacità dell'enzima mitocondriale succinil deidrogenasi di convertire nelle cellule viventi il substrato – di colore giallo (MTT) nel sale formazan, di colore

blu scuro. Il saggio è stato condotto seguendo la procedura di Mosmann et al.⁹⁶. Dopo l'esposizione ai liquidi ionici il mezzo di coltura è stato rimpiazzato con 1 mL di soluzione di MTT in DMEM e messo in incubazione per un'ora e mezza a 37 °C con un 5% di CO₂.

Il mezzo è stato rimosso ed i cristalli di formazan sciolti in 1 mL di isopropanolo e centrifugati per 2 minuti a 15,000 x g. I valori di assorbanza sono stati misurati usando uno spettrometro Multi Sample DU800 Beckman a lunghezze d'onda di 570 nm e di 650 nm (background) rispettivamente. I risultati sono indicati come percentuale rispetto al controllo.

Rilascio dell'LDH

Il rilascio dell'LDH è un saggio spettrofotometrico utilizzato come end-point negli studi di tossicità cellulare, basato sulla misura del rilascio dell'LDH dal citosol di cellule danneggiate nel mezzo di coltura. La procedura del test è stata adattata da Kending e Tarloff⁹⁷ con piccole modifiche. Dopo l'esposizione delle cellule il mezzo di coltura è stato recuperato ed un 1 mL di soluzione di lisi contenente lo 0.1 % di Triton X-100 è stato aggiunto ad una soluzione 100 mM di sodio fosfato (pH 7.4) ed è stato aggiunto al mezzo di coltura. Le cellule sono state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente e la lisi è stata confermata tramite letture al microscopio. Il mezzo di coltura ed il lisato cellulare è stato centrifugato per 2 minuti a 15,000 x g. L'attività dell'LDH è stata misurata nel surnatante dopo l'aggiunta di 2.85 mL di piruvato a 0.3 mM in soluzione di fosfato a pH 7.4 ed a 50 µL di soluzione 8 mM di NADH ed a 100 µL di campione. I

⁹⁶ Mosmann, T., 1983., J. Immunol. Methods. 65, 55-63.

⁹⁷ Kendig, D.M., Tarloff, J.B, 2007. Toxicol. In Vitro. 21, 125-132.

valori di assorbanza sono stati registrati ogni 5 minuti a 340 nm. La percentuale di LDH rilasciato è stata calcolata come rapporto tra l'LDH rilasciato nel mezzo di coltura e la quantità totale di LDH, valore riferito come percentuale rispetto al totale.

Inibizione dell'AChE

L'inibizione dell'AChE intracellulare è stata misurata usando un test colorimetrico basato sulla riduzione del DTNB (acido ditio-bis-2-nitrobenzoico) ad opera della porzione di tiocolina ottenuta dall'azione della AChE sul substrato di acetilcolina ioduro. Dopo gli esperimenti, le cellule sono state lavate con un buffer salino fosfato (PBS), staccate utilizzando uno scraper e centrifugate per 10 minuti a 800 x g a 4 °C. I pellet risospesi in ghiaccio a 10 mM di buffer Na-fosfato, pH 7.2, contenente l'1% di Nonidet-P40. Dopo 1 ora in ghiaccio l'omogenato è stato centrifugato a 3000 x g a 4 °C per 10 minuti ed il surnatante è stato utilizzato per la determinazione enzimatica intracellulare. Il saggio è stato condotto utilizzando la procedura di Ellman⁹⁸ con acetilcolina ioduro come substrato, e la concentrazione di proteine è stata determinata tramite metodo Lowry⁹⁹ utilizzando siero bovino standard. In una procedura tipica 0.06 mg di proteine sono state incubate a 30 °C per un volume finale di 1.2 mL contenenti: 100 mM di buffer fosfato, pH 7.4 e 0.3 mM di DTNB. L'attività enzimatica è stata quantificata spettrofotometricamente a 412 nm, monitorando l'incubazione ad intervalli di 1 minuto per 5 minuti. L'attività dell'AChE è stata espressa come $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ di proteine.

⁹⁸ Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

⁹⁹ Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

In ogni esperimento è stato misurato un bianco per valutare la reazione dei tioli con il DTNB. Il trattamento con BW284c51, un inibitore selettivo dell'AChE, ha indicato un'attività enzimatica del 95% ascrivibile all'AChE.

Proprietà fisiche di membrane

La dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e l'1,6-difenil-1,3,5-esatriene (DPH) sono stati forniti dalla Aldrich (Milano, Italia). Le soluzioni stock di DPH 5 mM in acetonitrile ed una sospensione di 10 mg mL⁻¹ di DMPC in PBS (Phosphate Buffer Saline) sono state preparate quotidianamente, e conservate al buio a 5 °C prima dell'utilizzo, aspettando almeno mezz'ora prima dell'incubazione con i liposomi.

Le analisi di fluorescenza in stato stazionario del DPH in presenza di liquidi ionici e di DMPC sono state determinate nell'intervallo 14 °C -32 °C, registrando misure ogni due gradi. Per ogni misura, una cuvetta di quarzo (Hellman, Francia) è stata utilizzata con un cammino ottico di 10 mm. Le lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione sono state 360 e 430 nm rispettivamente. Le misure di fluorescenza sono state condotte su uno spettrofluorimetro PTI (Photon Technology International), equipaggiato con un Motor-Driver 5020, una lampada Power Supply LPS-220B e con software FeliX per Windows.

3.3 Liquidi ionici e fusione di membrana

In questo studio sono stati analizzati gli effetti di differenti gruppi di liquidi ionici utilizzando saggi di fusione di membrana, con l'impiego di liposomi di fosfatidilcolina. I liquidi ionici utilizzati sono composti da corte catene alchiliche e catene laterali con funzionalità eteree (una o due), collegate a diverse teste cationiche: metilimidazolinio, 3-metil piridinio e N-metil pirrolidinio; i cationi sono associati ad anioni di tipo cloruro.

Il comportamento dei suddetti liquidi ionici è stato confrontato con l'1-dodecil-3-metil-immidazolinio bromuro **1g**, sostanza altamente lipofila. Per valutare l'effetto dell'anione sulla fusione di membrana il liquido ionico 1-butil-3-metil-imidazolinio cloruro è stato confrontato con liquidi ionici aventi anione dicianamide e tetrafluoroborato. La molecola fluorescente pirene è stata utilizzata per valutare la fusione di membrana, utilizzando un IE Factor per calcolare il grado di fusione tra i liposomi. I valori di IE Factor sono stati misurati valutando la variazione del rapporto tra i massimi di emissione delle popolazioni degli eccimeri e dei monomeri nello spettro di emissione del pirene. Il Py forma delle popolazioni di eccimeri dipendentemente dalle condizioni di mobilità nelle membrane lipidiche e di concentrazione (Figura 3.3.1). Il rapporto tra le bande vibroniche del pirene (rapporto I_1/I_3) è stato usato per monitorare l'effetto dei liquidi ionici sulle proprietà di aggregazione dei liposomi. L'effetto di diverse famiglie di liquidi ionici è risultato evidente; i liquidi ionici di tipo piridinico determinano un maggior grado di fusione di quelli pirrolidinici e piridinici che hanno le stesse catene laterali sul catione.

I liquidi ionici con corte catene alchiliche sono stati solitamente più attivi di quelli con funzionalità eteree. Il liquido ionico **1g** è stato di gran lunga quello maggiormente

attivo. A basse concentrazioni i liquidi ionici hanno causato un aumento nelle popolazioni di pirene, effetto dovuto probabilmente all'inserzione delle catene alchiliche nella zona centrale, apolare del liposoma. La tipologia di anione non ha mostrato differenze significative negli esperimenti.

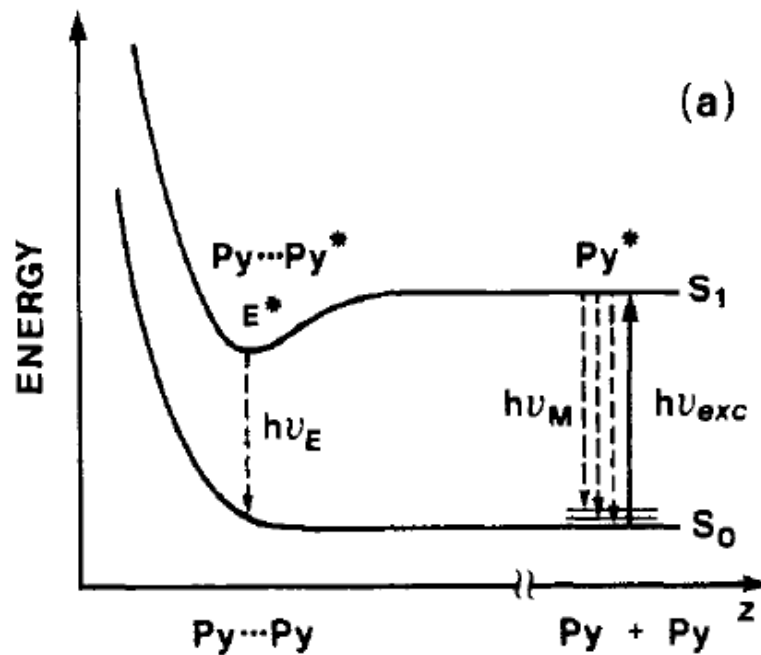


Figura 3.3.1: Diagrammi schematici delle energie potenziali di formazione di eccimeri del pirene (Py).

La fusione di membrane lipidica viene definita come un processo che trasforma dei distinti doppi strati lipidici (o comparti lipidici) in un sistema lipidico comune, e questo processo è stato schematizzato attraverso una serie di intermedi lipidici¹⁰⁰ che razionalizzano i processi di adesione e fusione delle membrane (Figura 3.3.2).

¹⁰⁰ Lentz, B.R. *Eur Biophys J* 2007, 36, 315-326.

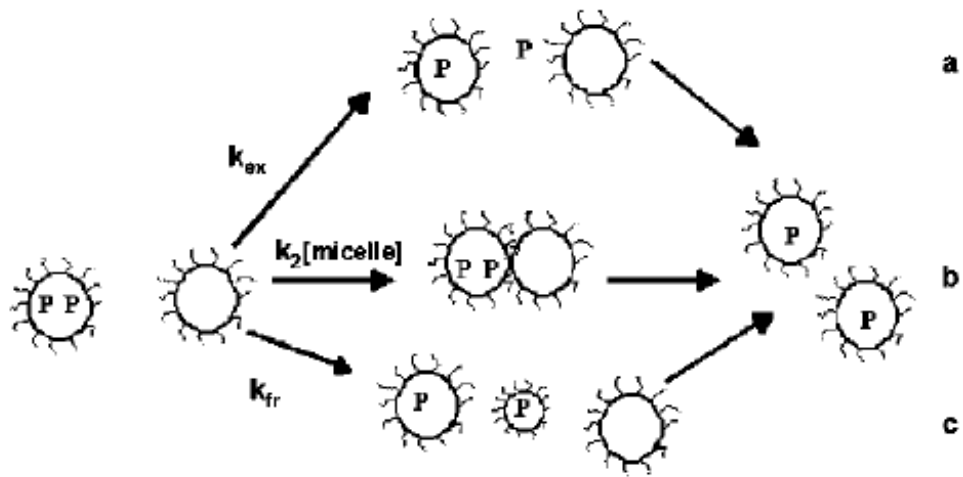
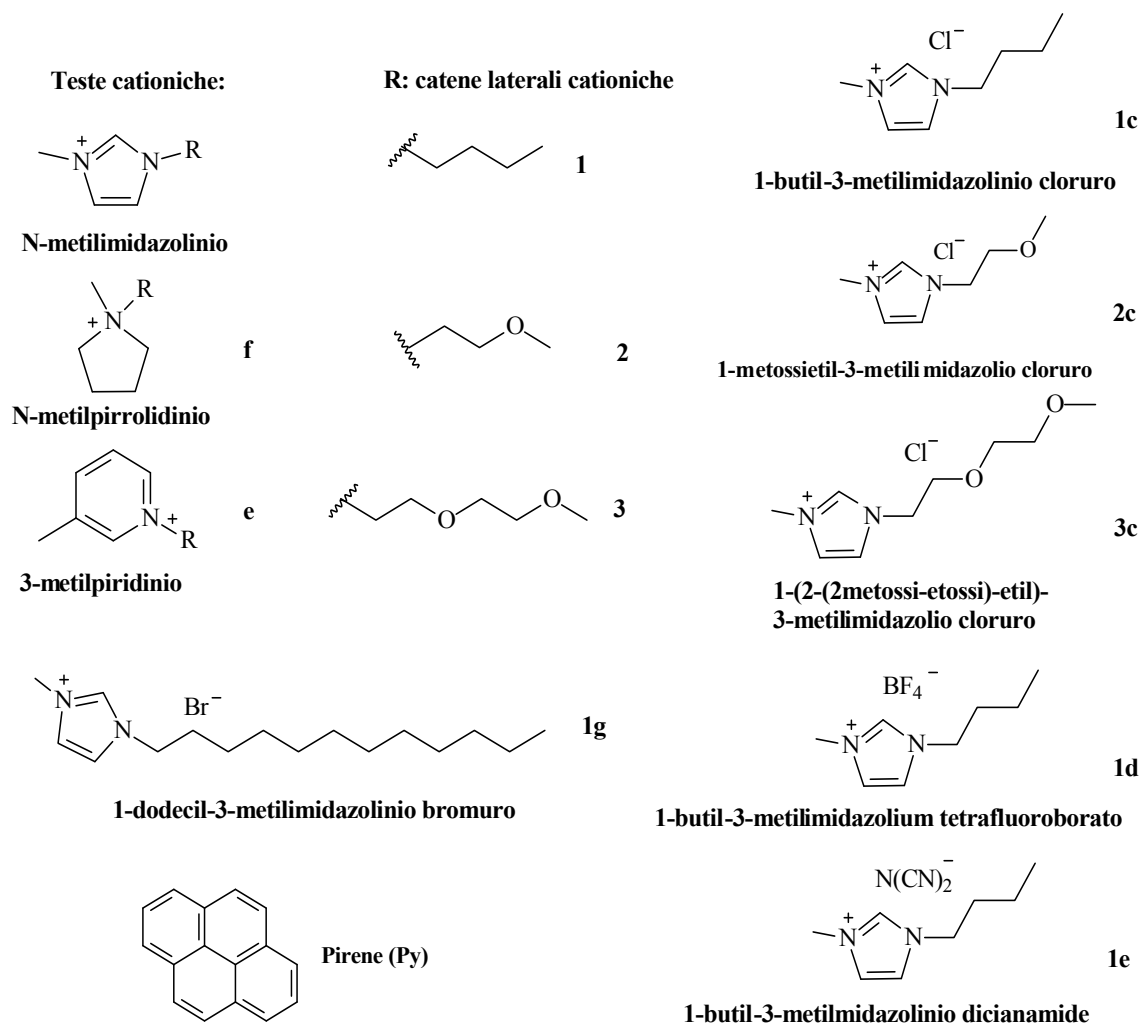


Figura 3.3.2: Schematizzazione dei processi (a, b, c) che portano a fenomeni di fusione di membrana¹⁰¹.

¹⁰¹ Rahrbi, Y., Winnick M.A., Jacs, 2002, 124, 10, 2082-2083.



Schema 3.3.1. Struttura della sonda fluorescente pirene (Py) e teste cationiche, catene laterali dei cationi, di un gruppo di liquidi ionici rappresentativo delle sostanze sintetizzate.

Liposomi di rac-fosfatidilcolina sono stati utilizzati come modelli di membrane cellulari¹⁰². I liquidi ionici utilizzati sono costituiti da sostanze che presentano teste cationiche con N-metilimidazolinio, 3-metilpiridinio, N-metilpirrolidinio, con corte catene alchiliche e catene laterali eteree (con una o due funzionalità). Una famiglia di

¹⁰² Sessa, G.; Weissmann, G. *J. Lipid Res.* 1968, 9, 310–318.

liquidi ionici come esempio delle sostanze utilizzate è rappresentata nello Schema 3.3.1. Da confrontare con questi liquidi ionici abbiamo scelto una sostanza che presenta una lunga catena alchilica, l'1-dodecil-3-metil-imidazolinio bromuro (**1g**), le cui proprietà micellari sono note in letteratura^{103 104}.

E' noto che il Py forma dei dimeri allo stato eccitato (eccimeri) in reazioni che dipendono dalla composizione di membrana, dalla temperatura, e dalla concentrazione del Py¹⁰⁵.

Inoltre le molecole di Py sono capaci di veloce di diffusione laterale in ambiente lipidico, da cui dipende la formazione egli eccimeri. E' stato recentemente dimostrato che il Py è localizzato prevalentemente all'interfaccia della zona lipidica composta dalle catene idrofobiche e le teste polari dei lipidi¹⁰⁶. La Figura 3.3.1 A mostra gli spettri di emissione del Py in soluzione tampone (vedi sezione materiali e metodi) a differenti concentrazioni del liquido ionico **1a** da 0.5 mM a 800 mM. Come atteso, in assenza di lipidi, le maggiori concentrazioni di liquidi ionici intensificano lo spettro del Py creando una diminuzione nella polarità dell'ambiente acquoso dove il Py è solubilizzato. Il picco relativo all'emissione dell'eccimero non è presente nella regione dello spettro compresa tra 460 e 500 nm, confermando l'assenza di specie di eccimero senza la presenza di

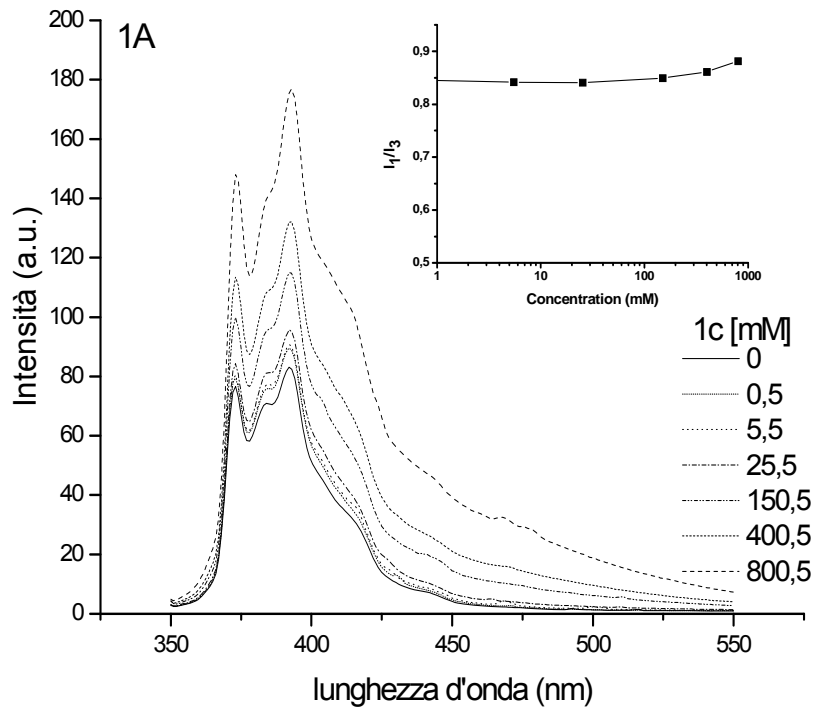
¹⁰³ Li, N.; Zhang, S.; Zheng, L.; Dong, B.; Li, X.; Yu, L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 4375-4377.

¹⁰⁴ Blesic, M.; Marquez, M. H.; Plechkova, N. V.; Seddon, K. R.; Rebelo, L. P. N.; Lopes, A. *Green Chem.* 2007, 9, 481-490.

¹⁰⁵ Dong, D. C.; Winnick, M. A. *Photochem. Photobiol.* 1982, 35, 17-21.

¹⁰⁶ Waka, Y.; Hamamoto, K.; Mataga, N. *Photochem. Photobiol.* 1980, 32, 27-35.

liposomi in soluzione, o a concentrazioni di liquido ionico inferiori alla concentrazione micellare critica (cmc) (da letteratura superiore, ma non misurata, a 800 mM)¹⁰⁷.



¹⁰⁷ Winnik, F. M. *Chem. Rev.* 1993, 93, 587-614.

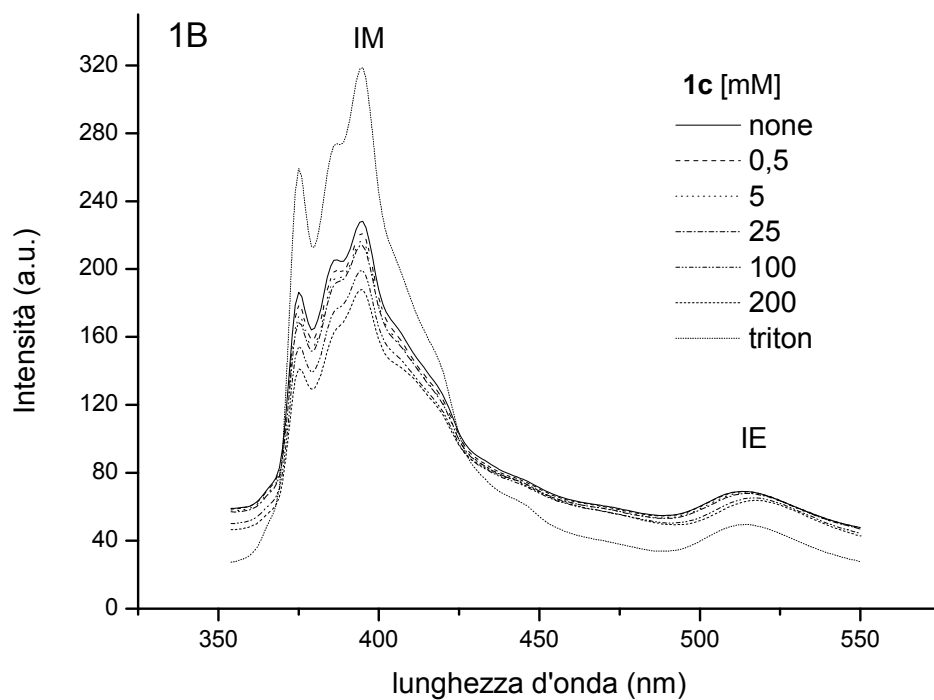


Figura 3.3.1 A: Spettri di emissione del Py acquisiti a differenti concentrazioni (mM) in soluzione buffer. Insetto: Rapporto I_1/I_3 del Py calcolato a differenti concentrazioni di **1c**.

Figura 3.3.1 B: Sovrapposizione degli spettri di fluorescenza del Py in liposomi, calcolati a diverse concentrazioni di **1c** (mM), confrontate con lo spettro del Triton X-100.

Caratteristiche tipiche dello spettro del Py sono i massimi a 376, 385 e 395 nm, dovuti alle bande vibroniche, conosciute per risentire delle condizioni dell'ambiente di membrana o delle condizioni al contorno¹⁰⁸. Questa proprietà è stata precedentemente utilizzata per valutare i cambiamenti dei microambienti in cui il Py può venire disciolto¹⁰⁹. Il rapporto tra la prima e la terza banda vibronica (I_1/I_3) fornisce una misura della polarità dell'ambiente, dove un aumento nel rapporto I_1/I_3 è indicativo di un aumento di polarità.

L'insero di figura 3.3.1A mostra anche il comportamento del rapporto I_1/I_3 nell'intervallo di concentrazione 0-800 mM. Il valore I_1/I_3 ha una tendenza costante in tutto l'intervallo, con valori che si spostano da 0.85 a 0.87 con un piccolo aumento per le concentrazioni maggiori. Questo valore è inferiore rispetto al valore atteso 0.9 per l'acqua pura¹¹⁰. La figura 3.3.1B mostra il comportamento dello spettro di emissione del Py in liposomi esposti a differenti concentrazioni di **1a** insieme allo spettro sovrapposto ottenuto per una concentrazione di Triton X-100. Il Py forma eccimeri le cui caratteristiche di fluorescenza, ed il rapporto eccimero su monomero sono dipendenti dalle dinamiche di membrana. In figura 1B è possibile osservare l'aumento nell'intensità del picco relativo all'emissione del monomero (IM) e la diminuzione del picco dell'eccimero (IE) dopo l'iniezione del Triton X-100, una molecola anfifilica dotata di note proprietà detergenti.

¹⁰⁸ Herrenbauer, 2002 M. Herrenbauer, Biosorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) to Microorganisms and Liposomes, Shaker Verlag, Aachen, Germany 2002.

¹⁰⁹ Bowers, J.; Butts, C. P.; Martin, P. J.; Vergara-Gutierrez, M. C. Langmuir 2004, 20, 2191-2198.

¹¹⁰ Saxena, R.; Shrivastava, S.; Chattopadhyay, A. J. Phys. Chem. B 2008, 112, 12134-12138.

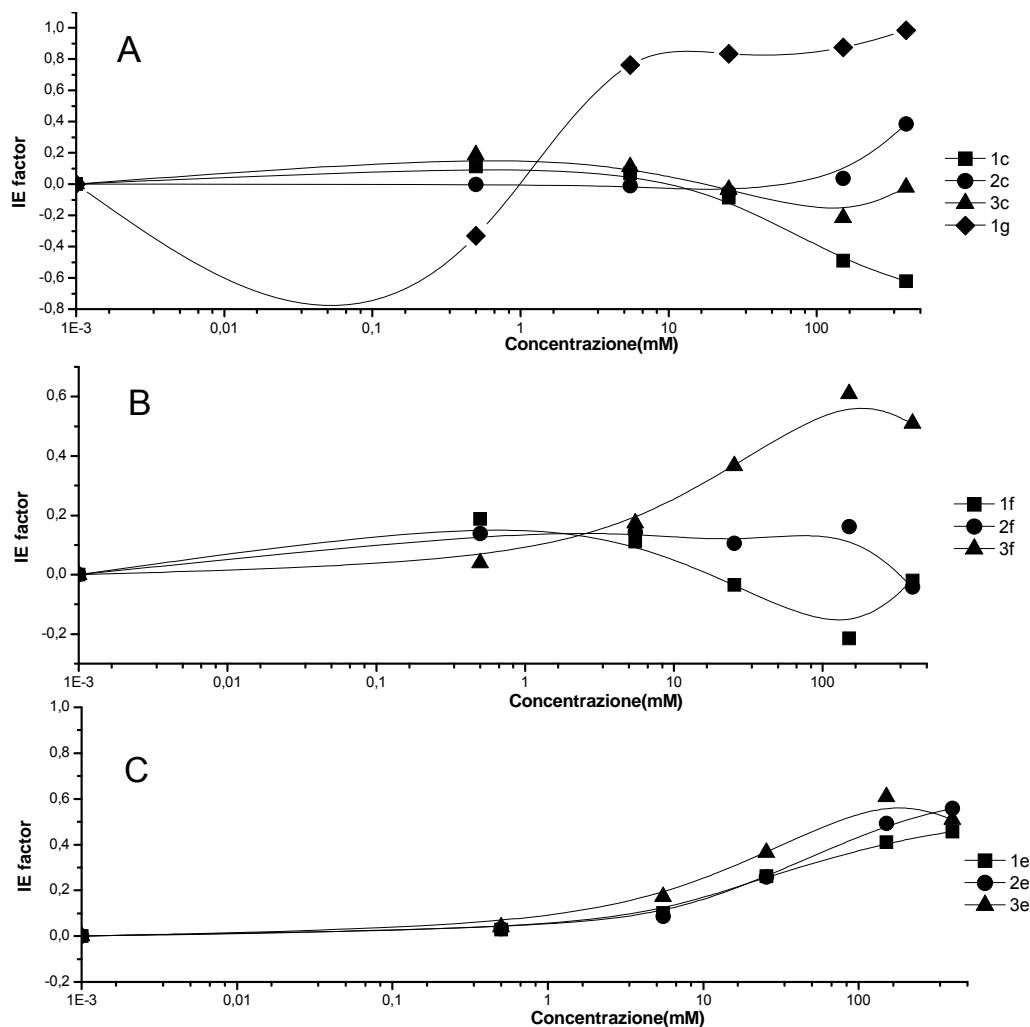


Figura 3.3.2. IE factor. Figura A) Liquidi ionici di N-metil-imidazolinio cloruro **1c-3c**.
 Figura B) Liquidi ionici di N-metilpirrolidinio **1f-3f**. Figura C) Liquidi ionici di 3-metil
 piridinio **1e-3e**.

Gli effetti dei liquidi ionici indagati sono espressi con IE Factor nella figura 3.3.2. L'IE factor rappresenta il grado di variazione nell'intensità degli eccimeri, confrontato con l'intensità degli eccimeri ottenuta dopo l'esposizione al Triton X-100. Valori negativi di

IE factor evidenziano un aumento nella quantità degli eccimeri, mentre valori positivi indicano una diminuzione nella popolazione degli eccimeri.

I liquidi ionici sono stati raggruppati seguendo la presenza della testa cationica: imidazolinici (Figura 3.3.2, A), pirrolidinici (Figura 3.3.2, B) e piridinici (Figura 3.3.2, C). Ogni gruppo contiene sostanze con una diversa struttura nella catena laterale del catione: senza atomi di ossigeno (**1a**, **2a**, **3a**), con una (**1b**, **2b**, **3b**) o due (**1c**, **2c**, **3c**) funzionalità etossi nella catena laterale. L'effetto del liquido ionico **1g** è aggiunto per confronto.

Come si può vedere dalla figura, il liquido ionico **1f** crea una diminuzione nel rapporto IE nell'intervallo di concentrazioni da 0.5 mM a 1 mM, suggerendo una alterazione nel doppio strato senza distruzione del doppio strato lipidico dei liposomi ed un aumento nella mobilità laterale (dipendente dal coefficiente di diffusione) dovuto ad un cambiamento nell'uniformità di impaccamento dei lipidi. Abbiamo attribuito questo comportamento all'inserzione delle catene alchiliche dei cationi nei doppi strati dei liposomi, elemento che facilita la formazione di popolazioni di eccimeri. A concentrazioni maggiori di 1 mM la lunga catena alchilica di **1f** crea una forte destabilizzazione dei liposomi, seguita dal rilascio dei monomeri di Py e dalla distruzione degli aggregati lipidici; nel contempo **1f** crea delle micelle che incorporano le molecole di Py.

Tutti i liquidi ionici testati (**1c-3c**, **1e-3e**, **1f-3f**) generano un fenomeno opposto, l'inserzione delle corte catene alchiliche o delle catene etossilate diminuisce la popolazione di eccimeri a basse concentrazioni dei liquidi ionici. A concentrazioni maggiori di 25 mM per i liquidi ionici di tipo imidazolinico (Figura 3.3.2, A) ed a 5 mM

per i liquidi ionici di tipo pirrolidinico (Figura 3.3.2, B) non è possibile identificare un trend univoco. Sugeriamo che l'interazione dei cationi dei liquidi ionici e l'inserzione nei doppi strati lipidici crea eventi che localmente possono aumentare le concentrazioni della sonda, fenomeno che aumenta la probabilità di formazione degli eccimeri e l'aumento del fattore IE, che può alterare localmente il rapporto IE.

Una tendenza lineare nella diminuzione delle popolazioni di IE può essere identificata solo per i liquidi ionici di tipo piridinico **1e-3e** (Figura 3.3.2, C), per i quali la diminuzione nella popolazione di eccimeri raggiunge il 60% se confrontata con il Triton X-100 e che aumenta all'aumentare della lunghezza della catena laterale.

L'analisi statistica evidenzia che le differenze nel comportamento del fattore IE per i liquidi ionici **1c-3c**, **1e-3e**, **1f-3f** sono statisticamente significative per ogni gruppo e a varie concentrazioni.

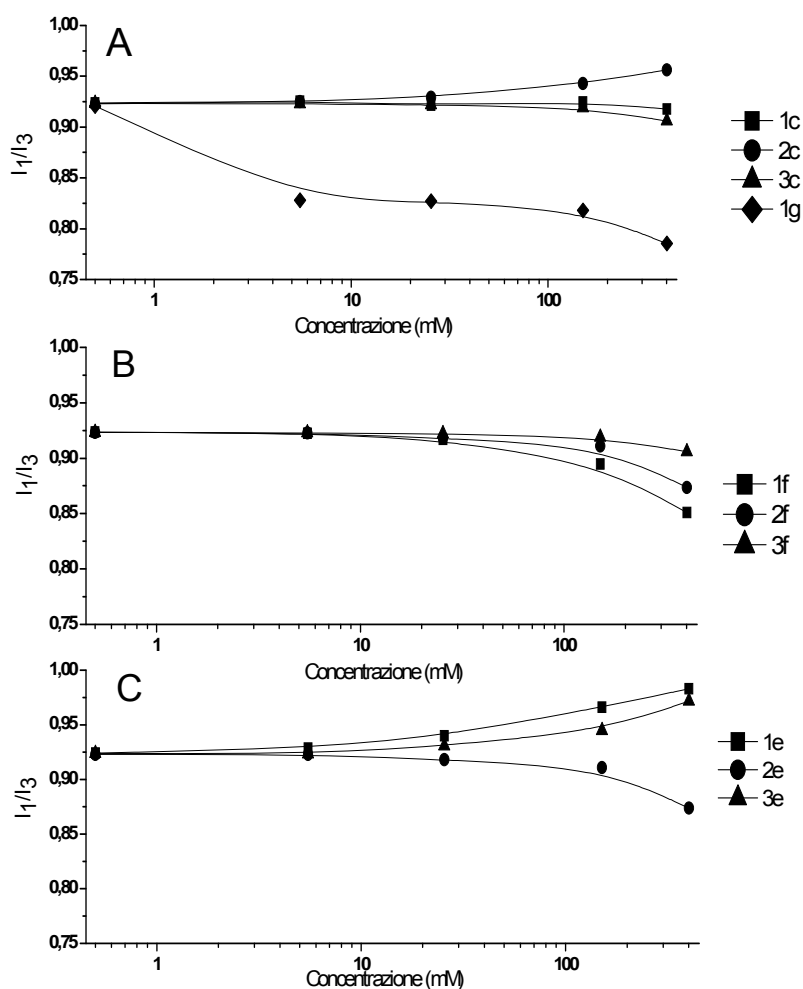


Figura 3.3.3: Misure del rapporto tra le bande vibroniche per i 3 gruppi di liquidi ionici, selezionati per le loro teste cationiche. Figura A) N-metilimidazolinio cloruri. Figura B) N-metilpirrolidinio cloruri. Figura C) 3-metilpiridinio cloruri.

L'intensità relativa delle bande vibroniche I_1/I_3 del Py sono mostrate in Figura 3.3.3. In questo caso il Py è stato usato per vedere le alterazioni nella micropolarità locale delle membrane di fosfatidilcolina, causate dall'incorporazione dei liquidi ionici. È interessante notare che i valori di rapporti indicati qui, intorno a 0.92, sono in buon accordo con quelli osservati per simili aggregati di fosfatidilcolina (1.09). Il rapporto I_1/I_3 è previsto aumentare rapidamente, spostandosi da un ambiente idrofobico composto

da catene alchiliche dei lipidi ad uno maggiormente idrofilico. In presenza di micelle ed altri sistemi macromolecolari. Il Py è preferenzialmente solubilizzato nell'interno delle zone idrofobiche degli aggregati, a causa della scarsa solubilità dello stesso in acqua. Dai trend osservati possiamo affermare che la concentrazione micellare critica non viene raggiunta per tutti i liquidi ionici studiati, ad eccezione di **1g**; in questo caso la cmc viene raggiunta a 1.5 mM e il rapporto I_1/I_3 cambia da valori di 0.92 a 0.78. Il valore di concentrazione micellare critica di **1g** è più basso di quello previsto in letteratura per delle soluzioni acquose (Tabelle 3.3.1), questo dato è consistente con l'abbassamento della cmc ad opera dei sali presenti in soluzione, in quanto l'aggiunta di Sali decresce il valore di concentrazione micellare critica e determina un abbassamento nelle repulsioni tra le teste polari dei lipidi. Il rapporto I_1/I_3 denota un ambiente maggiormente idrofobico per il Py (valore 0.78) dopo il raggiungimento della cmc, suggerendo, come indicato dai valori di IE, l'inserzione delle lunghe catene alchiliche nel doppio strato dei liposomi.

Tabella 3.3.1. Confronto tra I valori di cmc del liquid ionico **1f** ottenuti dall'IE factor e dal rapporto I_1/I_3 .

Liquidi ionici	cmc (mM)
Soluzioni acquose di NaCl 0.5 M	1.4 ^{19e}
Acqua deionizzata	9 ^{19c} - 9.8 ^{19g} - 11 ^{19c} - 10.9 ^{19e}
Lavoro corrente	1.5

Un piccolo aumento nei rapporti I_1/I_3 è osservabile per i liquidi ionici **2c**, **3c** e **3f**, suggerendo che questi composti non sono attivi sugli aggregati lipidici, ma interferiscono con la stabilità del doppio strato lipidico, causando un piccolo aumento nell'indice di polarità del microambiente del Py. Questo aumento è visibile solo per concentrazioni maggiori di 50 mM. I risultati ottenuti sono confrontabili con dati ottenuti da altri lavori che indicano che la cmc per liquidi ionici con corte catene alchiliche come **1c** vengono raggiunte a concentrazioni superiori di 900 mM¹¹¹.

Le osservazioni basate sul rapporto IE e sulle bande vibroniche del Py sono sostenute dall'analisi dello scattering di fluorescenza su liposomi in presenza di diversi liquidi ionici a concentrazioni crescenti. Lo scattering indotto dai liquidi ionici in tutto lo spettro non ha subito cambiamenti rilevanti ad eccezione dello spettro di **1g** (Figura 3.3.4), dove i valori di scattering decrescono rapidamente in corrispondenza della cmc, conseguentemente alla alterazione dei liposomi.

¹¹¹ Vekshin, N.L. *Stud. Biophys.* 1985, 106, 69–78.

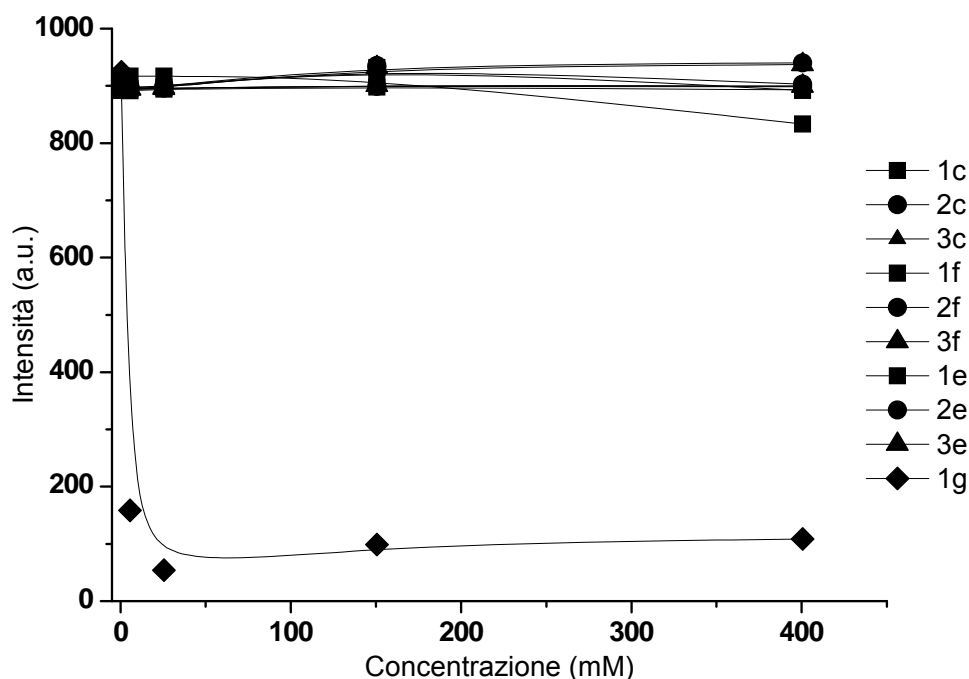


Figura 3.3.4. Misure di scattering di fluorescenza per i 3 gruppi di liquidi ionici nell'intervallo di concentrazioni considerato.

In letteratura i liquidi ionici con le stesse teste cationiche ma differenti anioni, vengono sintetizzate per ottenere molecole con similarità strutturali ma differenze nelle proprietà fisico-chimiche, quali la solubilità in acqua, la lipofilicità ed il punto di fusione. Per capire l'effetto degli anioni sulle proprietà di aggregazione dei liposomi, abbiamo esposto liposomi caricati con Py a differenti concentrazioni di liquidi ionici composti da cationi 1-butil-3-metilimidazolinici ed anioni di comune utilizzo. Abbiamo poi confrontato i valori di fusione ottenuti da queste sostanze con i corrispondenti sali di sodio.

Gli effetti dei valori di IE factor e del rapporto I_1/I_3 di diverse combinazioni di anionizzazione nei liquidi ionici sono stati quindi investigati confrontando 3 liquidi ionici basati sul catione 1-butil-3-metilimidazolinio: anioni cloruro **1c**, tetrafluoroborato **1a**, di cianamide **1b** (Figura 3.3.5).

A concentrazioni inferiori di 25 mM tutti i liquidi ionici hanno effetti simili sia sui valori di IE factor che sul rapporto I_1/I_3 , ma il loro comportamento diventa molto differente a concentrazioni superiori: **1a** e **1b** creano un maggior grado di fusione che **1c**. Questa tendenza è confermata dai valori di tossicità, dove gli anioni cloruro sono meno tossici dei corrispondenti tetrafluoroborati e dicianammide ¹¹².

In Figura 3.3.6 viene riportato un confronto degli effetti dei sali NaCl, NaBF₄ e NaN(CN)₂ sul rapporto IE e sul rapporto I_1/I_3 . In tutto l'intervallo di concentrazioni utilizzato qui il valore di IE factor viene abbassato dall'aggiunta di concentrazioni crescenti di sali di sodio, con una dipendenza diretta dalla concentrazione; il rapporto I_1/I_3 aumenta per concentrazioni superiori di 100 – 200 mM di NaCl e NaBF₄ ma non per l'aggiunta di NaN(CN)₂.

¹¹² Docherty, K. M.; and Kulpa, C. F. Jr. *Green Chem.*, 2005, 7, 185-189.

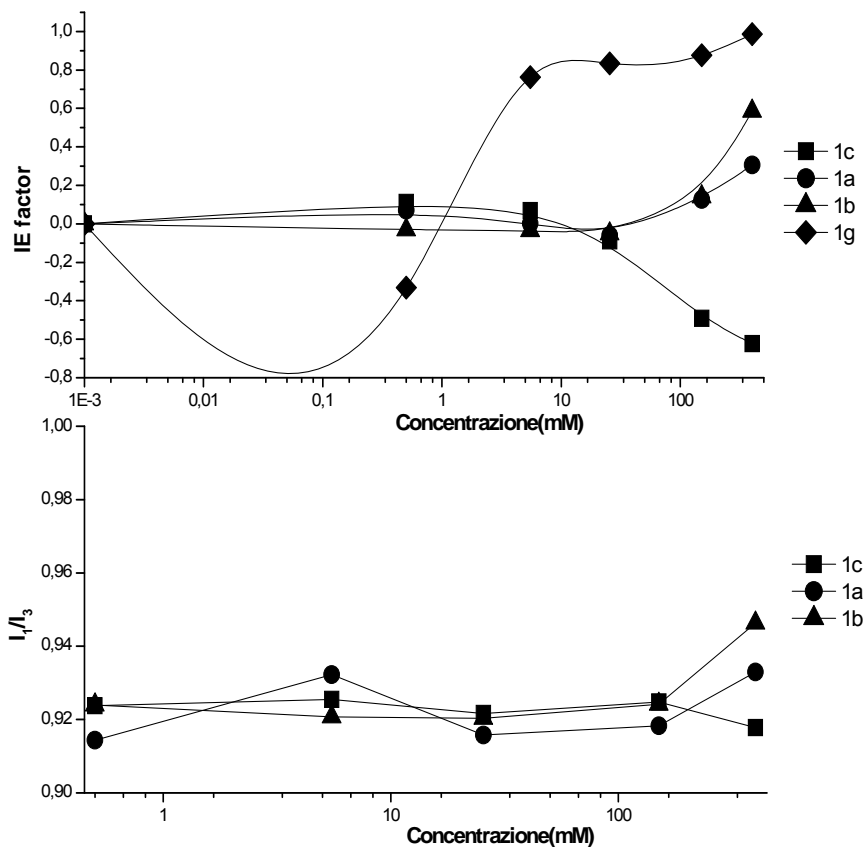


Figura 3.3.5. Confronto dei valori di IE Factor e del rapporto I_1/I_3 per diversi liquidi ionici con catione 1-butil-3-metil imidazolinio: (■) 1c, (◆) 1a, (▲) 1b e 1g.

L'abbassamento del valore di IE factor ed un aumento nei valori di I_1/I_3 può essere spiegato con l'adsorbimento dei cationi di sodio sulla superficie dei liposomi, diminuendo le repulsioni elettrostatiche tra i lipidi e facilitando l'aggregazione lipidica¹¹³; questa tendenza è solo marginalmente influenzata dal tipo di anione. Le piccole

¹¹³ Jungnickel, C.; Luczak, J.; Ranke, J.; Fernandez, J. F.; Muller, A.; Thoming, J. *Colloid Surface A* 2008, 316, 278-284.

differenze nei risultati tra il comportamento del rapporto I_1/I_3 per gli anioni Cl, BF_4 e $N(CN)_2$ può essere spiegato dalle maggiori dimensioni dell'anione BF_4 e $N(CN)_2$ che diminuiscono le interazioni con i doppi strati lipidici dei liposomi.

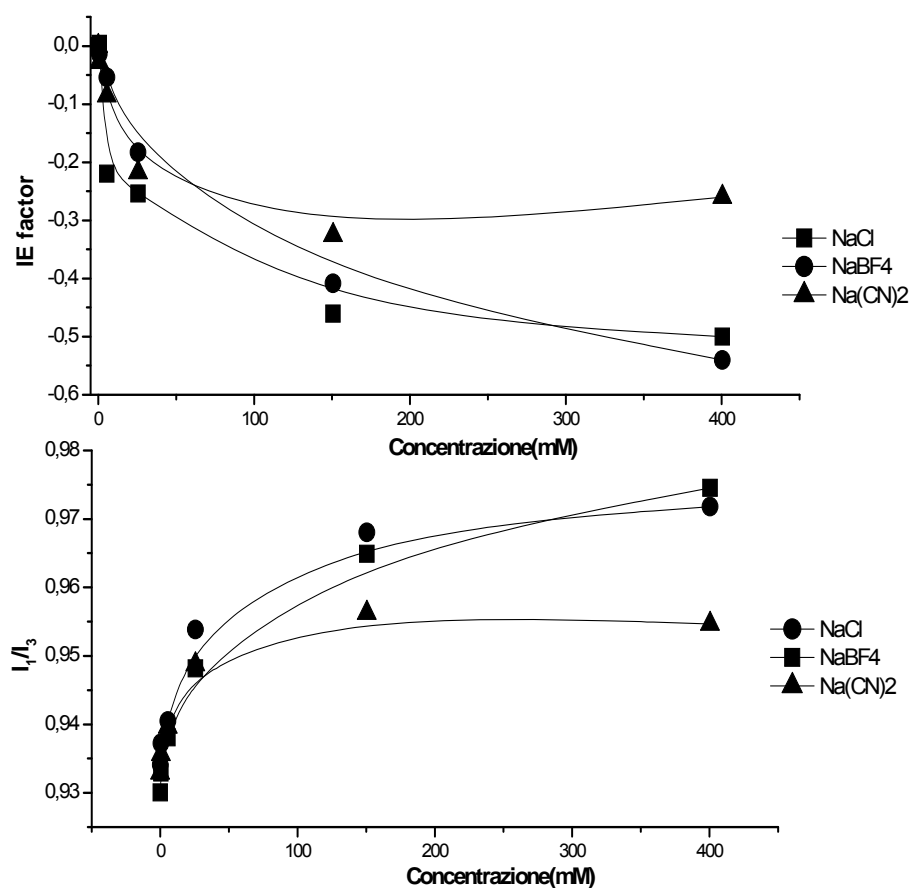


Figura 3.3.6. Confronto dei valori di IE factor e di rapporto I_1/I_3 di differenti anioni accoppiati a cationi sodio: (◊) NaCl, (■) NaBF₄, (▲) NaN(CN)₂.

Per comprendere se i dati ottenuti dalle misure di IE factor possono essere correlate con i trend di tossicità, gli IE factor ottenuti per gli N-metil imidazolio, i liquidi ionici di N-metil pirrolidinio e 3-metil piridinio sono stati confrontati con i dati di tossicità ottenuti

dal test che impiega il batterio marino *Vibrio fischeri*, un comune target biologico nei saggi a carattere ecotossicologico . Il nostro scopo è stato quello di investigare se i liposomi fosfolipidici rappresentano un valido modello di membrane cellulari, utilizzabile per identificare un trend di tossicità dei liquidi ionici. I valori di EC50 di differenti liquidi ionici ottenuti con il test di inibizione della luminosità di *Vibrio fischeri* sono riportati in Tabella 3.3.2. Questi dati derivano da analisi presenti in letteratura riferibili e rappresentative dei diversi gruppi di liquidi ionici studiati: alchilimidazolinici, imidazolinici con funzionalità ossigenate, piridinici e pirrolidinici.

I valori di IE factor registrati e le concentrazioni sono riportati in Tabella 3.3.2, e correlano bene con i dati di tossicità ottenuti con il batterio *Vibrio fischeri*; ad esempio liquidi ionici di tipo BMIM sono più attivi di quelli mono-ossigenati nell'intervallo di concentrazione 1-10 mM.

I liquidi ionici di tipo piridinico risultano più tossici di un ordine di grandezza di quelli imidazolinici e pirrolidinici nei confronti del microorganismo *Vibrio fischeri* ed inducono un maggior grado di fusione nei liposomi alle stesse concentrazioni, mentre i liquidi ionici di tipo pirrolidinico risultano meno tossici nei saggi biologici come nei test di fusione. Mentre l'aggiunta di funzionalità etossiliche diminuisce la tossicità, una chiara tendenza non è identificabile tramite il test di fusione di membrana ad alte concentrazioni. Abbiamo ipotizzato che i liquidi ionici con una o due funzionalità etossi non sono capaci di distruggere la membrana lipidica ma la destabilizzano a concentrazioni superiori a 100 mM, creando un esteso fenomeno di fusione a tali concentrazioni; questo effetto comunque non è direttamente collegabile alle tendenze di tossicità riscontrabili con organismi, in quanto si verifica a concentrazioni nettamente più alte ed è indice delle interazioni con sistemi lipidici o di membrana.

Tabella 3.3.2. Tossicità acuta e valori di IE factor dei liquidi ionici nei confronti del batterio *Vibrio fischeri* (valori di EC₅₀ sono espressi in mM).

LI	EC ₅₀ (mM)	IE factor (%)
BMIM Cl	2.5 ^{*114}	11
MOEMIM Cl	15.1 ¹¹⁵	0
BMPy Cl	0.5 ^{*116}	14
BMPyr Cl	>20 ¹²⁷	3

*EC₅₀ valore medio

¹¹⁴ Blesic, M.; Lopes, A.; Melo, E.; Petrovski, Z.; Plechkova, N. V.; Canongia Lopes, J. N.; Seddon, K. R.; Rebelo, L. P. N. J. Phys. Chem. B 2008, 112, 8645-8650.

¹¹⁵ Matzke, M.; Stolte, S.; Thiele, K.; Juffernholz, T.; Arning, J.; Ranke, J.; Welz-Biermann U.; and Jastorff, B. Green Chem., 2007, 9, 1198-1207.

¹¹⁶ Stolte, S.; Matzke, M.; Arning, J.; Bösch, A.; Pitner, W.-R.; Urs Welz-Biermann, U.; Jastorff, B.; and Ranke, J. Green Chem. 2007, 9, 1170-1179.

Tutti i liquidi ionici testati hanno generato fenomeni di fusione nei liposomi. Tuttavia, come indicato dai valori di IE Factor e dai rapporti I_1/I_3 , i liquidi ionici testati non distruggono completamente i doppi strati fosfolipidici a concentrazioni inferiori di 0.5 M, ad eccezione del liquido ionico **1g**, che distrugge i doppi strati e determina un esteso fenomeno di fusione a basse concentrazioni. Tra i tre gruppi di liquidi ionici, i liquidi ionici con testa cationica piridinica sono risultati essere quelli maggiormente attivi, mentre gli anioni non giocano un ruolo importante nel determinare l'interazione di membrana. E' stata riscontrata una buona corrispondenza con i dati di tossicità verso il batterio marino *Vibrio fischeri*, per cui il test di fusione di membrana può rappresentare un test preliminare utilizzabile come indicazione di tossicità verso microorganismi acquatici per concentrazioni inferiori ai 50 mM. Ad alte concentrazioni il processo di fusione di membrana diventa troppo esteso ed il suo andamento non può essere correlato con il trend di tossicità. A causa dei molteplici target fisiologici, il meccanismo di tossicità dei liquidi ionici rimane lacunoso, benché le interazioni con le membrane cellulari sono un effetto considerevole. La comprensione del meccanismo specifico di azione dei liquidi ionici è una fase fondamentale per la progettazione di molecole a minor impatto ambientale ed a ridotta tossicità.

Materiali e Metodi

Tutti i reagenti, la *rac*-fosfatidilcolina, i solventi sono stati forniti da Aldrich; 1-metilimidazolo, 3-metil-piridina, 1-metilpirrolidina, 1-clorobutano e il 2-cloroetil metiletere

sono stati ridi stillati prima dell'uso per evitare la formazione di impurezze colorate nei liquidi ionici.

Il 2-(2-Metossi-etossi)-etil cloruro ($\text{CH}_3(\text{OCH}_2)_2\text{Cl}$) **6a**, 2-(2-(2-metossi-etossi)-etossi)-etil cloruro ($\text{CH}_3(\text{OCH}_2)_3\text{Cl}$) **7a**, sono stati sintetizzati dai corrispondenti etilenglicoli monometil eteri seguendo le procedure riportate in letteratura¹¹⁷.

Una soluzione di tionilcloruro (92 mmol) in CHCl_3 (15 mL) è stata aggiunta attraverso un imbuto gocciolatore ad una soluzione di etilenglicole monometil eteri in agitazione, trietilenglicole monometil eteri o tetraetilenglicolemonometil eteri (72 mmol), piridina (72 mmol) in CHCl_3 (60 mL) sotto N_2 . Il sistema di reazione è stato agitato per 3 ore a riflusso e successivamente lavato con 300 mL di acqua, disidratato con Na_2SO_4 , e concentrato al rotavapor. Il prodotto ottenuto è stato utilizzato senza ulteriori purificazioni.

$\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{Cl}$ 6a, (resa >99%). ^1H NMR (400 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 3.32$ (s, 3H, CH_3O), 3.48-3.50 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}$), 3.56-3.61 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) e 3.67-3.70 ppm (m, 2H, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). ^{13}C NMR (100 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 42.17, 58.58, 70.10, 70.92, 71.43$

Tutti i sali cloruro **1c-3c**, **1e-3e**, **1f-3f** sono stati preparati aggiungendo il corrispondente alchil cloruro (72 mmol) ad una soluzione in agitazione di 1-metilimidazolo o 3-metil piridina o 1-metil pirroli dina (1.1 eq., 65.4 mmol); la reazione è stata agitata per 20 h a

¹¹⁷ Gudipati, V.; Curran, D.; Wilcox, C. *J. Org. Chem.* 2002, 71, 9, 3599-3607.

90 °C (50 °C per BMIM Cl **1c** e BMPy Cl **1e**), e poi disidratati sotto vuoto a 70 °C per una notte.

C₁₂MIM Br 1g, (99%). ¹H NMR (400 MHz; CDCl₃): δ_H = 0.83-0.87(t, CH₃(CH₂)₁₀CH₂N), 1.22-1.31 (m, CH₃(CH₂)₉CH₂N), 1.89 (m, CH₃(CH₂)₉CH₂CH₂N), 4.11 (s, CH₃N), 4.28-4.31 (t, CH₃(CH₂)₁₀CH₂N), 7.36-7.37 (d, NCH=CHN), 7.51-7.52 (d, NCH=CHN), e 10.34 ppm (s, N=CHN). ¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃): δ_C =14.0, 22.55, 26.15, 29.46, 36.86, 50.07, 77.0, 122.1, 137.35.

BMIM Cl 1c, (98%). Per i dati NMR si veda la parte di materiali e metodi del capitolo 3.2.

MOEMIM Cl 2c, (92%). Per i dati NMR si veda la parte di materiali e metodi del capitolo 3.2.

M(OE)₂MIM Cl 3c, (90%). ¹H NMR (400 MHz; D₂O): δ_H=3.37 (s, 3H, CH₃O), 3.61-3.63 (m, 2H, CH₃OCH₂CH₂O(CH₂)₂N), 3.70-3.72 (m, 2H, CH₃OCH₂CH₂O(CH₂)₂N), 3.92-3.94 (m, 2H, CH₃O(CH₂)₂OCH₂CH₂N), 3.93 (s, 3H, NCH₃), 4.41-4.43 (m, 2H, CH₃O(CH₂)₂OCH₂CH₂N), 7.48 (d, 1H, J=2 Hz, NCH=CHN), e 7.54 ppm (d, 1H, J=2 Hz, NCH=CHN). ¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃): δ_C =36.31, 50.06, 58.57, 68.94, 71.43, 72.00, 123.52, 123.9, 137.71.

Procedura di sintesi dei liquidi ionici di tipo piridinico: gli alchilcloruri sono stati aggiunti (72 mmol) ad una soluzione di 3-metilpiridina (65.4 mmol); il miscuglio di reazione è stato lasciato in agitazione per 20 h a 90 °C (50°C per BMIM Cl) e successivamente lavato in acetato di etile e dietiletere. Il liquido è stato disidratato sotto vuoto a 70 °C per una notte.

BMPy Cl 1e, (97%). ^1H NMR (400 MHz; $D_2\text{O}$): $\delta_{\text{H}} = 0.94\text{-}0.98$ (m, 3H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}$), 1.35-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 2.00-2.04 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.58 (s, 3H, CH_3), 4.59-4.62 (m, 2H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.95-7.99 (m, 1H, *H* meta), 8.39 (d, 1H, $J=8$ Hz, *H* para), 8.70 (d, 1H, $J=6$ Hz, *H* orto), e 8.76 ppm (s, 1H, *H* orto). ^{13}C NMR (100 MHz; $D_2\text{O}$): $\delta_{\text{C}} = 12.95, 17.92, 18.94, 32.78, 61.67, 127.62, 140.06, 141.51, 143.91, 146.12$.

MOEMPy Cl 2e, (98%). ^1H NMR (400 MHz; $D_2\text{O}$): $\delta_{\text{H}} = 2.57$ (s, 3H, CH_3), 3.38 (s, 3H, CH_3O), 3.96-3.99 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.75-4.79 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.97 (dd, 1H, $J=6$ and 8 Hz, *H* meta), 8.42 (d, 1H, $J=8$ Hz, *H* para), 8.66 (d, 1H, $J=6$, *H* orto), e 8.71 ppm (s, 1H, *H* orto). ^{13}C NMR (100 MHz; $D_2\text{O}$): $\delta_{\text{C}} = 17.80, 58.56, 60.84, 70.38, 127.50, 140.04, 141.91, 144.21, 146.62$.

M(OE)₂MPy Cl 3e, (95%). ^1H NMR (400 MHz; $D_2\text{O}$): $\delta_{\text{H}} = 2.58$ (s, 3H, CH_3), 3.32 (s, 3H, CH_3O), 3.55-3.57 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.67-3.69 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 4.05 (t, 2H, $J=5.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.76-4.79 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.97 (dd, 1H, $J=6$ and 8 Hz, *H* meta), 8.43 (d, 1H, $J=8$ Hz, *H* para), 8.69 (d, 1H, $J=6$ Hz, *H* orto), e 8.73 ppm (s, 1H, *H* orto). ^{13}C NMR (100 MHz; $D_2\text{O}$): $\delta_{\text{C}} = 17.82, 58.20, 60.99, 68.93, 69.78, 71.01, 127.45, 139.94, 141.99, 144.36, 146.62$.

Procedura generale di sintesi dei liquidi ionici pirrolidinici: gli alchilcloruri sono stati aggiunti (72 mmol) ad una soluzione di N-metilpirrolidina (65.4 mmol); il miscuglio di reazione è stato lasciato in agitazione per 20 h a 90 °C (50°C per BMIM Cl) e successivamente lavato in acetato di etile e dietilere. Il liquido è stato disidratato sotto vuoto a 70 °C per una notte.

BMPrI Cl 1f, (95%). ^1H NMR (400 MHz; D_2O) $\delta_{\text{H}} = 0.97$ (3 H, t, J 4.4, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}$), 1.37-1.44 (2 H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 1.76-1.84 (2 H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.21-2.25 (4 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3.06 (3 H, s, CH_3), 3.33-3.37 (2 H, m, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), e 3.50-3.54 (4 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$). ^{13}C NMR (100 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 13.01$, 19.44, 21.49 ($\times 2$), 25.27, 48.24, 64.28, 64.40 ($\times 2$).

MOEMPrI Cl 2f, (94%). ^1H NMR (400 MHz; D_2O) $\delta_{\text{H}} = 2.28$ (4 H, bs, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3.17 (3 H, s, CH_3), 3.48 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.64-3.69 (6 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), e 3.96-3.98 (2 H, m, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$). ^{13}C NMR (100 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 21.34$ ($\times 2$), 48.78, 58.52, 62.95, 65.44 ($\times 2$), 66.50.

M(OE)₂MPrI Cl 3f, (97%). ^1H NMR (400 MHz; D_2O) 2.24-2.25 (4 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3.13 (3 H, s, CH_3), 3.40 (3 H, s, $\text{CH}_3(\text{O}(\text{CH}_2)_2)_2\text{N}$), 3.59-3.64 (6 H, m, $\text{CH}_3(\text{O}(\text{CH}_2)_2)\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.66-3.68 (2 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 3.72-3.74 (2 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), e 3.99-4.00 (2 H, m, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$). ^{13}C NMR (100 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 21.24$ ($\times 2$), 48.66, 58.22, 63.07, 64.89 ($\times 2$), 65.42, 69.67, 71.13.

Il composto **1b** è stato preparato attraverso una reazione di metatesi con $\text{NaN}(\text{CN})_2$.

Il sale cloruro (**1c**, 30 mmol) è stato aggiunto ad una sospensione di $\text{NaN}(\text{CN})_2$ (1.2 eq., 36 mmol) in acetone (75 mL). Il miscuglio è rimasto in agitazione a temperatura ambiente per 2 giorni; l'alogenuro di sodio precipitato è stato filtrato. La sostanza diluita in acetone è stata filtrata su colonna con gel di silice. Il solvente è stato rimosso al rotavapor, producendo un liquido giallognolo.

BMIM N(CN)₂ 1b, per i dati NMR si veda la parte di materiali e metodi del capitolo 3.2.

Le vie sintetiche e le procedure di purificazione sono riportate nel capitolo 3.1. Tutti i liquidi ionici utilizzati negli esperimenti sono stati seccati per una notte a 80° C sotto vuoto, prima di svolgere gli esperimenti e precedentemente all'aggiunta dei liposomi. Le specifiche concentrazioni di liquidi ionici sono state ottenute attraverso successive diluizioni in soluzioni buffer. Il Py è stato fornito da Fluka, Milano, Italia. Per la preparazione dei campioni è stata usata acqua Milli-Q. Le soluzioni stock di pirene, sono state preparate a 3 mM in etanolo e conservate a 4° C al buio.

La fosfatidilcolina è stata disciolta in una soluzione cloroformio:etanolo (3:1 v/v) e seccata a temperatura ambiente fino a dare un sottile film sotto flusso di N₂. Il film lipidico è stato idratato in una soluzione buffer a pH 8 contenente NaCl 140 mM, Tris HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, vortexato vigorosamente per 7 minuti e sottoposto a 20 cicli di estrusione attraverso una membrana in policarbonato con pori di 100 nm, utilizzando una siringa Lipofast (Avestin, Ottawa, Canada).

Il metodo di fusione di membrana è stato adottato dal metodo di Schoen et al.¹¹⁸. I test di fusione e le misure di scattering di fluorescenza sono state svolte con un spettrofluorimetro Jasco FP-6200 equipaggiato con una cuvetta termostata in agitazione magnetica. Una aliquota di liposomi è stata preventivamente caricata con Py 3 μM e mescolata con un'aliquota di liposomi che non presentano pirene. Gli spettri di emissione sono stati raccolti nell'intervallo 350-550 nm, con eccitazione del Py a 340

¹¹⁸ Schoen, P.; Leserman, L.; Wilschut, J. *FEBS Letters* 1996, 390, 315-318.

nm. In questo intervallo sono stati misurati i valori dei massimi dello spettro di emissione relativamente a 395 nm (IM - intensità del monomero) ed a 515 nm (IE – intensità di emissione dell'eccimero). Gli spettri di emissione e di eccitazione sono stati misurati con un'apertura nominale delle fenditure di 5 nm. La fusione dei liposomi indotta dai liquidi ionici è stata condotta aggiungendo un'aliquota di liposomi privi di pirene (in rapporto 1 : 2, p/p) in presenza o assenza di liquidi ionici a differenti concentrazioni (aggiunti 30 mL di soluzione con liquidi ionici). La fusione di membrana indotta dai liquidi ionici è stata espressa come percentuale relativa alla fusione indotta dal Triton X-100, un detergente di ampio utilizzo, aggiunto alle soluzioni con liposomi allo 0.01 % (v/v). I valori relativi di fluorescenza sono stati calcolati tramite la formula $100 \times (IE_0 - IE_x) / (IE_0 - IE_{tot})$, dove IE rappresenta l'intensità di fluorescenza dell'eccimero durante la fusione, e IE_0 e IE_{tot} rappresentano rispettivamente le intensità misurate a 515 nm a concentrazione zero e dopo l'aggiunta di Triton X-100. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a 298 ° K. Tutti gli spettri di fluorescenza sono stati misurati dopo sottrazione del bianco. La prima e la terza banda vibronica del Py, rispettivamente I_1 e I_3 , sono state registrate a 376 e 385 nm. Le misure di scattering di fluorescenza sono state condotte con eccitando a 400 nm e registrando lo spettro nell'intervallo 380 – 420 nm.

Il programma statistico Primer (versione 6.0) è stato utilizzato per l'analisi statistica dei dati. Sono stati confrontati tutti i liquidi ionici (10 livelli fissi, liquidi ionici **1c-3c**, **1e-3e**, **1f-3f**, **1g**); concentrazioni considerate (6 livelli fissi: 0, 0.5, 5, 25, 150, 400 mM).

Per testare le differenze tra IL e le concentrazioni è stata applicata l'analisi della varianza (PERMANOVA¹¹⁹) a due vie calcolata sulle distanze euclidee tra i dati non trattati. I dati sono stati considerati significativamente differenti se $p < 0.05$.

¹¹⁹ Anderson, M. J.; ter Braak, C. J. F. *J. Statist. Comput. Simul.* 2003, 73, 85-113.

3.4 Polidiacetilene come sonda di membrana

Nella ricerca di biosensori che siano attivi verso un'ampia gamma di cambiamenti ambientali e chimici, le matrici lipidiche composte da lipidi (naturali o artificiali) e polidiacetilene sono state indagate da tempo come versatili sistemi biomimetici in grado di emettere un segnale analizzabile con spettroscopia di fluorescenza ed anche di cambiamenti colorimetrici.

Questi tipi di sensori sono composti da acidi grassi che si auto-assemblano in domini polimerici nella matrice lipidica in cui vengono immersi, se sottoposti a luce ultravioletta di specifica lunghezza d'onda (254 nm) (Figura 3.4.1).

In letteratura sono presenti numerose applicazioni dei sistemi lipidi/PDA, che hanno aperto diverse strade per il rilevamento colorimetrico di proteine, acidi nucleici ed interi microorganismi attraverso la formazione di legami covalenti tra specifici recettori ai domini di polidiacetilene.

Un esempio è rappresentato dal rilevamento del virus dell'influenza attraverso la funzionalizzazione dei residui di carbossilati della superficie del PDA con molecole di acido sialico^{120 121}.

¹²⁰ Charych D.H. et al., 1993, *Biomol. Mater.*, 292,153–161.

¹²¹ Spevak W., Nagy J.O., Charych D., 1995, *Adv Mater*, 7, 1, 85–89.

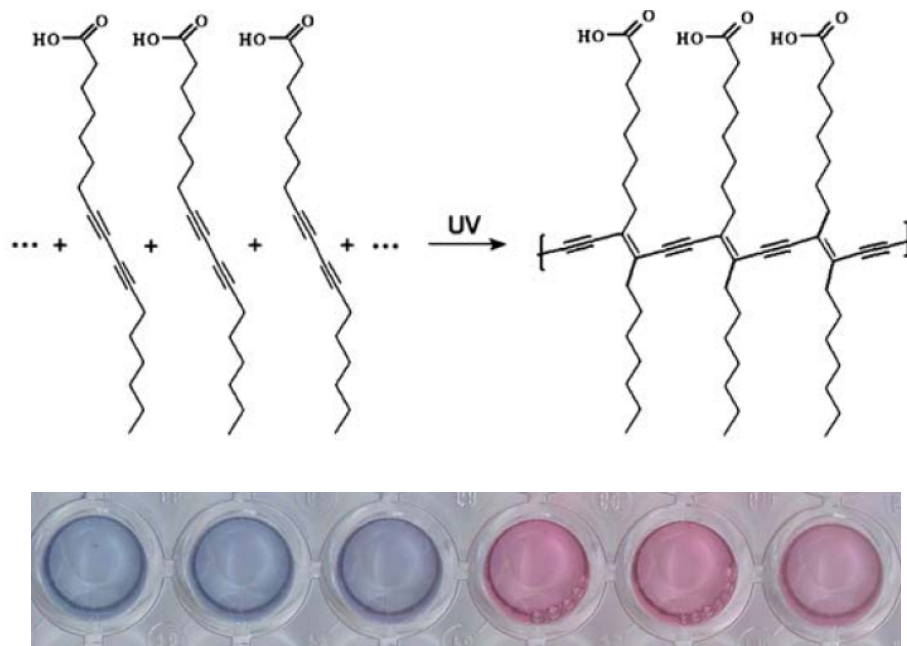


Figura 3.4.1: Meccanismo di polimerizzazione dell'acido 10,12-tricosadinoico irraggiato con raggi UV e relativi cambiamenti colorimetri in pozzetti da 80 μL .

Sono presenti anche esempi di rilevamento di pezzi di DNA attraverso la funzionalizzazione del PDA con pezzi di oligonucleotidi ¹²² (Figura 3.4.2).

Il rilevamento selettivo di batteri è stato condotto con la creazione di liposomi che presentano diversi rapporti di monomeri di TR funzionalizzate con unità di fenolo e di indoli¹²³. Le diverse quantità di lipopolisaccaridi espressi dai batteri ha permesso l'identificazione selettiva di specifici batteri, come se avessero una impronta digitale specifica. Un altro esempio importante è costituito dalla possibilità di incorporare nella matrice di lipidi/PDA dei gangliosidi, così da identificare la tossina del colera tramite

¹²² Wang C., Ma Z., 2005, *Anal Bioanal Chem*, 382, 7, 1708–1710.

¹²³ Rangin M., Basu A., 2004, *J Am Chem Soc*, 126, 16, 5038–5039.

l'interazione con i residui dei gruppi funzionali presenti in testa alle molecole dei gangliosidi¹²⁴.

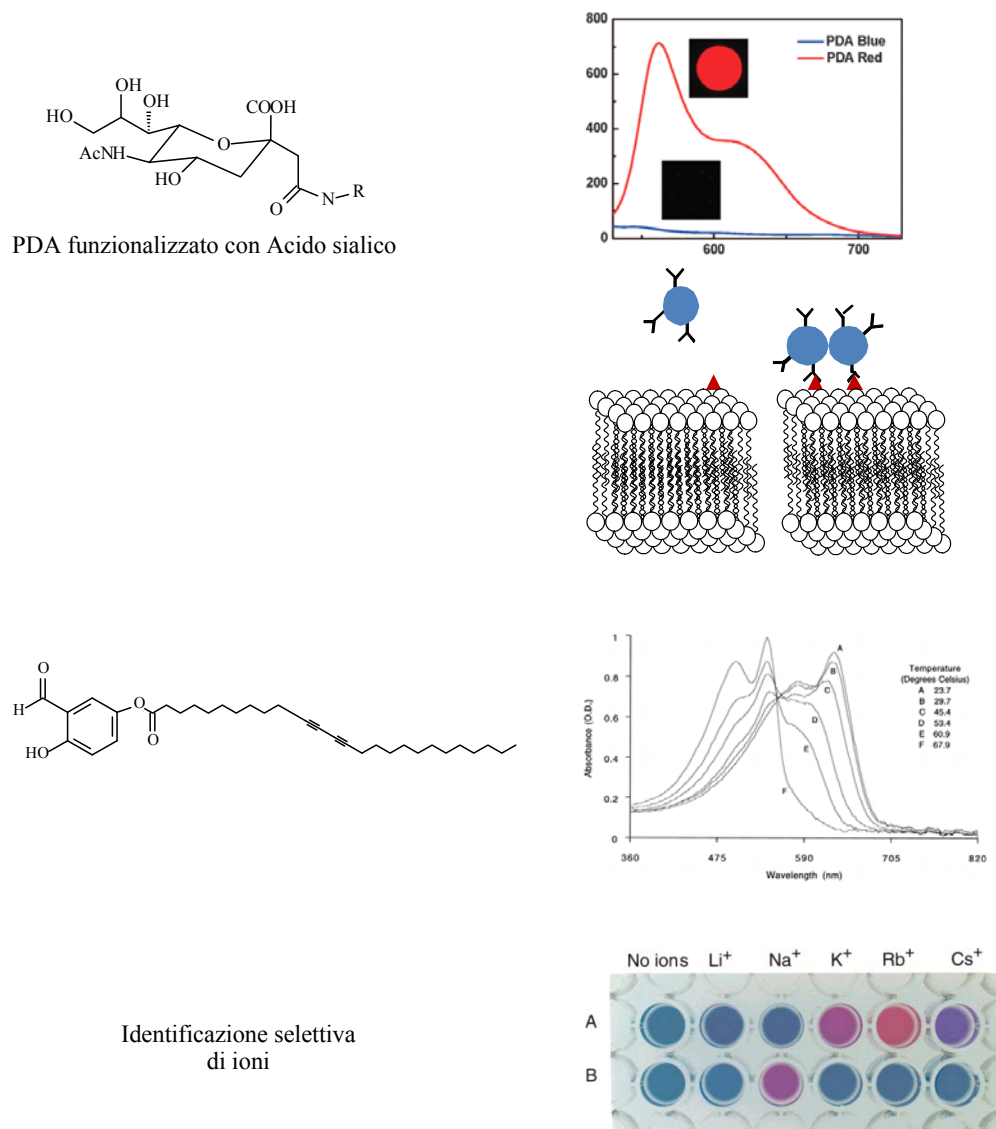


Figura 3.4.2: Esempi di molecole di PDA funzionalizzate con sostituenti specifici per il rilevamento di virus e tossine.

¹²⁴ Baek M-G., Stevens R.C., Charych D.H., 2000, *Bioconjug Chem*, 11, 777–788.

Dopo l'irraggiamento con luce ultravioletta i domini di PDA intercalati ai lipidi esibiscono proprietà colorimetriche che cambiano dipendentemente ai diversi meccanismi di perturbazione dell'ambiente di membrana. In letteratura sono presenti studi che mostrano come si possano categorizzare i tipi di interazioni con delle molecole ad azione farmaceutica tramite questo sistema¹²⁵. Vi sono molecole che interagiscono prevalentemente con le teste cariche dell'ambiente più esterno delle membrane lipidiche, vi sono molecole che passano attraverso l'ambiente di membrana liberamente, non necessitando di nessun meccanismo per passare l'ambiente apolare delle catene alchiliche dei lipidi plasmatici e ci sono sostanze che non interagiscono con questo sistema, rimanendo confinate nell'ambiente esterno ai lipidi, perché maggiormente idrofiliche o perché necessitano di meccanismi di trasporto attivo per passare la prima struttura di difesa cellulare (Figura 3.4.3).

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Professor Jelinek dell'università Ben Gurion di Beer Sheva, Israele, abbiamo scelto di utilizzare questo sistema colorimetrico di rilevamento delle interazioni di membrana per ottenere delle informazioni sul meccanismo d'azione dei liquidi ionici, in funzione della loro struttura, per comprendere se la presenza di certe funzionalità nel catione dei liquidi ionici possa portare a meccanismi d'azione differenti sulle membrane lipidiche. I dati ottenuti tramite una serie di saggi che impiegano il PDA sono stati confrontati con i risultati di tecniche classiche di indagine degli effetti delle sostanze sulle membrane lipidiche.

Gli esperimenti sono stati svolti durante un periodo di ricerca sostenuto dal progetto Marco Polo dell'Università di Bologna.

¹²⁵ Katz, M. Ben-Shlush, B., Kolusheva, S., Jelinek, R., *Pharmaceutical Research*, 23, 3, 2006.

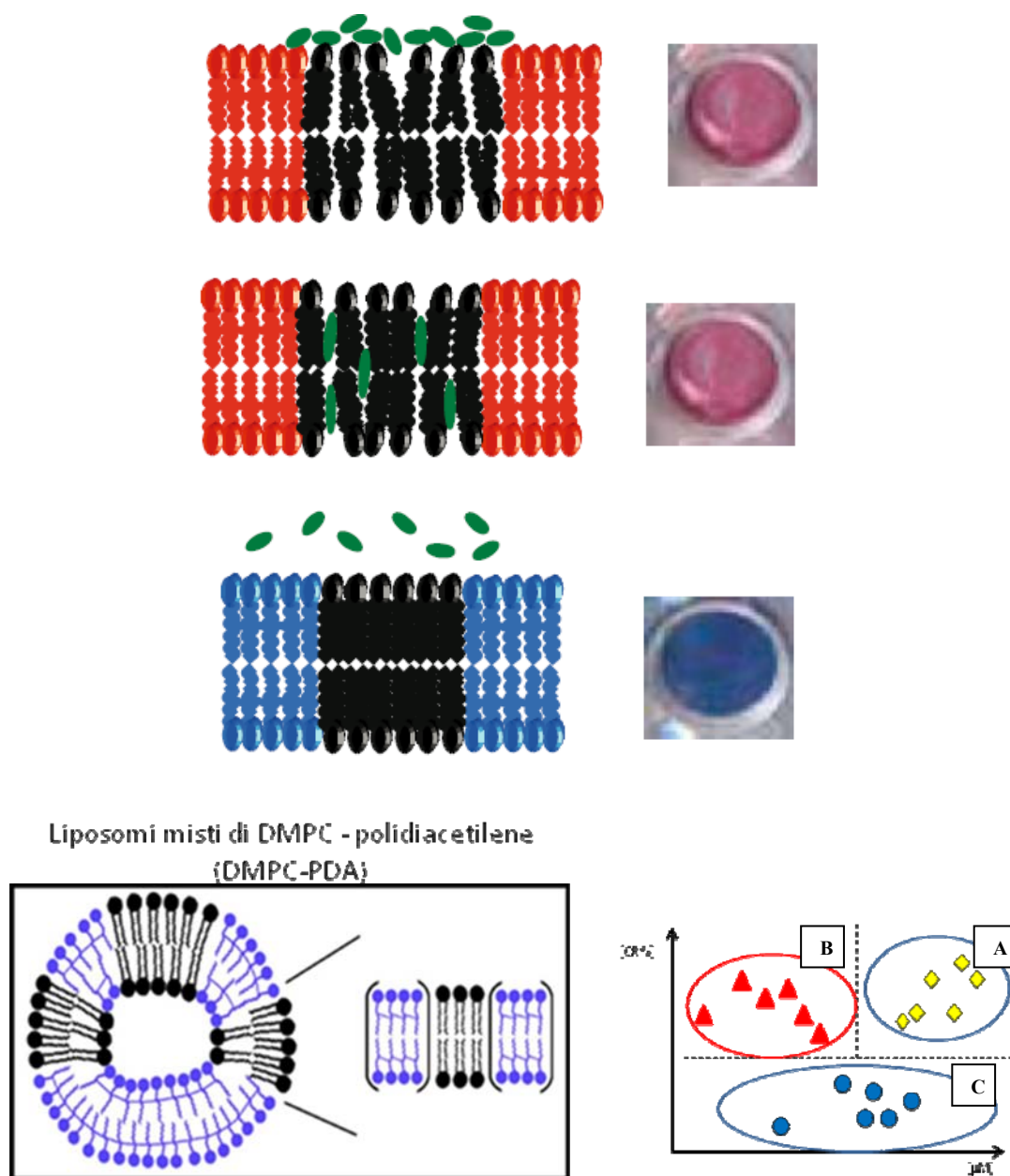


Figura 3.4.3: Rappresentazione schematica dei tipi di interazione di molecole con membrane composte da lipidi/PDA e relativi cambiamenti colorimetrici del PDA .

L'interazione dei liquidi ionici e liposomi contenenti PDA è stata valutata utilizzando tre sistemi lipidici di base:

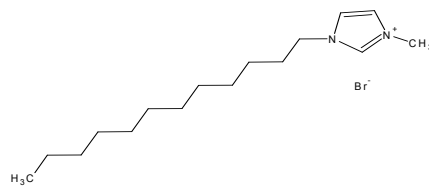
- Liposomi misti di dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e polidiacetilene (PDA)
- Liposomi di solo PDA

- Liposomi misti di colesterolo-sfingomieline-PDA

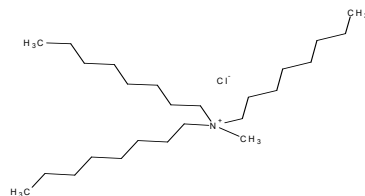
Sono stati scelti dei modelli di membrana a composizione differente per diversi scopi. Il sistema di membrana DMPC/PDA è stato scelto per valutare la risposta del PDA in presenza di un lipide di tipo zwitterionico. Il sistema contenente colesterolo, sfingomieline e PDA è stato scelto per mimare il comportamento dei lipid rafts, o “zattere lipidiche”, sistemi di membrana ad alto contenuto di colesterolo, principalmente abbondanti nel foglietto esterno delle membrane lipidiche allo scopo di mantenere la funzionalità delle proteine, aumentandone la stabilità della struttura terziaria¹²⁶. Il sistema lipidico composto da solo PDA è stato utilizzato per testare e caratterizzare al meglio le proprietà colorimetriche del sistema di membrana, al fine di valutarne le proprietà con i liquidi ionici. I liquidi ionici testati sono rappresentati in Figura 3.4.4. Sono stati considerati dei liquidi ionici che presentano strutture molto differenti le une dalle altre.

¹²⁶ Brown, D. A., London, E., *Ann. Rev. Cell and Developmental Biology*, 1998, 14, 111-136.

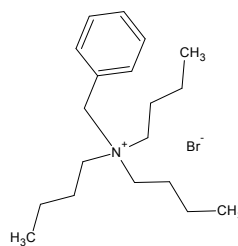
1,dodecil-3,metil-imidazolinio
bromuro **1g**



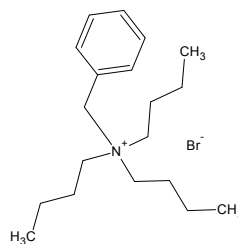
Aliquat 366 Cl **6a**



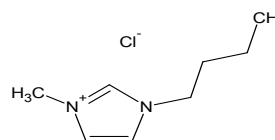
BTAC 6b



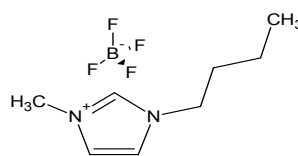
BTAB 6c



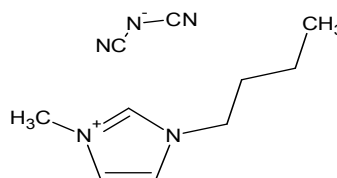
[BMIM][Cl] **1c**



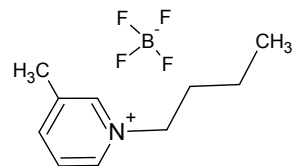
[BMIM][BF₄] **1a**



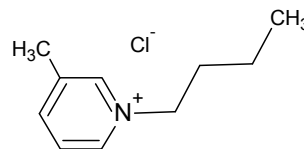
[BMIM][NCN₂] **1b**



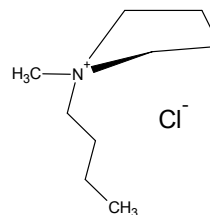
[BMpy][BF₄] **4e**



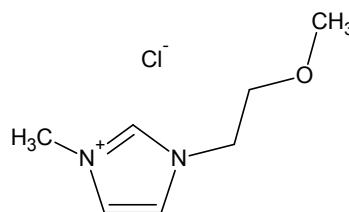
[BMpy][Cl] **1e**



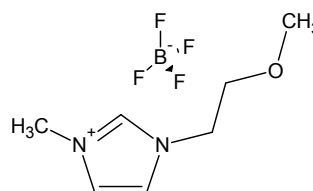
[MBprl][Cl] **1f**



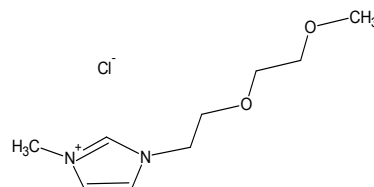
[MOEMIM][Cl] **2c**



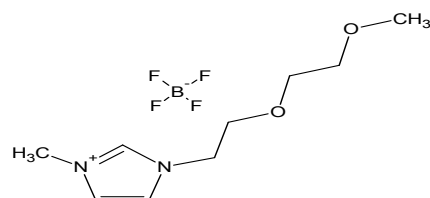
[MOEMIM][BF₄] **2a**



[MOE₂MIM][Cl] **3c**



[MOE₂MIM][BF₄] **3a**



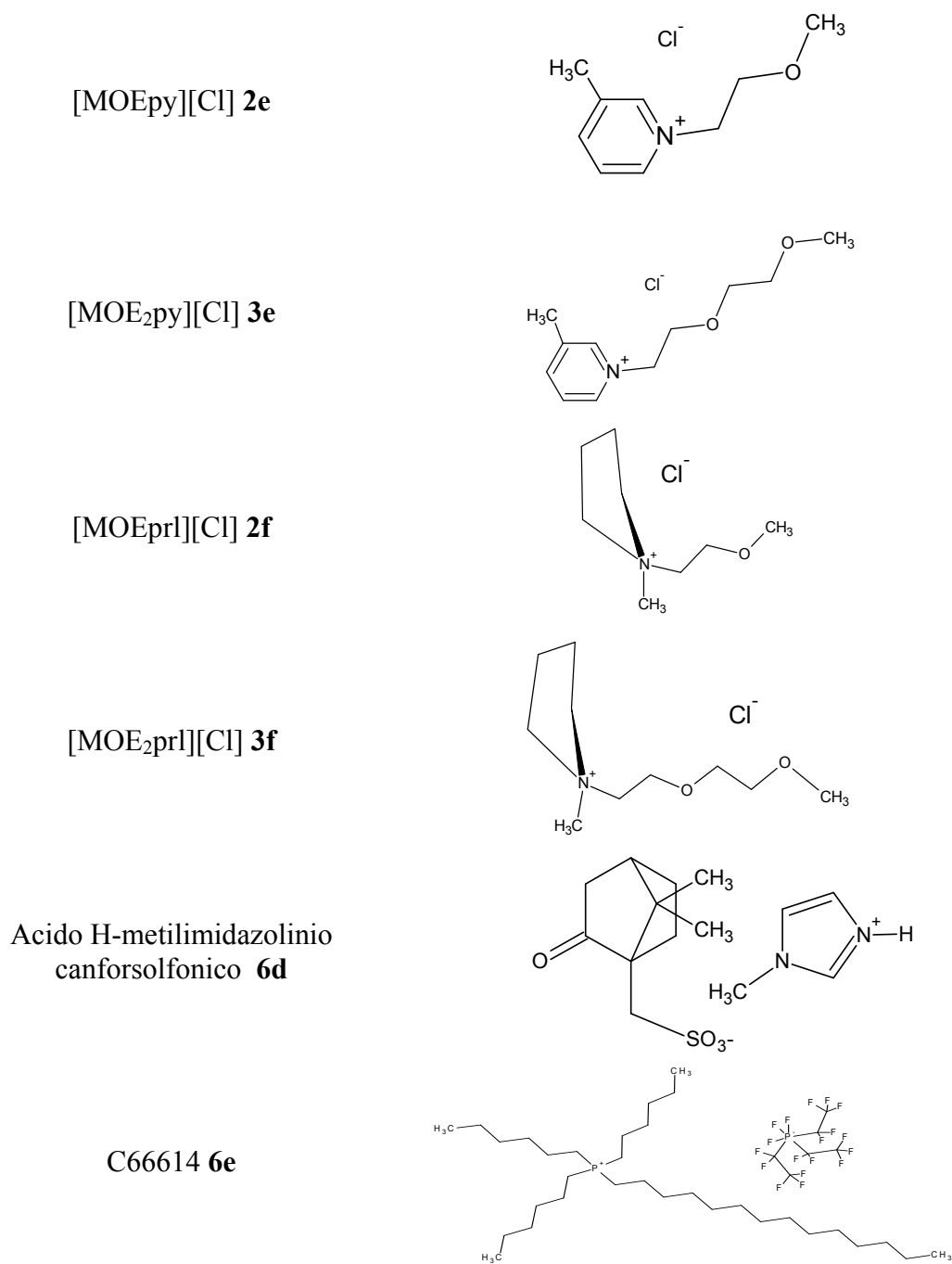


Figura 3.4.4: Liquidi ionici utilizzati in questo studio.

Come si può osservare in figura sono state testate sostanze fortemente lipofile, come l'aliquat 336 **6a** ed il C66614 **6e**, liquidi ionici a corta catena alchilica (come **BTAC 6b** e **1c**), liquidi ionici ossigenati e diossigenati sul catione ed un liquido ionico idrofilico parzialmente ottenuto da fonti rinnovabili (acido canforsolfonico).

Questi liquidi ionici con diversa struttura sono stati categorizzati in gruppi (Figura 3.4.4) differenti, a seconda del cambiamento colorimetrico che producono in cinetiche di esposizione di un'ora per liposomi misti di DMPC:PDA (3:2).

In Figura 3.4.4 sono riportati i valori di EC50 relativi alle concentrazioni dei liquidi che hanno generato un 50% di variazione nella colorazione del PDA nel sistema lipidico considerato. Si possono osservare 3 categorie: Quella dei liquidi ionici che danno un forte cambiamento colorimetrico (circa 35-50% rispetto al controllo) a basse concentrazioni (0.1-0.5 mM). Questi sono i liquidi ionici maggiormente lipofili, quelli, come **1g**, dotati di lunghe catene alchiliche e fortemente attivi nei confronti degli aggregati lipidici, ad azione simile a quella dei detergenti. In questo gruppo vi sono anche sostanze dotate di corte catene alchiliche ed atomi di azoto quaternari quali il benzil tributilammonio cloruro (**6b**) e bromuro (**6c**).

Vi è poi un secondo gruppo, a cui appartengono i liquidi ionici a corta catena alchilica, quali **1c**, attivi a maggiori concentrazioni, da 5 a 100 mM. Questi sono i liquidi ionici che agiscono sulla zona di interfaccia dei doppi strati lipidici con l'ambiente acquoso esterno, dove si trovano teste lipidiche cariche, ma che non sono dotate di proprietà lipofili sufficienti a disgregare gli aggregati lipidici. I liquidi ionici con un atomo di ossigeno, quali **2c**, sono presenti nel secondo gruppo ma agiscono sulle membrane a concentrazioni superiori, maggiori di 100-200 mM. Il terzo gruppo di liquidi ionici è

composto da quelli maggiormente idrofilici, ad esempio con catene laterali del catione che presentano due funzionalità ossidriliche (vedi **3c**).

I liquidi ionici di questa categoria producono cambiamenti colorimetrici dell'ordine del 10-15% e non interagiscono o perturbano molto debolmente l'ambiente di membrana.

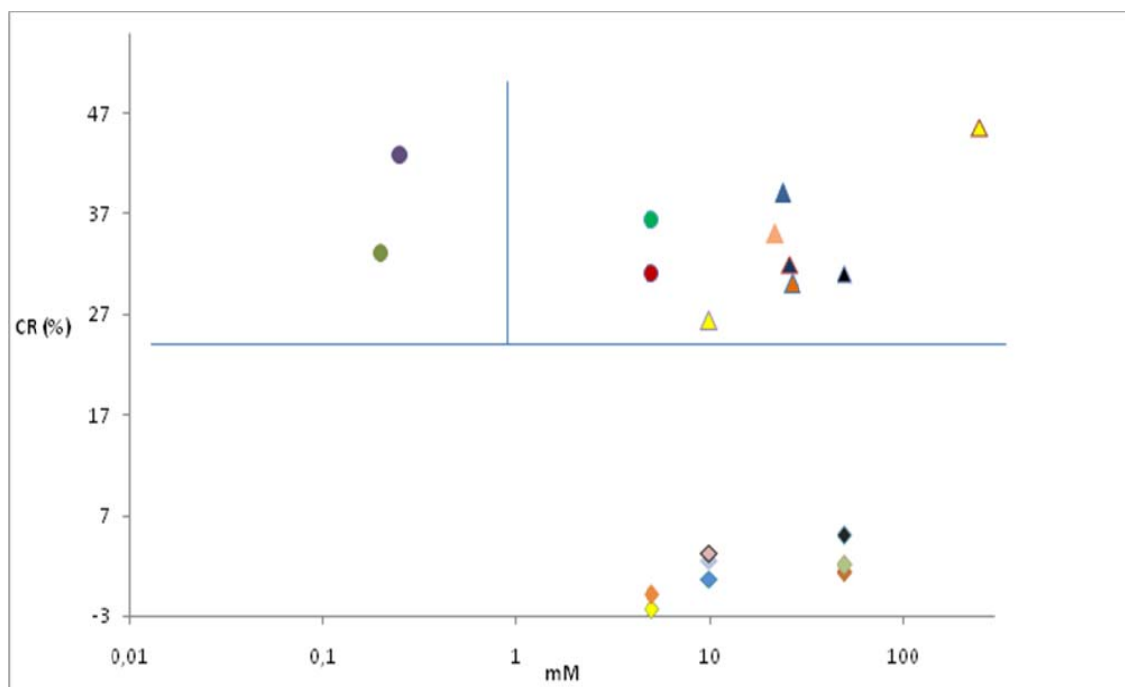


Figura 3.4.5: Valori di EC50 ottenuti per liquidi ionici nel sistema di liposomi DMPC/PDA.

Confrontando il grafico di Figura 3.4.5 con Figura 3.4.6, che riporta gli EC50 ottenuti per le stesse sostanze ma su sistemi di membrana differenti, composti solamente della sonda colorimetrica, il PDA, si può notare come la risposta cambi seguendo la presenza-assenza del lipide. Questo comportamento conferma che l'interazione del liquido ionico con i lipidi è fondamentale per dare cambiamenti colorimetrici e quindi per perturbare l'ambiente di membrana. In assenza di DMPC infatti tutti i liquidi ionici presenti nel

secondo gruppo sono shiftati nel terzo gruppo (vedi Figura 3.4.6); in altre parole la loro presenza in soluzione non dà luogo a cambiamenti colorimetrici e quindi ad interazioni di membrana.

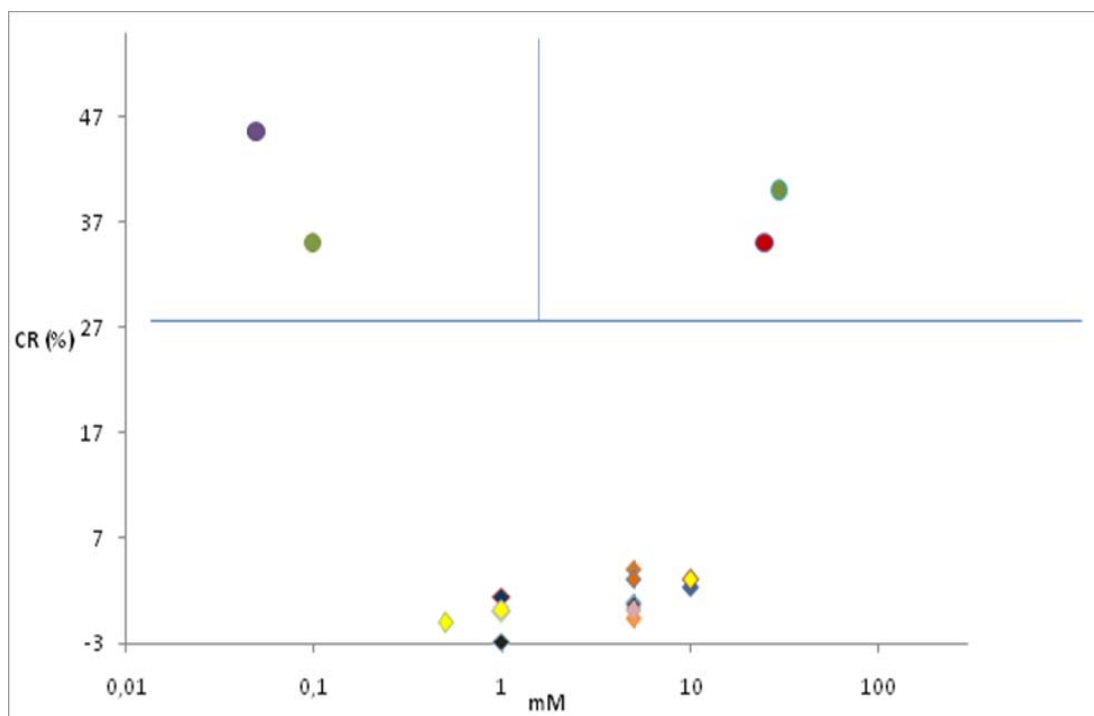


Figura 3.4.6: Valori di EC50 ottenuti per liquidi ionici nel sistema di liposomi composti solamente da domini di PDA.

La specificità di interazione con le caratteristiche del lipide presente nella membrana (carica della testa cationica, natura della testa cationica – zuccherina o lipidica) è un elemento fondamentale nel determinare le proprietà di interazione di queste molecole con le membrane lipidiche.

Per caratterizzare meglio questo sistema di interazione sono stati utilizzati dei liposomi composti da domini di PDA, colesterolo (Chl) e sfingomieline (Sph), molecola

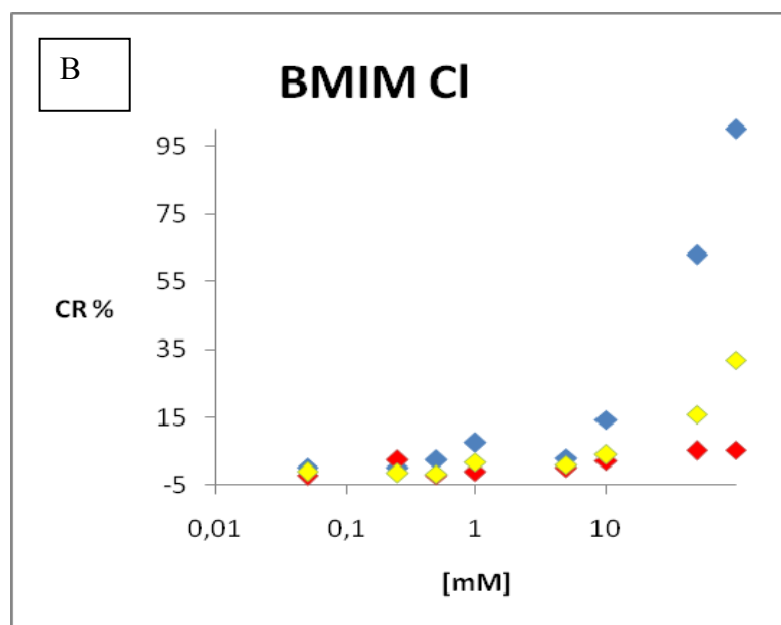
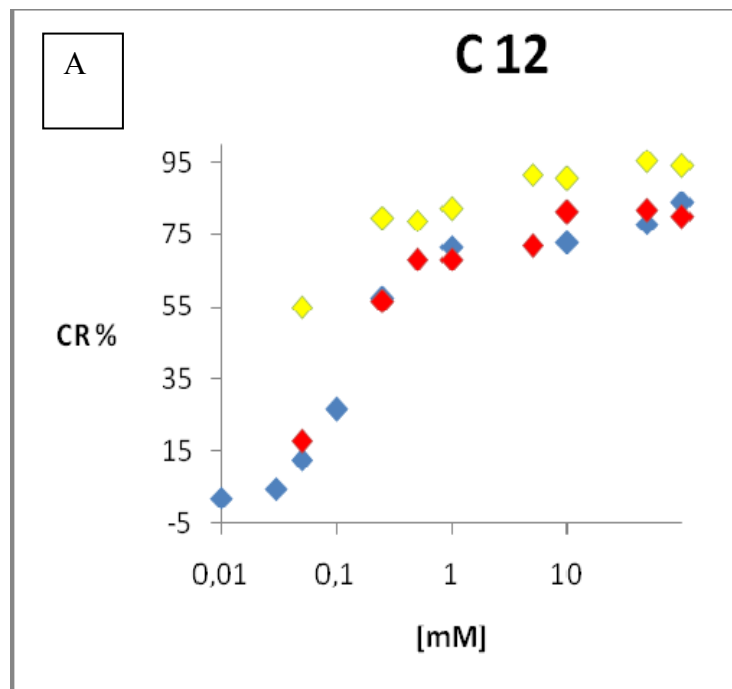
fondamentale nella composizione naturale di quelle parti di membrana denominate lipid-rafts.

In Figura 3.4.7 sono mostrati i tipi di interazione che intercorrono tra 3 liquidi ionici, ognuno dei quali è stato scelto da uno dei 3 gruppi precedentemente descritti; sono stati scelti l'1-dodecil-3-metilimidazolinio bromuro come appartenente al gruppo 1, sostanze dotate di proprietà simili a quelle dei surfattanti. Per le sostanze del secondo gruppo è stato scelto **1c**, liquido ionico a corta catena alchilica e per il terzo gruppo è stato scelto il **3c**, liquido ionico dotato di una catena laterale alchilica dotata di due funzionalità etossiliche.

In Figura 3.4.6 sono riportati degli andamenti relativi ai cambi colorimetrici di queste sostanze su sistemi di liposomi composti da : DMPC/PDA, solamente PDA e PDA con Chl/Sph. Si può osservare in figura che le differenze strutturali delle 3 molecole portano a 3 ben distinte tipologie di effetti. I liquidi ionici del primo gruppo, dotati di lunghe catene alchiliche che si inseriscono nell'ambiente di membrana e dotati di teste cariche positivamente danno luogo a forti cambiamenti colorimetrici a basse concentrazioni e su tutti e 3 i tipi di sistemi di membrana. La presenza, nei liposomi dotati di Chl/Sph di domini rigidi, con proprietà di fluidità e di carica superficiale ben diverse da quelle dei normali lipidi porta comunque ad un'alta interazione delle sostanze.

I liquidi ionici del secondo gruppo, come **1c**, dotati di corte catene alchiliche e di teste cariche positivamente, non sono attivi su liposomi di PDA, che presentano esclusivamente delle cariche negative sulla superficie; mentre esibiscono una minore attività sui sistemi lipidici contenti Chl/Sph che non su quelli contenenti DMPC/PDA. Questo indica che per sostanze non sufficientemente attive come i detergenti, la carica superficiale dei liposomi è un elemento importante per indicare l'adesione e l'attività

delle stesse. Infine le sostanze del terzo gruppo, come il **3c**, che non esibiscono attività nei confronti di liposomi di DMPC/PDA non sono attive su sistemi di



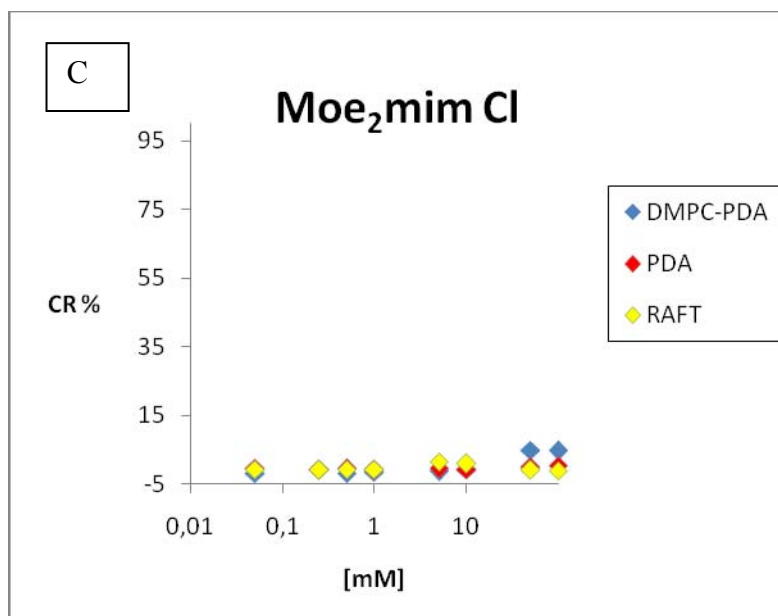


Figura 3.4.7: Confronto dell'attività di tre liquidi ionici **1g** (A), **1c** (B), **3c** (C) su tre modelli di membrana differenti.

È interessante notare che il liquido ionico maggiormente attivo, l'**1g**, ha dato luogo a dei cambiamenti colorimetrici del PDA di diversa intensità di emissione, indicando una diversa interazione della sostanza con i residui di polidiacetilene. In soluzione buffer a pH 8 (Figura 3.4.8) il classico cambiamento dal blu al colore rosso (i colori a cui si fa riferimento sono quelli “visibili” e non all'emissione nello spettro) non è stato osservato. La transizione colorimetrica è avvenuta dal blu al verde, per le concentrazioni inferiori, e successivamente al giallo.

Questo fenomeno fa pensare ad interazioni molecolari maggiormente profonde a livello della membrana e delle cariche superficiali, esposte dalle teste lipidiche all'esterno della membrana. L'argomento è stato approfondito con le prove sperimentali del capitolo successivo (Capitolo 3.5), con la prospettiva di estendere il sistema colorimetrico al rilevamento di surfattanti in soluzione.

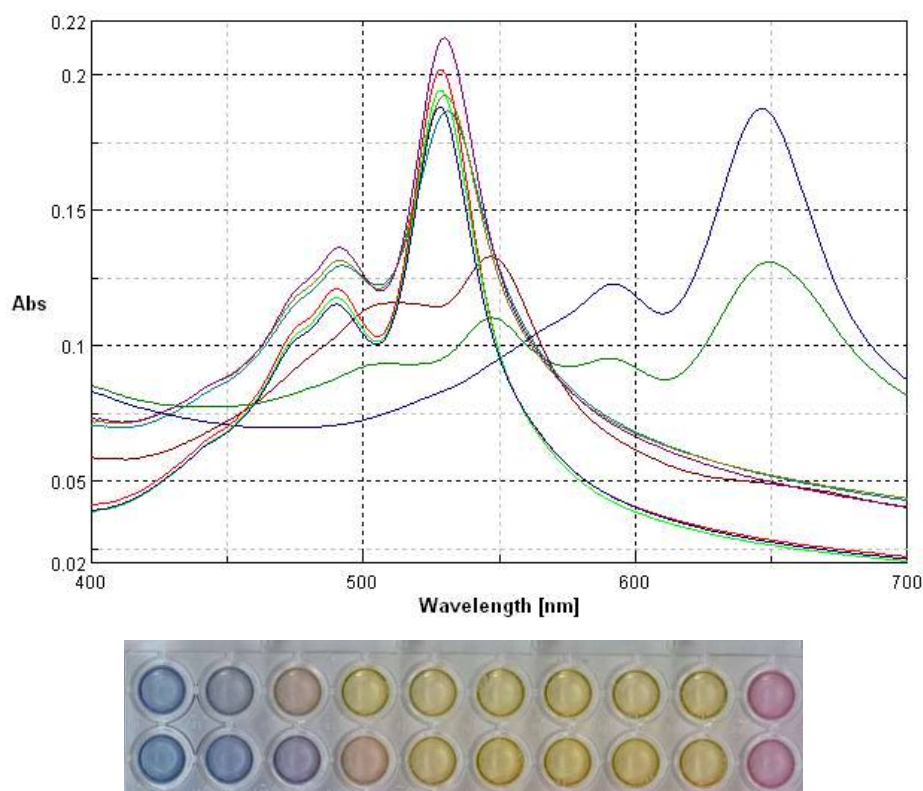


Figura 3.4.8: Spettri di emissione di domini di PDA eccitati a 355 nm dopo inoculazione del liquido ionico 1-dodecil-3-metilimidazolinio bromuro.

Effetti dei liquidi ionici valutati tramite microscopia al confocale e cryo-TEM

I tre liquidi ionici analizzati con il sistema di PDA sono stati utilizzati per raccogliere informazioni relative alle variazioni morfologiche e di dimensioni tramite microscopia al confocale ed a trasmissione elettronica. Dalle immagini presenti in Figura 3.4.9 si può notare che i liquidi ionici hanno effetti differenti a seconda delle caratteristiche strutturali, sulle dimensioni medie, sulla forma e l'integrità delle membrane.

Sostanze come **1g** (Figura 3.4.9, b) hanno un forte effetto sulle dimensioni medie dei liposomi, determinano un forte effetto di leakage, risultano attive come sei sfrattanti.

Effetto analogo, ma meno marcato, hanno sostanze alchiliche ma con catene più corte come **6b** (Figura 3.4.9, c) creando anch'esse un forte effetto di leakage (visibile in figura dalla presenza di pori sulla superficie del liposoma), a concentrazioni superiori.

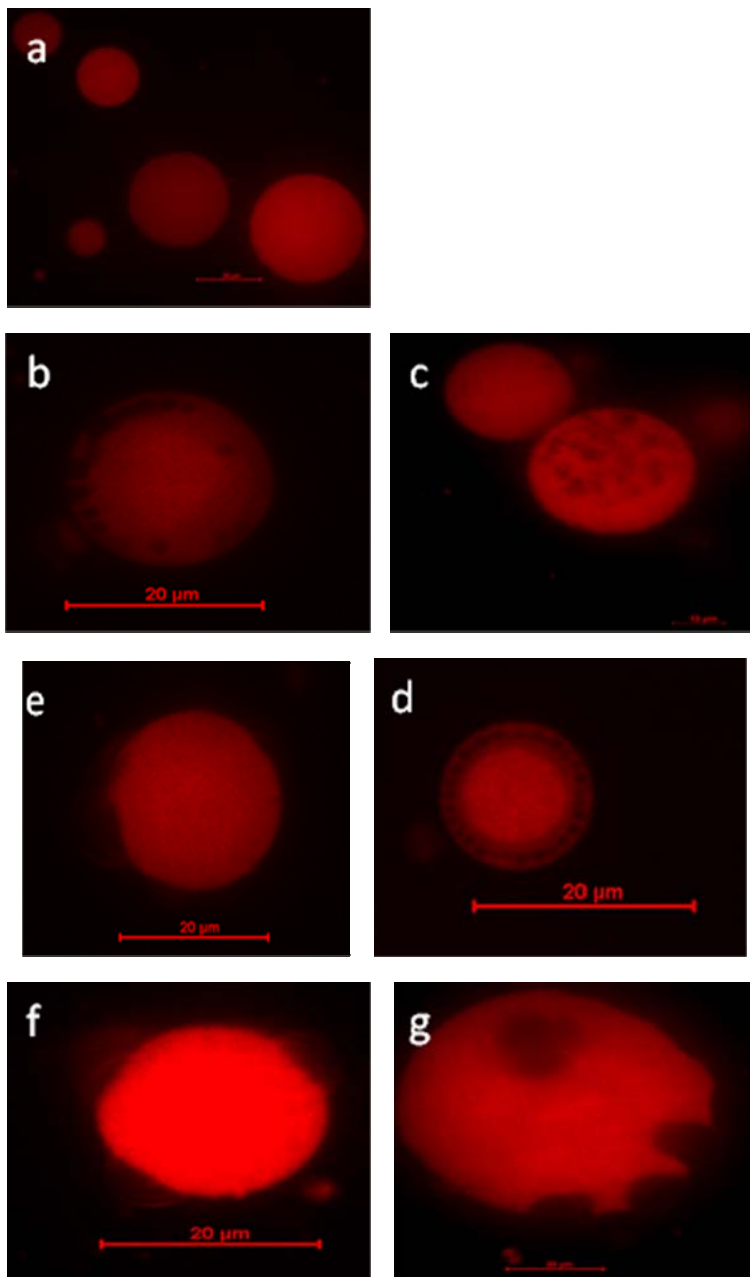


Figura 3.4.9: Immagini di microscopia al confocale di GUV inoculate con liquidi ionici. a) Controllo b) **1g** 0.2 mM c) **6b** 50 mM d) **1c** 100 mM e) **3f** cl 500 mM f) **2c** 500 mM g) **3c** 500 mM.

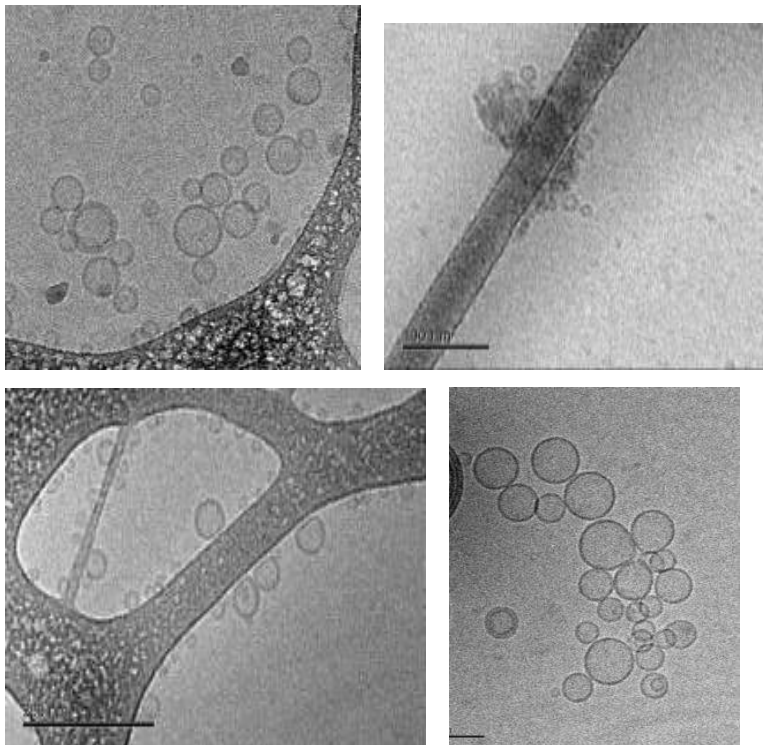


Figura 3.4.10: Immagini al Cryo-TEM degli effetti dei 3 liquidi ionici su liposomi di DMPC. A) Controllo b) **1g** 0.2 mM c) **1c** 50 mM d) **3c** 100 mM.

Il liquido ionico **1c** (Figura 3.4.9, d) ha l'effetto di creare leakage a concentrazioni superiori (cfr. capitolo leakage), di grado inferiore rispetto a composti cationici quali il **6b**. **1c** sembra mostrare un forte effetto di modificazione delle forme dei liposomi, creando fusione e modificazione delle morfologie (vedi Figura 3.4.9) dei liposomi stessi. Al contrario il **2c** non mostra effetti sulla modificazione di forma e dimensioni dei liposomi, anche a concentrazioni elevate quali 500 mM e le immagini non presentano fenomeni considerevoli di presenza di buchi nei doppi strati.

In Figura 3.4.10 sono riportate delle immagini raccolte al Cryo-TEM relative all'interazione dei liquidi ionici sopracitati con liposomi di DMPC. Nelle immagini

sono visibili gli effetti dei liquidi ionici sulle dimensioni e sulla morfologia delle vescicole.

Dal confronto delle immagini si può notare come, in analogia con i dati ottenuti dalla microscopia al confocale, il **1g** determina a basse concentrazioni la quasi totale scomparsa dei liposomi, il **1c**, liquido ionico appartenente al secondo gruppo, diminuisce le dimensioni delle vescicole, ne abbassa considerevolmente il numero e determina delle deformazioni delle vescicole stesse. **3c** al contrario non sembra avere effetti considerevoli sulla morfologia dei liposomi e sulla loro distribuzione.



Figura 3.4.11: Immagine relativa a liposomi di PC/PG esposti a **1c** 50 mM.

Leakage di membrana

I dati di microscopia al confocale sono integrabili con i valori di leakage di membrana osservabili in Figura 3.4.12. IL leakage di membrana è una misura basata sul rilascio nell'ambiente extracellulare di una sonda fluorescente contenuta all'interno dei liposomi quando questi sono integri.

Se i liposomi sono integri e la sostanza da testare non crea dei pori e non altera la continuità della membrana lipidica allora il segnale di fluorescenza è nullo. In base al numero dei pori creati ed al grado di alterazione della membrana, la fuoriuscita della sonda fluorescente aumenta, e può esser creata una scala relativa di effetto della sostanza da analizzare rispetto ad una sostanza di riferimento, di cui si conosce l'attività detergente. I dati di leakage vengono riportati quindi in scala percentuale rispetto ad una sostanza di riferimento nota.

Le sostanze maggiormente attive risultano essere il **1g** che a concentrazione di 2 mM determina la rottura completa dei liposomi originari ed un leakage corrispondente al 100%. L'azione di **6b** è più lieve, anche se avviene a concentrazioni confrontabili con quelle di **1g**. La differenza di azione tra **1g** e **1c** è visibile anche tramite il test di leakage, in quanto **1c** determina ad alte concentrazioni, 500 mM, un lieve leakage di circa il 5% del liposoma, dato consistente con la presenza nelle immagini registrate in microscopia al confocale dove si possono osservare la presenza di pori nei liposomi.

Per quel che riguarda l'effetto dei liquidi ionici con lunghe catene alchiliche e che hanno due funzionalità etossi, come **3f**, l'azione sul leakage risulta leggermente superiore a quella di **1c**, a concentrazioni di 500 mM, superiori rispetto a **1c**.

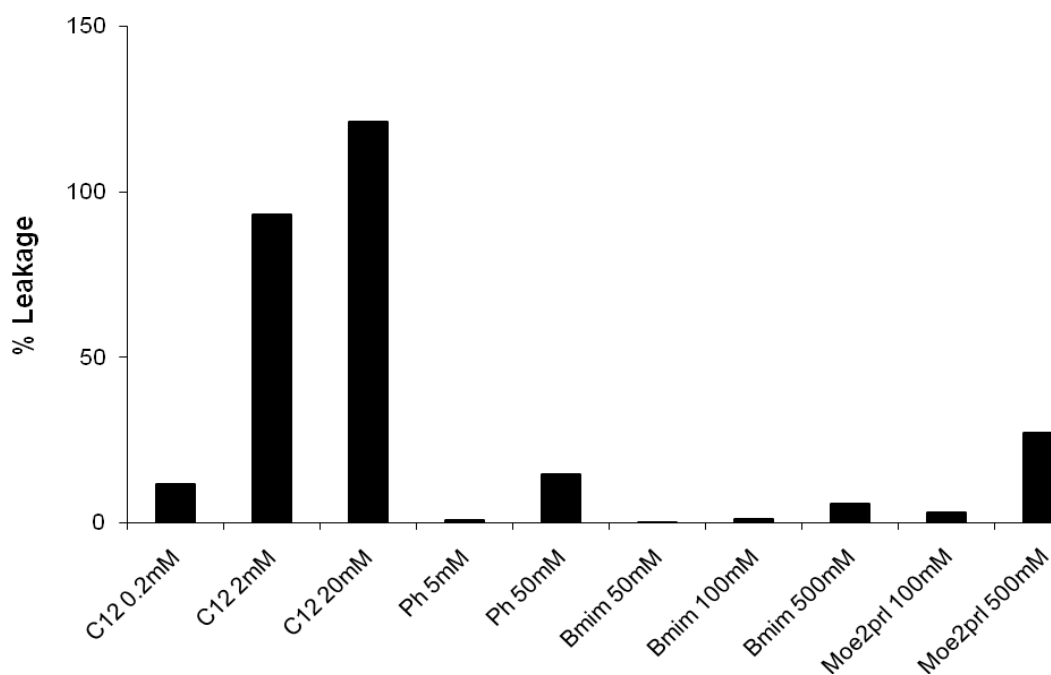


Figura 3.4.12: Valori di leakage di membrana da liposomi di DMPC esposti alle concentrazioni di liquidi ionici indicati in legenda.

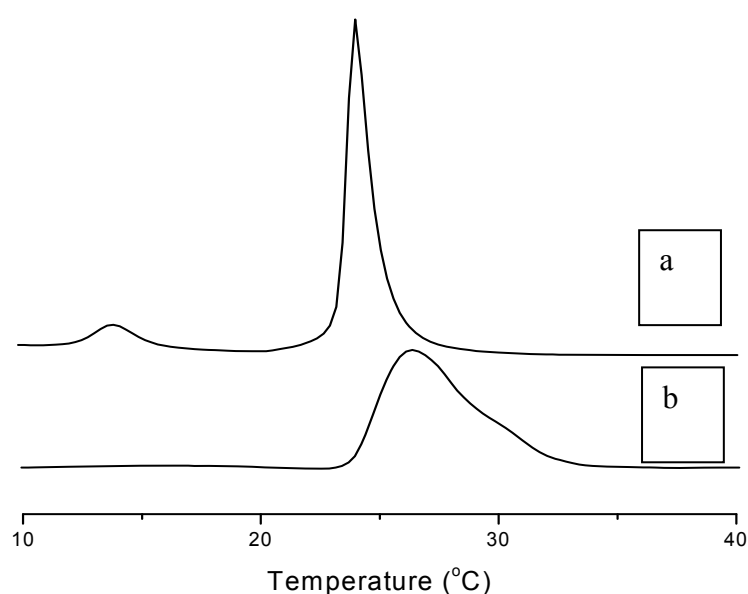
Effetto su liposomi tramite Dinamic Scanning Calorimetry – DSC

L'effetto dei liquidi ionici sui liposomi lipidici è stato indagato anche tramite Dinamic Scanning Calorimetry (DSC). La DCS è una tecnica che viene qui utilizzata per indagare gli effetti dei ILs sulle temperature di transizione dei lipidi analizzati.

Dipendentemente dall'adsorbimento o all'inserzione del liquido ionico nelle matrici lipidiche, le loro temperature di transizione subiscono una variazione. In Figura 3.4.12 sono riportati come esempio dei termogrammi relativi a liposomi di DMPC:DMPG (98:2). Si può osservare come il liquido ionico **2c**, che nei saggi biochimici descritti precedentemente risulta essere la sostanza che altera di meno le membrane lipidiche,

comporta comunque un forte effetto sulle temperature di pre-transizione e transizione dei lipidi considerati.

E' interessante notare come, se si confronta l'effetto dei liquidi ionici maggiormente attivi, quali il **6b** e **1c** abbiamo un effetto sulla diminuzione della temperatura principale di transizione dei liposomi abbassandone la temperatura, mentre i liquidi ionici ossigenati hanno un effetto di innalzamento della temperatura stessa; questo comportamento fa pensare ad un diverso effetto di interazione con i liposomi di membrana.



	$\Delta H_i/\Delta H_0$	ΔT_m	$\Delta T_{1/2}$
BTAC 50mM	0,90	-1,01	0,00
1c 500mM	1,07	-0,47	0,14
2c 500 mM	1,06	2,41	2,97
3c 500 mM	1,19	2,87	0,14
3f 500 mM	1,00	1,35	1,48

Figura 3.4.12: Termogramma DCS di confronto relativi a liposomi di DMPC/DMPG (98:2) (a) ed ai liposomi in presenza di **2c** 100 mM (b). Valori di variazioni di temperatura relativi agli stessi liposomi esposti ai liquidi ionici.

Effetto dei liquidi ionici tramite FRET

I liquidi ionici appartenenti ai 3 gruppi identificati precedentemente sono stati analizzati con saggi che includono la FRET, utilizzando sonde fluorescenti NBD-PE e Rh-PE.

I saggi di FRET si basano sulla capacità di due sonde fluorescenti di trasferirsi un segnale di fluorescenza quando sono accoppiate in un ambiente di membrana, lipofilo, non perturbato.

In queste condizioni, date due molecole fluorescenti F1 ed F2, se si eccita ad una specifica lunghezza d'onda la sonda F1, questa trasferirà l'energia assorbita, alla sonda F2 che emetterà, ad una lunghezza d'onda tipica, un segnale di fluorescenza di emissione. In questo senso, se nei liposomi caricati delle sonde F1 e F2 vengono inoculate delle sostanze che sono attive sulle membrane, l'inefficienza del trasferimento energetico sarà tanto minore quanto maggiore è l'attività di perturbazione di membrana.

In Figura 3.4.13 sono indicati gli effetti dei liquidi ionici su liposomi, misurati tramite sonde. Si può osservare che le diverse sostanze generano effetti diversi a seconda della struttura, **1g** mostra sempre effetti di innalzamento della FRET, in quanto sopra la sua concentrazione micellare critica (CMC), rilevabile intorno a valori di 1-2 mM in acqua distillata, è sempre in grado di inglobare le molecole fluorescenti.

Diverso risulta l'effetto delle sostanze che hanno una catena alchilica più corta nella struttura (quali **6b**, **1c**), in quanto non si dimostrano in grado di circoscrivere le molecole fluorescenti in un ambiente idrofobico.

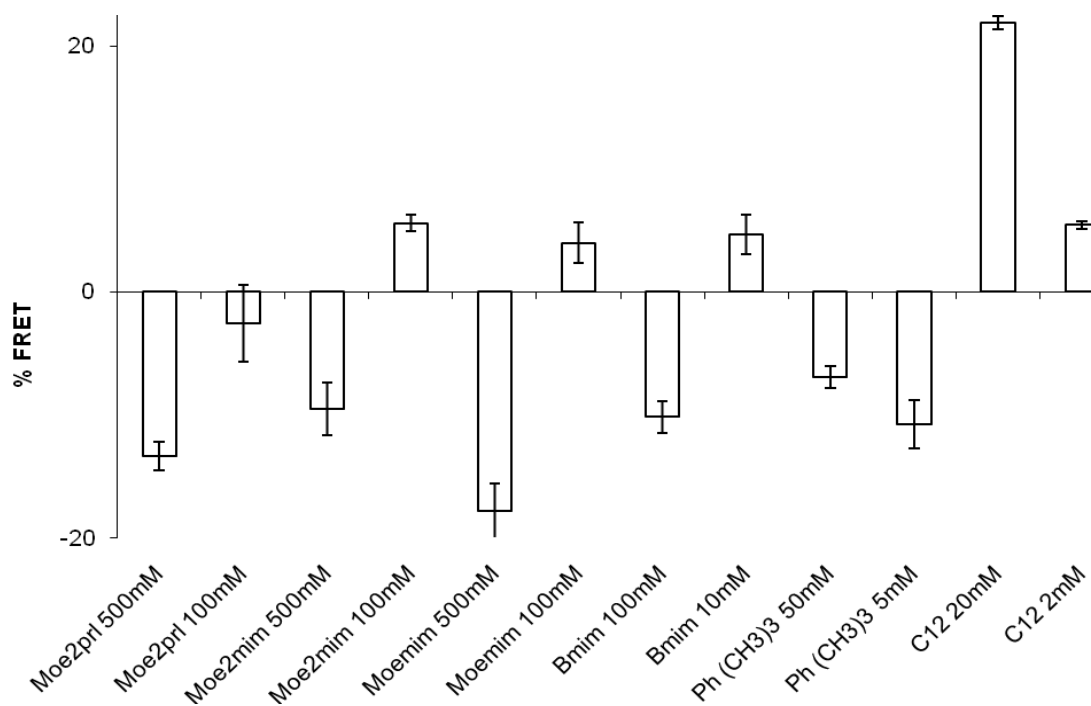


Figura 3.4.13: Valori percentuale di FRET su vescicole di DMPC:DMPG per i liquidi ionici indicati in figura.

Per queste molecole (**6b**, **1c**, **2c**) l'effetto sulla FRET è proporzionale alla concentrazione di esposizione.

Vitalità cellulare

Gli ILs indicati precedentemente sono stati valutati anche tramite un saggio di vitalità cellulare classico, che valuta la sopravvivenza cellulare tramite la stabilità di membrana

su ematociti. Come si può vedere in Figura 3.4.14 l'attività delle sostanze testate viene espressa in percentuale rispetto al comportamento di una sostanza dall'azione nota, sicuramente dannosa, a cui viene assegnato il 100% relativo di distruzione della membrana.

In analogia con gli altri test, anche in questo esperimento la sostanza maggiormente attiva si è dimostrata **1g**, che porta alla lisi del 100% delle cellule a concentrazioni sub-millimolari. Quest'attività si può chiaramente confrontare con quella di noti surfattanti, che alterano la membrana lipidica irreversibilmente a concentrazioni subito inferiori alla loro concentrazione micellare critica. Il **1g** viene seguito da **6b**, molecola che pur essendo dotata di 4 corte catene alchiliche si dimostra esser quella maggiormente attiva rispetto ai restanti 4 liquidi ionici. **6b** è attivo ad un ordine di grandezza superiore rispetto al **1g** (intorno al millimolare) ed un ordine di grandezza inferiore rispetto ad **1c**, che genera una lisi di proporzioni inferiori – intorno al 10% - per concentrazioni dell'ordine di 50 mM. E' da notare che il grado di lisi cellulare ottenuto in questo test per **1c** è confrontabile con i valori ottenuti per il test di leakage.

I liquidi ionici con due funzionalità etossi nel catione, **3c** e **3f**, hanno un'attività nettamente diversa. Il liquido ionico **3f**, come indicato dai test colorimetrici, dai dati di microscopia ottica e dai test di leakage, ha un'attività nettamente superiore sui sistemi lipidici di membrana che non **3c**, che si dimostra molto meno attivo.

Vitalità cellulare

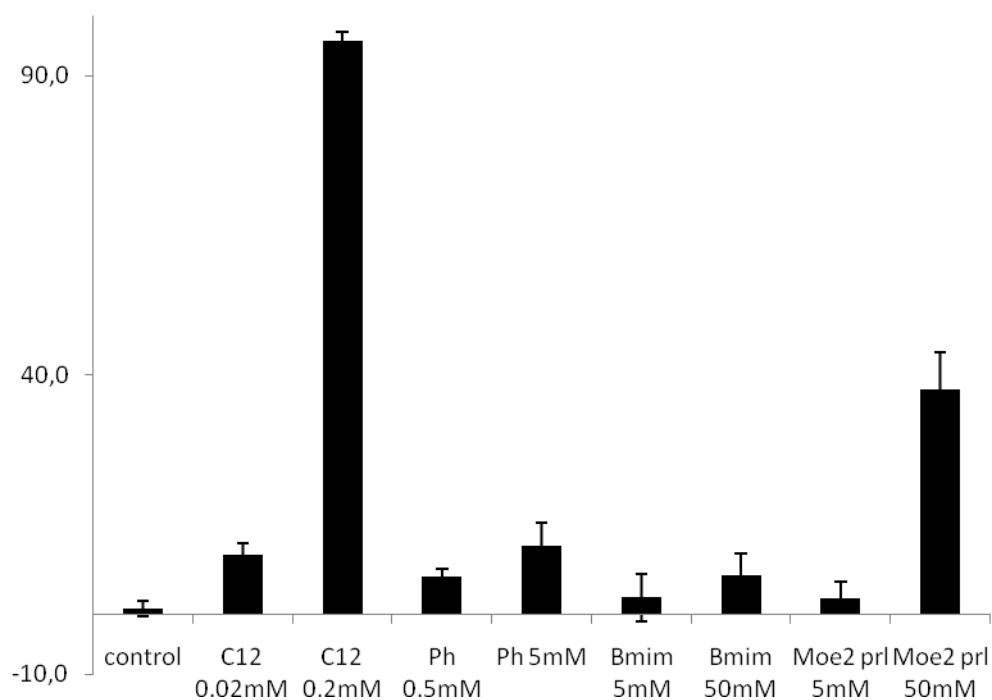


Figura 3.4.14: Valori di vitalità cellulare espressi come percentuale in termini di rilascio del materiale cellulare da ematociti.

I risultati mostrati sono particolarmente significativi da un punto di vista strutturale, in quanto mostrano che la struttura della testa cationica e l'orientazione della catena laterale del catione sono fattori determinanti nel definire le interazioni di membrana e la tossicità dei composti. Mentre un aumento della lunghezza delle catene alchiliche delle teste cationiche sono direttamente collegabili ad un aumento dell'attività di membrana dei liquidi ionici, la variazione del numero di atomi di ossigeno e la lunghezza totale della catena sono elementi strutturali che devono essere considerati insieme nella progettazione degli ILs.

Materiali e metodi

Tutti i reagenti, DMPC, colesterolo, sfingomieline, NBD-PE, Rh-PE, i solventi sono stati forniti da Aldrich; 1-metil-imidazol, 3-metil-piridina, 1-metilpirrolidina, 1-clorobutano e il 2-cloroetil metiletere sono stati ridi stillati prima dell'uso per evitare la formazione di impurezze colorate nei liquidi ionici.

Tutti i liquidi ionici utilizzati negli esperimenti sono stati seccati per una notte a 80° C sotto vuoto, prima di svolgere gli esperimenti e precedentemente all'aggiunta dei liposomi. Le specifiche concentrazioni di liquidi ionici sono state ottenute attraverso successive diluizioni in soluzioni buffer. Il Py è stato fornito da Fluka, Milano, Italia. Per la preparazione dei campioni è stata usata acqua Milli-Q. Le soluzioni stock di pirene, sono state preparate a 3 mM in etanolo e conservate a 4 °C al buio.

Preparazione delle soluzioni stock. Vengono preparate delle soluzioni di DMPC e TR in cloroformio ed etanolo (1:1 v/v) alle concentrazioni di 40 mM e 60 mM e conservate in frigo a 4° C. Dalle soluzioni stock vengono prelevati 20 µL di DMPC 40 mM e 20 µL di TR 60mM e centrifugati sotto vuoto per 4 ore, durante la prima ora a 100 mbar, per le successive 3 ore a 60 mbar. Le soluzioni sono sottoposte a cicli di sonicazione per 6 minuti. Le sospensioni lipidiche vengono polimerizzate sotto luce ultravioletta a 254 nm.

Preparazione delle soluzioni stock dei liquidi ionici.

Le soluzioni stock dei liquidi ionici testati con i liposomi sono state preparate rispettivamente a 600, 60 e 6 mM. Le soluzioni sono state portate a volume con una soluzione a pH 8 di Na₂B₄O₇, KH₂PO₄ e conservate in frigo per 4 giorni a 4 °C.

Analisi di fluorescenza e tramite spettroscopia UV-vis.

I campioni contenenti liposomi di DMPC/PDA, PDA/Chl-Sph, PDA sottoposti a letture di fluorescenza e all'ultravioletto sono stati analizzati e confrontato con bianchi calcolati a pH 7.4. Il 100 % di cambiamento colorimetrico è corrisposto all'esposizione dei liposomi a temperature di 100 °C per 30 secondi.

Misure all'UV-Vis

I campioni sono stati preparati aggiungendo i composti da analizzare a 0.06 mL di soluzione contenente liposomi ad una concentrazione totale di lipidi di 0.5 mM. Le misure di spettroscopia UV-vis sono state condotte a 27 °C e replicate 3 volte con uno strumento Jena Analytical ELISA, su un plate da 96 pozzetti. Una misura quantitativa del grado di transizione blu-rosso nelle vescicole è dato dal valore di cambiamento colorimetrico (CR%), che è definito come:

$$\% \text{ CR} = [(PB_0 - PB_1) / PB_0] \times 100$$

dove

$$PB = A_{blue} / (A_{blue} + A_{red})$$

A è l'assorbanza della componente blu nello spettro UV-vis (640 nm) o della componente rossa (500 nm) (i colori sono riferiti a quelli visibili, non alle componenti dello spettro). PB_0 è il rapporto blu/rosso del controllo (prima dell'aggiunta del composto da testare), e PB_i è il valore ottenuto nella soluzione dopo l'aggiunta del composto.

Dynamic scanning calorimetry – DSC

La concentrazione dei liposomi usati nell'esperimento è stata di 2 mM. I campioni sono stati preparati aggiungendo ai liposomi i liquidi ionici alle rispettive concentrazioni di EC50. Gli esperimenti di DCS sono stati condotti con un VP-DSC (Micro-Cal, USA). Acqua distillata è stata usata come bianco. I cicli di riscaldamento sono stati condotti con un aumento di temperatura di 1.5 °C/min. L'analisi dei dati è stata condotta con Microcal Origin 6.0.

FRET (Fluorescence resonance energy transfer)

N-(7-Nitro-2,1,3-benzossadiazol-4)- fosfatidiletanolamina (N-NBD-PE, donatore di fluorescenza) and N-(rodamina B solfonil) fosfatidiletanolamina (N-Rh-PE, accettore

di fluorescenza) sono stati aggiunti ai liposomi di DMPE/DMPG in un rapporto molare 1:1:100 (NBD-PE : Rh-PE : fosfolipidi) e disidratati sotto vuoto prima della sonicazione. I campioni sono stati trattati aggiungendo 30 mL di LI a 10 mL di liposomi contenenti le sonde fluorescenti e 30 mL di Tris buffer a 50 mM. Le misure di fluorescenza sono state condotte diluendo il campione con acqua distillata fino ad un volume di 1 mL ed incubate a 26 °C per 30 minuti. Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati acquisiti (eccitazione a 469 nm) nell'intervallo 500-650 nm su uno spettrofluorimetro FL920. Per misurare la dispersione massima di fluorescenza (100% di riduzione della FRET) sono stati aggiunte ai liposomi 30 mL di Triton X-100. La percentuale di diminuzione di FRET è stata calcolata con l'equazione:

$$\% \text{ diminuzione FRET} = [(R_f - R_i) / (R_t - R_i)] \times 100$$

dove R_f è il rapporto tra le emissioni a 530 e 590 nm, rispettivamente, incubate con LI; R_i è il rapporto per soluzioni contenenti solo liposomi; R_t è il rapporto misurato in vescicole trattate con Triton X-100.

Microscopia di fluorescenza al confocale

I campioni per l'analisi in microscopia sono stati preparati come descritto sopra. Le immagini di fluorescenza al confocale sono state acquisite con un microscopio Axiovert-100M (Zeiss, Germany) con un obiettivo Plan-Neofluar 63×/1.2. La lunghezza d'onda di eccitazione è stata di 488 nm prodotta da raggio laser all'argon. La luce emessa è stata fatta passare attraverso un filtro LP 505 nm.

Microscopia elettronica a trasmissione in condizioni criogeniche (cryo-TEM)

I campioni per il cryo-TEM sono stati preparati allo stesso modo dei campioni per la FRET. Quattro microlitri del campione sono stati depositati su un filtro perforato polimerico supportato su griglia di mesh 300. Il processo è stato condotto con un sistema di vetrificazione con controllo della temperatura e dell'umidità, con sistema automatizzato Vitrobot (FEI). Le immagini sono state raccolte su un FEI Tecnai 12 G2 TWIN TEM equipaggiato con un Gatan 626.

4. Prodotti da Pirolisi

4.1 Prodotti da fonti rinnovabili

Il petrolio è la fonte principale di energia primaria (Figura 4.1.1). L'Italia è un forte consumatore ed importatore di petrolio (1.7 milioni di barili di greggio al giorno), ma ha anche una grande capacità di raffinazione (fra le più grandi in Europa con 2,3 milioni di barili dal giorno) che rende il nostro paese un esportatore netto di prodotti petroliferi ¹²⁷, fonti energetiche non rinnovabili. Se i derivati del petrolio sono utilizzati principalmente come combustibili per motori primi (soprattutto benzina e diesel per il trasporto), una frazione importante (4-10%) è destinata alla sintesi di una grande quantità di prodotti chimici, dalle materie plastiche ai composti farmaceutici (Figura 4.1.1). L'aumento del prezzo del greggio determina un aumento dei costi degli intermedi chimici da esso ottenuti con ricadute su tutti i comparti.

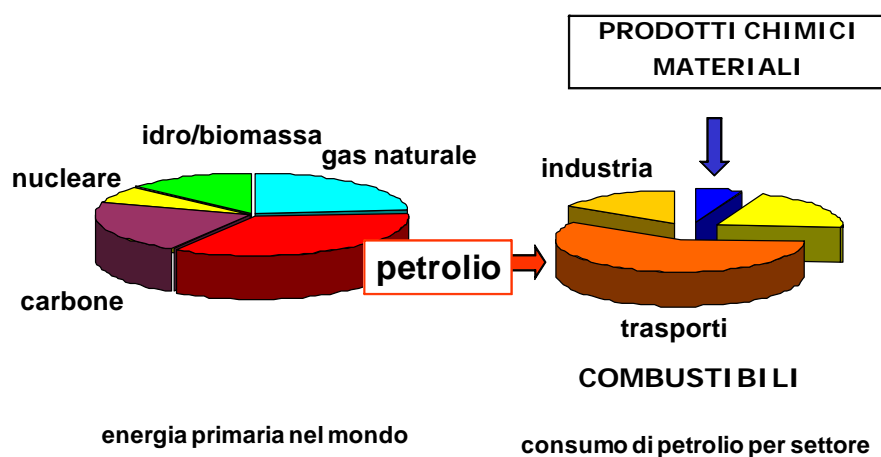


Figura 4.1.1: Energia primaria nel mondo e consumo di petrolio per settore industriale.

¹²⁷ Energy Information Administration (EIA, 2007). www.eia.doe.gov.

La volontà di ridurre l'inquinamento atmosferico, in particolare le emissioni di CO₂, e di gestire il progressivo esaurimento delle riserve di combustibili fossili tradizionali, ha rinnovato l'interesse della ricerca verso lo sfruttamento di fonti energetiche alternative, sia rinnovabili che fossili non-convenzionali (scisti e sabbie bituminose). La necessità di diminuire la dipendenza dalle fonti fossili è determinata anche da motivazioni geopolitiche ed economiche (instabilità politica delle tradizionali aree produttrici, accesso alle fonti, speculazioni finanziarie, aumento della domanda).

Per questi motivi, gli ultimi anni hanno visto un crescente sviluppo nella produzione di biocombustibili, in particolare quelli detti di *prima generazione*, quali il bioetanolo ottenuto dalla fermentazione dell'amido ottenuto da canna da zucchero, barbabietola e mais, ed il biodiesel ottenuto dal trattamento chimico di oli estratti da palma, colza e altre piante oleaginose (Figura 4.2.2). In Italia la produzione di biodiesel nel 2006 risulterebbe di 15000 barili di biodiesel al giorno, di cui il 60% esportati ¹²⁸. Alla produzione di bioetanolo e biodiesel si accompagna anche la formazione di coprodotti (Dried Distilled Grains with Solubles (DDGS) e glicerolo, rispettivamente) che devono trovare un'adeguata collocazione nel mercato.

Parallelamente alla ricerca di filiere produttive alternative per l'utilizzo della biomassa nel settore energetico, procede quella per lo sviluppo di nuovi prodotti chimici con proprietà utili oppure nuovi processi per produrre composti chimici esistenti. La materia prima vegetale, infatti, risulta essere l'unica fonte rinnovabile in grado di sostituire la frazione di petrolio utilizzata per la produzione di composti chimici.

¹²⁸ ENEA. Rapporto Energia e Ambiente 2006. L'analisi. ENEA, Roma, 2007.

Inoltre, è importante poter abbinare alla produzione dei biocombustibili quella di composti chimici, analogamente a quanto avviene nella raffinazione del petrolio.

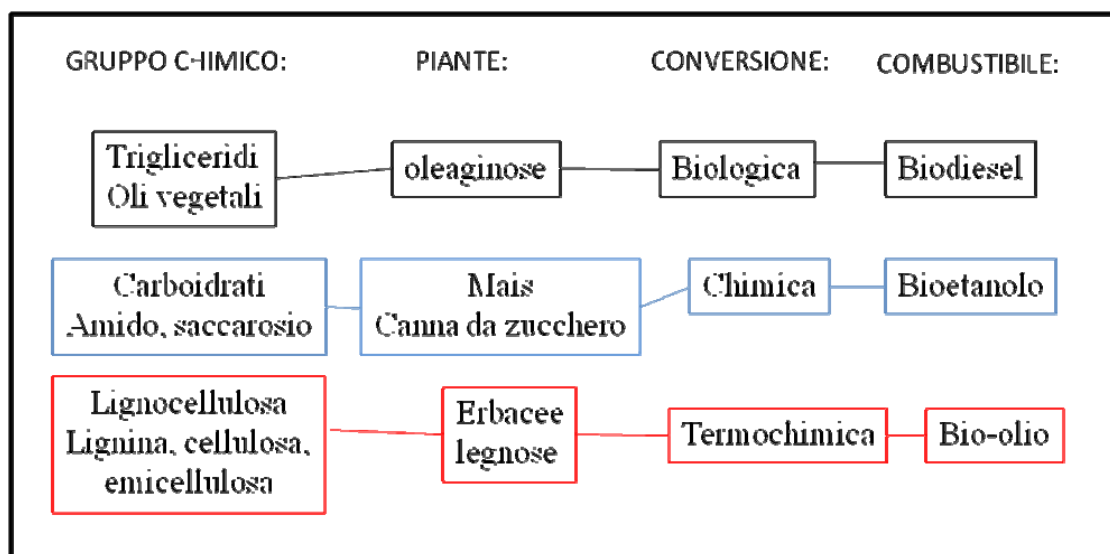


Figura 4.2.2: Tipologie di biocombustibili liquidi derivabili dai diversi costituenti delle biomasse vegetali.

Se la lignocellulosa può essere sfruttata per la produzione di biocarburanti, altri costituenti meno abbondanti della pianta, come trigliceridi e terpeni, possono trovare una collocazione nella produzione di composti chimici di pregio ¹²⁹. La stessa lignocellulosa può essere fonte sia di biocombustibili che di prodotti chimici. L'integrazione di diverse produzioni (energetiche e chimiche) a partire dalla biomassa in unico sistema a basso impatto ambientale è alla base della bioraffineria. L'innovazione tecnologica potrà portare ad una riduzione dei costi dei materiali da

¹²⁹ Corma A., S. Iborra, A. Velty. *Chem.Rev.* 107, 2007, 2411-2502.

fonti rinnovabili e renderle competitive con quelle tradizionali, soprattutto se continua ad aumentare il costo del greggio.

4.1.1 Intermedi chimici dalla biomassa (*building blocks*).

Nell'ottica di uno sfruttamento integrato della biomassa nell'ambito di una bioraffineria diventa strategico individuare composti chimici che possono funzionare da intermedi (*building block*) da cui ottenere famiglie costituite da diversi prodotti e con diverse applicazioni (*family trees*), così come avviene nell'industria petrolchimica.

Il petrolio è una miscela complessa di composti che contengono solo carbonio e idrogeno (idrocarburi), di conseguenza i *building blocks* di base dell'industria chimica sono idrocarburi come l'etilene ed il benzene. Da questi intermedi si ottengono importanti e diffusissimi materiali a base idrocarburica, come le plastiche polietilene e polistirene. Per ottenere prodotti più elaborati, gli idrocarburi devono essere opportunamente funzionalizzati con reazioni chimiche per inserire unità strutturali chiamate gruppi funzionali. I gruppi funzionali più comuni contengono ossigeno (ad esempio, $-OH$ e $C=O$).

Dal lato opposto, i prodotti ottenibili dalla lignocellulosa sono altamente funzionalizzati (ricchi in ossigeno). In particolare, la struttura dei carboidrati è già di per sé caratterizzata dalla presenza di numerosi gruppi funzionali (prevalentemente gruppi OH) che presentano, oltretutto, la peculiarità di essere stati generati in natura con una

disposizione spaziale dei sostituenti ben definita (*chiralità*). Per questo la diversità strutturale dei carboidrati e la loro alta densità di gruppi funzionali offre in generale numerose opportunità per derivatizzare un ampio numero di reagenti chirali puri non facilmente ottenibili per altre vie. Ciò rende i carboidrati particolarmente adatti come ausiliari e leganti chirali, catalizzatori asimmetrici e per ottenere reagenti (*building blocks*) per la sintesi di composti chirali con applicazioni in vari settori, inclusa la chimica medica di prodotti naturali e loro analoghi strutturali biologicamente attivi ¹³⁰. Per tutte queste ragioni, molti ricercatori sono impegnati da diversi anni nello studio dei possibili intermedi ottenibili dalla trasformazione della biomassa.

In uno studio condotto da agenzie governative degli Stati Uniti ¹³¹, 300 composti chimici ottenibili dalla biomassa sono stati valutati sulla base di considerazioni tecnico-economiche (stime dei costi, potenzialità di mercato, proprietà chimiche, etc.) per valutarne le potenzialità come *building block*. Fra i criteri di scelta la presenza di funzionalità multiple è considerata determinante, perché indica la molteplicità di derivati che possono essere ottenuti dal singolo composto. Sono stati esclusi i composti con poche funzionalità e le *supercommodity* (prodotti di massa), ovvero intermedi tipici e/o sottoprodotti dell'industria petrolifera (ad esempio l'acido acetico). Alla fine del processo di valutazione sono stati selezionati 30 candidati, alcuni dei quali presentati nella Tabella 4.1.1.1. Come si vede, la fonte primaria di tutti questi intermedi sono i carboidrati.

¹³⁰ (a) Bols, M., Carbohydrate building blocks, J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1996. (b) Boysen M. M. K., Chemistry, Eur. J. 13, 2007, 8648-8659.

¹³¹ Werpy, T., Petersen, G. Eds Top Added Values Chemicals from Biomass. Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2004.

Tabella 4.1.1.1: Alcuni intermedi chimici ottenibili da carboidrati ³.

Intermedio prodotto	Processo	alcuni derivati e loro utilizzi
Acido lattico	Fermentazione	Plastiche biodegradabili/biocompatibili (acido polilattico); glicole etilenico; acido acrilico; prodotti farmaceutici e per l'igiene personale (acido piruvico)
Acido succinico	Fermentazione	Solventi (tetraidrofurano); (pirrolidoni)
Acido 3-idrossipropionico	Fermentazione	monomero per fibre e resine in poliestere 1,3-propandiolo; acrilati
Acido itaconico	Fermentazione	Copolimeri con stirene-butadiene, acido acrilico; nuovi polimeri
Furfurale	Disidratazione acida	Resine, vitamina C, fragranze (alcol furfurilico); farmaci, pesticidi (furfurilammina); idrossimetilfuraldeide (HMF) per nuovi polimeri (poliesteri)
Acido levulinico	Disidratazione acida	Additivo per carburanti (esteri), erbicida (amminoderivato), policarbonati (acido difenolico)
Levoglucoano LG	Pirolisi	tensioattivi non-ionici; prodotti farmaceutici chirali; substrato nelle fermentazioni; <i>specialties</i>

4.1.2 Prodotti chimici dalla conversione bio/chimica dei carboidrati.

I carboidrati o zuccheri, in forma di cellulosa ed emicellulosa, costituiscono la classe più abbondante di composti nelle piante, ma sono abbondanti anche in altre fonti, ad

esempio, il lattosio è ottenuto dall'industria casearia, l'amido dai cereali, e molti polisaccaridi provengono dalle alghe ¹³².

Il glucosio è il carboidrato più abbondante in natura, sia in forma libera che legato ad un altro zucchero nei disaccaridi (saccarosio, lattosio) o in forma di lunghe catene nei polisaccaridi (cellulosa, amido). Attualmente la fonte principale di glucosio è l'amido, soprattutto quello da mais, ma potrebbe essere ottenuto dalla cellulosa presente nella biomassa legnosa.

Esistono due vie principali per trasformare i carboidrati in intermedi chimici di origine non-petrolifera:

1) *Conversione biologica*. La fermentazione è un processo che utilizza cellule viventi fatte crescere in un bio-reattore per trasformare il materiale organico di partenza (es. glucosio) nel composto chimico d'interesse (es. vitamina C). I progressi nella biotecnologia potrebbero rendere questa via competitiva con la trasformazione chimica dei combustibili fossili. Ad esempio, un composto chimico di notevole interesse prodotto attualmente dalla fermentazione del glucosio è l'acido lattico. La produzione mondiale è di 350 000 ton/anno, ma sembra destinata a crescere di oltre il 10% anno.

2) *Conversione chimica*. Il processo consiste sostanzialmente nella eliminazione di molecole d'acqua attraverso un trattamento termico in ambiente acido. Il furfurale (furaldeide) è un intermedio prodotto con questo processo, ed è prodotto principalmente dalla biomassa. La conversione chimica può presentare alcune problematiche come la necessità di usare acidi forti, le rese modeste e la difficile purificazione che rendono questi processi ancora poco competitivi. E' il caso dell'idrossimetilfuraldeide (HMF).

¹³² Foley P.M., Evan S.B., Zimmerman J.B. Green Chem., 2011, 13, 1399-1405.

Sebbene tale composto presenti forti potenzialità come intermedio molto versatile ottenibile da fonti rinnovabili, la sua produzione su larga scala non è stata ancora attuata per i costi elevati.

4.1.3. Prodotti chimici dalla pirolisi dei carboidrati.

In alternativa alla via chimica, la disidratazione può essere condotta per via termochimica tramite la pirolisi. La pirolisi è un riscaldamento condotto a temperature maggiori di 300 °C in assenza di aria. L'HMF ed il furfurale, citati sopra, sono composti prodotti dalla pirolisi dei carboidrati, ma le rese dalla pirolisi sono molto più basse di quelle del processo chimico. Il levoglucosano (LG, Figura 4.1.3.1), un composto tipico della pirolisi di cellulosa ed emicellulosa, e può essere ottenuto con rese relativamente alte dalla biomassa (legno, residui della carta). LG, come mostra la Tabella 4.1.1.1, è stato inserito fra i potenziali *building blocks* ottenibili dalla biomassa. Un altro anidrozucchero ottenibile dalla pirolisi e molto studiato come intermedio è il LGO. Tutti questi composti si trovano nella frazione liquida che si ottiene dalla pirolisi della biomassa, chiamata bio-olio (liquido pirolitico). Tra le molecole mostrate in figura LG ed LGO sono stati ampiamente utilizzati e testati in letteratura come sintoni chirali ed intermedi nelle sintesi organiche, mentre il DGP è un prodotto minore nella pirolisi catalitica della cellulosa, ma prodotto in quantità consistenti nella pirolisi tal quale della cellulosa.

L'HMF, ottenibile con catalisi acida dal trattamento del fruttosio, è una promettente molecola da cui partire per la sintesi di composti quali i liquidi ionici ¹³³, grazie alla presenza della funzionalità aldeidica. Il LG è stato utilizzato come punto di partenza per la sintesi di composti ad azione detergente ¹³⁴, tramite catalisi enzimatica in solventi meno dannosi per l'ambiente quali i liquidi ionici e l'acetonitrile.

Il LAC, composto da un anello tetraidrofuransico con due centri chirali, possiede una struttura interessante per essere utilizzato come building block, anche per la presenza della struttura lattonica che può essere facilmente convertita in gruppi funzionali sfruttabili senza alterare gli stereocentri.

L'interesse verso la pirolisi come processo di produzione di composti chimici da biomassa è legato al fatto che lo stesso trattamento termochimico trova applicazione nel settore energetico. Il bio-olio, infatti, è proposto come potenziale fonte di biocombustibili di *seconda generazione*, direttamente o dopo processi di *upgrading*, o indirettamente come carica per la gassificazione. Quindi, il bio-olio potrebbe rappresentare contemporaneamente una fonte di composti chimici e biocombustibili.

¹³³ Galletti P., Montecavalli A., Moretti, F., Pasteris, A., Samori, C., Tagliavini E. *New Journal of Chemistry*, 2009,33, 1859-1868.

¹³⁴ P. Galletti, F. Moretti, C. Samori, E. Tagliavini, , *Green Chemistry*, 2007, 9, 987- 991.

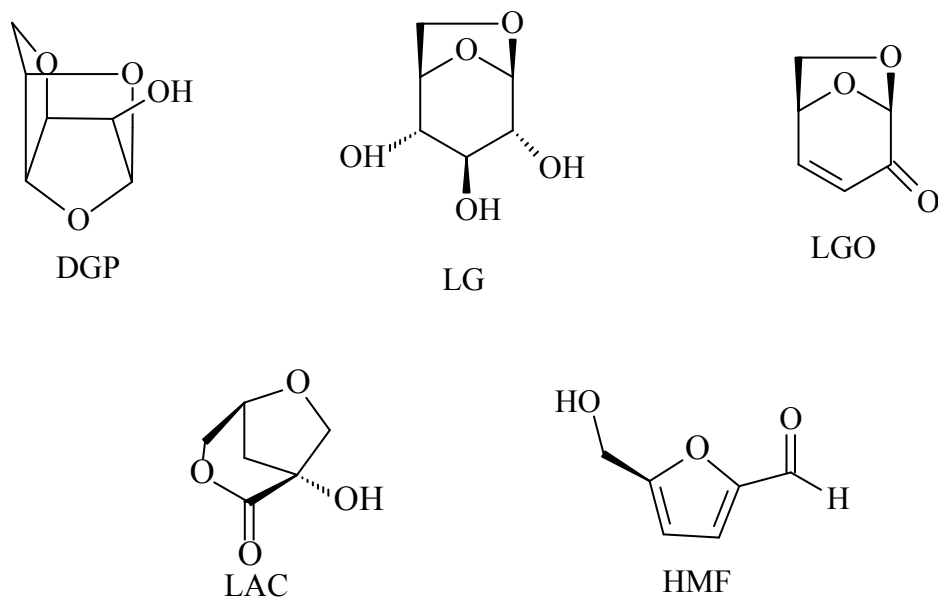


Figura 4.1.3.1: Struttura molecolare dei prodotti di pirolisi della cellulosa contenenti sei atomi di carbonio. HMF: 5-idrossimetil-2-furaldeide; LGO: levoglucosenone; DGP: 3,6:1,4-dianidroglicopiranosio; LAC: (1R,5S)-1-idrossi-3,6-dioxabicyclo[3.2.1]ottan-2-one, LG: levoglucosano.

In principio, il trattamento pirolitico presenterebbe un costo minore se paragonato ad altri metodi di conversione della biomassa (idrolisi acida o degradazione microbiologica). Anche la tecnologia è matura, ad esempio il *cracking* termico applicato alla produzione di benzine da petrolio è un processo pirolitico. I due principali prodotti di pirolisi della cellulosa, LG e LGO, sono stati studiati in dettaglio come possibili intermedi per la sintesi di una grande varietà di composti¹³⁵. Tuttavia, a causa della sua scarsa selettività del processo e della conseguente complessità chimica del bio-olio, l'isolamento di composti di interesse è molto difficile e l'applicazione

¹³⁵ Witczak J. Z. J. Witczak Ed., ATL press Mount Prospect, 1994.

industriale è tuttora molto rara ¹³⁶. Sorprendentemente, un prodotto minore della pirolisi della cellulosa che presenta le caratteristiche strutturali adatte come intermedio chimico è stato descritto nel 1988 senza destare l'attenzione dei ricercatori ¹³⁷. Questo composto l'(1R,5S)-1-idrossi-3,6-dioxa-biciclo[3.2.1]ottan-2-one, che abbiamo abbreviato LAC, è stato riscoperto solo di recente ¹³⁸ e le problematiche relative all'aumento della resa da pirolisi catalitica e la conseguente purificazione sono problemi affrontati in questa tesi.

4.1.4 Pirolisi catalitica e LAC.

L'utilizzo di solidi attivi abbinato alla pirolisi (*pirolisi catalitica*) può indirizzare la degradazione del materiale organico verso i prodotti di interesse e aumentarne le rese. La catalisi eterogenea è ampiamente utilizzata nell'industria chimica e petrolifera, e potrebbe offrire grandi potenzialità per rompere le barriere scientifiche e tecnologiche che ostacolano il pieno utilizzo della biomassa lignocellulosica. L'utilizzo dei catalizzatori nella conversione termochimica della biomassa è stato studiato soprattutto al fine di produrre combustibili, e quindi in definitiva nel ridurre il contenuto di ossigeno nel prodotto finale. Per questo motivo i principali catalizzatori mostrano

¹³⁶ Mohan D., Pittman C.U., Steele P.H. *Energy & Fuels* 20, 2006, 848-889.

¹³⁷ Furneaux R.H., Mason J.M., Miller I. J., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1988, 49.

¹³⁸ Fabbri D., Torri C., Baravelli V., *J.Anal.Appl.Pyrol.*, 80 2007, 24.

un'elevata attività catalitica di *cracking*, e appartengono principalmente alla famiglia delle zeoliti. Il rapido sviluppo di nuovi solidi attivi, soprattutto nel campo dei nanomateriali, apre interessanti possibilità di applicazione della pirolisi catalitica anche nel settore della produzione di prodotti chimici, un settore ancora poco investigato.

Precedenti lavori hanno mostrato come l'utilizzo di nanoparticelle in pirolisi possa produrre risultati interessanti influenzando apprezzabilmente la reattività dei substrati¹³⁹. Sicuramente il risultato più importante ottenuto dalla pirolisi con nanoparticelle è stato quello di aumentare le rese di LAC¹¹. Questo composto presenta le caratteristiche di funzionalità multipla che lo rendono un possibile *building block*. Con l'impiego di un pirolizzatore da banco (Figura 4.1.4.1), è stato possibile ottenere quantità significative di bio-olio da cellulosa che ha reso possibile l'isolamento di LAC. I primi esperimenti sulla sua reattività hanno dimostrato che è un valido intermedio per la sintesi di nuovi composti chirali¹⁴⁰. Inoltre, LAC è stato utilizzato con successo come monomero nella sintesi di una nuova classe di poliesteri completamente ricavabili da fonti rinnovabili¹⁴¹.

Lo sviluppo di questo composto per future possibili applicazioni richiede in primo luogo la possibilità di ottenerlo in forma pura e relativamente abbondante dal liquido pirolitico della cellulosa o di altri derivati della biomassa. Questo obiettivo può essere raggiunto operando sul processo pirolitico, valutando diversi substrati e catalizzatori, e sulla procedura di purificazione. Inoltre, devono essere ricercate nuove sostanze di

¹³⁹ Fabbri D., V.Baravelli, G.Chiavari, S.Prati, E.Finessi. *J.Anal.Appl.Pyrol.*, 79, 2007, 2-8.

¹⁴⁰ Fabbri D., Torri C., Mancini I., *Green Chem.* 9, 2007, 1374.

¹⁴¹ Dobrzynski P., D.Fabbri, C.Torri, J.Kasperczyk, B.Kaczmarczyk, M.Pastusiak. *J.Polymer Sci.Part A: Pol.Chem.* 47, 2009, 247-257.

potenziale utilità che possono essere ricavate dalla trasformazione di LAC sfruttando la sua particolare struttura chimica e studiandone in dettaglio la reattività. E' su questi aspetti che è stata indirizzata l'attività di ricerca della presente Tesi. L'uso delle nano particelle, che hanno permesso di individuare LAC, presenta delle problematiche nella manipolazione e possibile esposizione, per cui sono stato approfondito lo studio sulle mesofasi del tipo MCM-41. Le fasi iniziali dello studio dei catalizzatori nella conversione pirolitica della biomassa si basano su esperimenti condotti in pirolisi analitica su piccoli campioni, come dimostrato anche da lavori recenti ¹⁴². I risultati ottenuti sono stati determinanti per stabilire le condizioni con cui effettuare le pirolisi preparative con il pirolizzatore da banco. Riassumendo, l'obiettivo della presente Tesi è stato focalizzato su LAC, investigando i vari substrati da cui si può ottenere, i catalizzatori che ne promuovono la formazione, i metodi per purificarlo e la sua trasformazione in nuovi prodotti chimici.

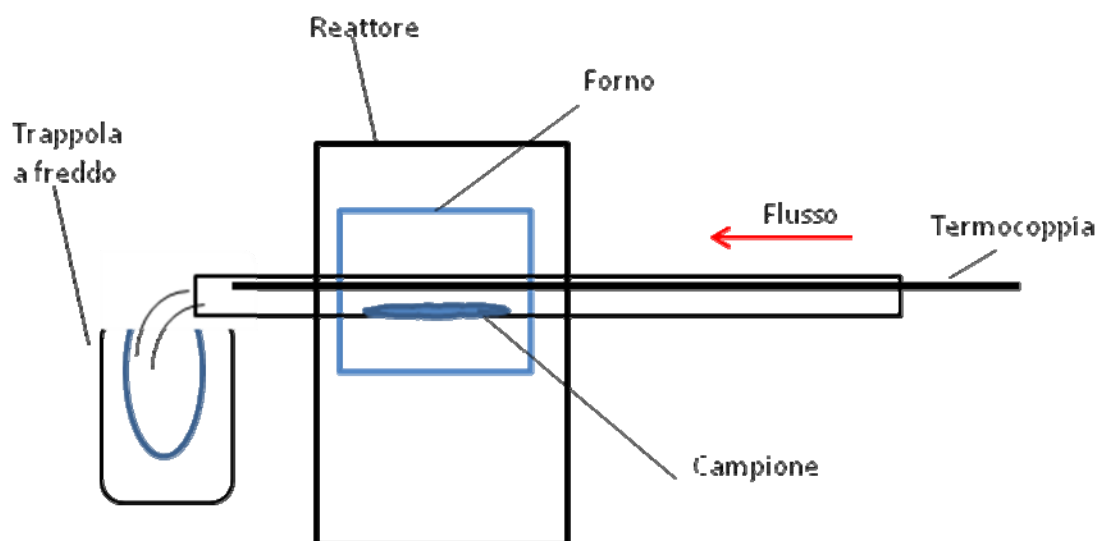


Figura 4.1.4.1: Schema del pirolizzatore da banco utilizzato in questo studio.

¹⁴² Carlson T.R., Tompsett A.G., Conner C., Huber G.W., Topics in Catalysis, 2009,52, 3, 241-252.

4.2 LAC: metodiche di isolamento

Produzione di LAC da substrati diversi dalla cellulosa.

La produzione pirolitica di LAC è stata dimostrata in studi precedenti solo nel caso della cellulosa^{9 11}, ma è prevedibile che il composto possa formarsi dalla degradazione termica di altri carboidrati. La cellulosa, pur essendo il componente più abbondante della biomassa, ha l'inconveniente di essere tra i più recalcitranti alle trasformazioni chimiche per il suo elevato peso molecolare e l'elevato grado di cristallinità. Queste caratteristiche potrebbero ostacolare un'interazione efficace con il catalizzatore, condizione necessaria per promuovere la degradazione termica verso la formazione di LAC.

Carboidrati come l'amido, il lattosio, ed il glucosio sono dei derivati importanti dell'agroindustria, e potrebbero risultare più reattivi della cellulosa (minore peso molecolare e/o cristallinità). Assieme a questi importanti substrati, sono stati considerati derivati del glucosio (metilglucosidi) e altri monosaccaridi (galattosio, mannosio) allo scopo di comprendere meglio il meccanismo di formazione di LAC. Infine, sono stati esaminati il LG ed un suo derivato, il 4-acetil-levoglucosano (4-AcLG), al fine di valutare una via alternativa che utilizzasse il LG come intermedio. Infatti, LG può essere ottenuto dalla pirolisi diretta della cellulosa e della biomassa con rese decisamente superiori a quelle di LAC.

Per valutare quantitativamente la tendenza alla formazione di LAC da parte dei vari carboidrati, questi ultimi sono stati sottoposti a pirolisi analitica in condizioni controllate, utilizzando la procedura *off-line* sviluppate in precedenti lavori¹¹. Le

pirolisi sono state condotte a 500 °C sulle sostanze pure oppure in presenza di titanio alluminato nanopolvere (NP TiAl) come catalizzatore (al 30% in peso). Le rese di LAC sono state determinate tramite analisi GC-MS ed i valori ottenuti sono riportati in forma grafica nella Figura 4.2.1.

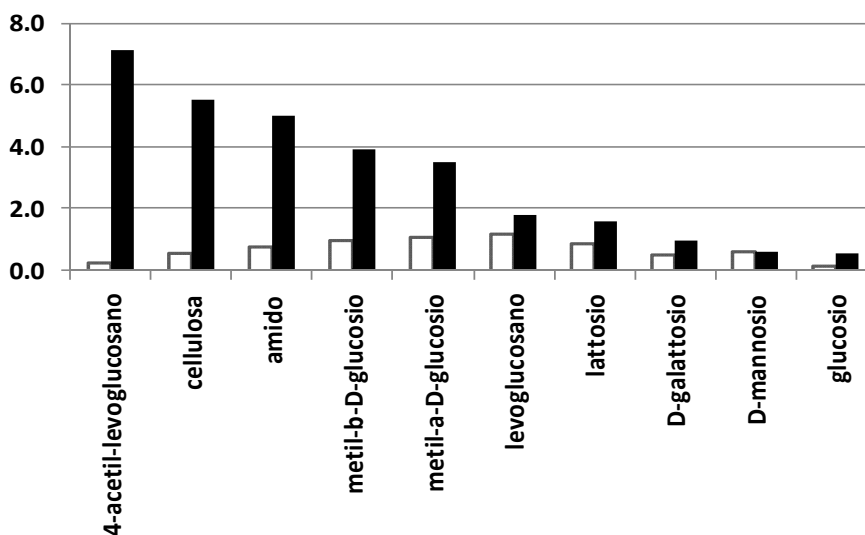


Figura 4.2.1: Rese molar di LAC dalla pirolisi analitica a 500 °C di vari carboidrati in assenza (barre chiare) ed in presenza del 30% di nanopolveri di titanio alluminato (barre scure) .

I risultati delle analisi mostrano che:

- Tutti i carboidrati testati producono LAC; sia il glucosio ed i suoi derivati (amido, cellulosa, LG), sia i monosaccaridi galattosio e mannosio, entrambi appartenenti, come il glucosio, alla famiglia dei D-esosi, sia, infine, il lattosio, un disaccaride costituito da glucosio e galattosio.
- La produzione di LAC è bassa (< 1%) in assenza di catalizzatore, ma tende ad aumentare in sua presenza.
- Le rese di LAC aumentano significativamente in presenza del catalizzatore solo nel caso degli zuccheri non-riducenti (cellulosa, amido, metilglucosidi), mentre gli

zuccheri riducenti (monosaccaridi) continuano a dare rese basse anche in presenza del catalizzatore.

Le evidenze sperimentali confermano il meccanismo proposto da Furneaux et al.⁹, che prevede l'eliminazione dei sostituenti in posizione 1 e 4 della molecola. E' stato partendo da queste osservazioni che abbiamo deciso di studiare il comportamento pirolitico del 4-AcLG (la sintesi è descritta nel paragrafo 4.3), in quanto questo composto presenta due sostituenti facilmente eliminabili nelle posizioni 2 e 4. I risultati hanno confermato le previsioni, in quanto 4-AcLG è risultato essere il campione che presenta le rese maggiori di LAC (Figura 4.2.1). Anche se le rese sono basse rispetto alle attese esistono le condizioni per un miglioramento, perché alle temperature di pirolisi una gran parte dell'acetile volatilizza prima di degradare termicamente.

Sugli stessi campioni sottoposti alle analisi in pirolisi, sono state condotte analisi termogravimetriche (TGA) in collaborazione con il gruppo di Chimica Generale ed Inorganica. Le TGA hanno dimostrato che il catalizzatore favorisce il processo di degradazione termica, in quanto quest'ultima avviene a temperature più basse rispetto a quelle osservate per la sostanza pura.

In particolare, l'analisi termica condotta su 4-AcLG ha mostrato che la degradazione di questo composto può avvenire a temperature "sub-pirolitiche" (< 300 °C), ponendo le basi per una produzione di LAC con i metodi di sintesi alternativi alla pirolisi.

4.2.1 Preparazione del LAC

Pirolisi di cellulosa in presenza di fasi mesoporose (MCM-41).

Le nanopolveri di ossidi metallici, ed in particolare il titanio alluminato, sono efficaci catalizzatori per la produzione pirolitica di LAC, ma hanno il difetto di dover essere manipolate con cura per la loro tendenza a disperdersi nell'aria e perché le informazioni sul rischio associato al loro utilizzo sono ancora frammentarie ¹⁴³. Per questi motivi, insieme alla necessità di trovare catalizzatori ancora più efficaci, è stata indagata una nuova classe di solidi attivi: le mesofasi del tipo MCM-41, approfondendo lo studio intrapreso in precedenti lavori ^{11 12}. Analogamente alle nanopolveri di ossidi metallici, le MCM-41 hanno elevata area superficiale e possono essere preparate con diversa composizione, ma hanno anche il vantaggio di essere formate da particelle più grandi (micron), e quindi di essere più maneggevoli. Infatti, le caratteristiche “nanometriche” responsabili dell'elevata area superficiale sono confinate nella struttura dei pori. Le MCM-41 “pura” è un silicato contenente solo silicio e ossigeno, ma alcuni atomi di Si che costituiscono i pori possono essere sostituiti con atomi dei metalli di interesse per conferire l'attività catalitica richiesta. I solidi MCM-41 possono presentare un'elevata stabilità termica che li rende dunque materiali resistenti alle condizioni di pirolisi e potenzialmente riciclabili.

¹⁴³ (a) Chithrani, D. B., Ghazani, A.A., Chan W., *Nano Lett.*, 2006, 6, 4, 662–668. (b) Albanese A., Chan W.C.W. *ACS Nano*, 2011, 5 7, 5478–5489.

Pirolisi preparativa cellulosa/Sn-MCM-41.

Le pirolisi sono state condotte a 500 °C per cinque minuti su 3 g di cellulosa contenente il 30% in peso di Sn-MCM-41. In presenza del catalizzatore si produce una quantità di bio-olio maggiore rispetto alla pirolisi della cellulosa pura effettuata nelle stesse condizioni (47% contro 33%), senza che si abbia una maggiore carbonizzazione, come succede per altri solidi attivi (i.e., le zeoliti). Infatti, le rese di *char* sono intorno al 15% con e senza catalizzatore. La resa è del 6% di LAC (contro 1% della pirolisi della cellulosa senza catalizzatore), in accordo con i dati di pirolisi analitica. L'attività catalitica di Sn-MCM-41 risulta dunque simile a quella della nanopolvere titanio alluminato. I due catalizzatori sono stati confrontati per quanto riguarda la loro capacità ad essere riutilizzati dopo ciascuna pirolisi. Poiché la pirolisi produce un materiale carbonioso che rimane nel reattore insieme al catalizzatore, il catalizzatore stesso viene recuperato scaldando il residuo in muffola a 550 °C per 6 ore in presenza di aria. I dati delle prove, mostrati in Figura 4.2.1.1, mostrano che le rese di LAC sono più costanti con Sn-MCM-41 rispetto al titanio alluminato. Per questi motivi, lo Sn-MCM-41 ha sostituito il titanio alluminato nella produzione di LAC effettuata in questa Tesi.

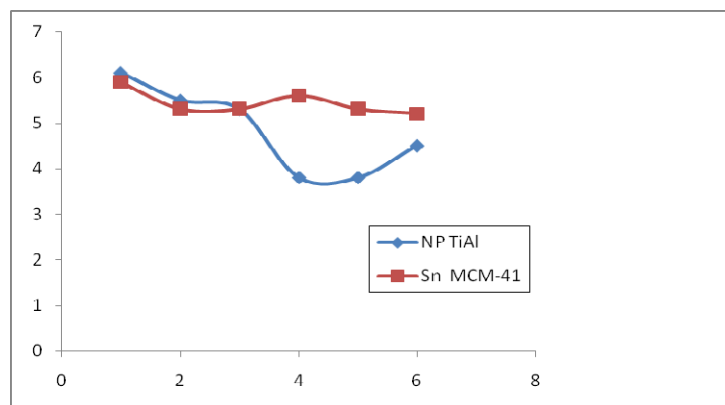


Figura 4.2.1.1: Rese percentuali (espresse in p/p) di LAC dalla pirolisi catalitica della cellulosa a 500 °C in funzione dei cicli di rigenerazione del catalizzatore. Medie di due repliche.

4.2.2 Purificazione del LAC

Cromatografia con gel di silice.

La purezza di LAC è un requisito importante per le sue applicazioni come intermedio nella sintesi di nuovi prodotti. Ad esempio, l'utilizzo di LAC come monomero nella sintesi di poliesteri richiede una purezza almeno del 99%. Poiché LAC si trova a concentrazioni relativamente basse (6%) in un liquido costituito da numerosi prodotti di pirolisi, la sua purificazione è estremamente difficoltosa. L'elevata complessità del bio-olio, richiede tecniche separative efficaci basate sulla cromatografia. In primo luogo è stata considerata la cromatografia su colonna utilizzando il gel di silice come fase stazionaria, la più utilizzata ed economica. Gli esperimenti eseguiti con questa tecnica a diverse condizioni in cui vengono cambiati il sistema eluente e la quantità di silice sono brevemente descritti nella Tabella 4.2.2.1. La Figura 4.2.2.1 mostra alcuni esempi di tracciati GC-MS ottenuti dall'analisi delle frazioni contenenti LAC raccolte durante la separazione su colonna del bio-olio.

Le cromatografie condotte con quantità maggiori di silice e con flussi relativamente lenti presentano bassi recuperi (i. e., N. 1-3 di Tabella 4.2.2.1) probabilmente perché LAC reagisce con i siti attivi (silanoli) della silice (crf. paragrafo successivo). Invece, separazioni rapide perché effettuate con quantità minori di silice permettevano buoni recuperi di LAC (ad es. N.4 e 10). Queste cromatografie “flash” possono condurre a frazioni relativamente pulite di LAC con un minore consumo di solvente. Le impurezze più difficili da eliminare sono HMF e DGP, mentre LGO è facilmente separabile da LAC. Le cromatografie N.11-13 hanno in comune un lavaggio con miscela cicloesano/acetato di etile che elimina i sottoprodotti meno polari, si differenziano per l’eluizione successiva con miscela pentano/diclorometano. Con la procedura N.11 rimane HMF, e si ottiene un campione di LAC puro al 95.5%. Il tracciato GC-MS delle frazioni ricavate dall’esperimento N.13, mostrato in Figura 4.2.2.1, indicherebbe un campione di LAC con un buon grado di purezza. Quest’ultima è stata modificata leggermente (esperimenti 14-16) e alla fine è stata selezionata la procedura N.14 per le successive purificazioni di LAC.

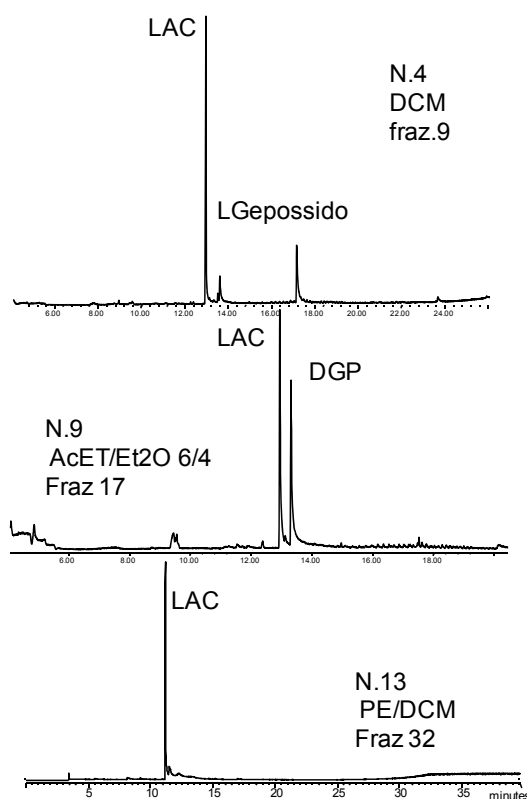


Figura 4.2.2.1: Esempi di analisi GC-MS delle frazioni ottenute da cromatografia su colonna con gel di silice. Gli esperimenti sono numerati come in Tabella 4.2.2.1.

DGP e HMF sono i sottoprodotti più difficile da eliminare ed hanno accompagnato LAC in tutte le frazioni ricavate dagli esperimenti di purificazione cromatografica. Le strade intraprese per ridurre la contaminazione da DGP/HMF sono state due:

- 1) migliorare a valle le metodologie di purificazione (crf. paragrafi successivi di questa sezione)
- 2) modificare a monte la pirolisi per produrre un bio-olio privo di DGP (cambiare substrato o catalizzatore). L'ultima considerazione ci ha spinti a considerare il 4-AcLG come un possibile precursore di LAC (capitolo 4.3).

Tabella 4.2.2.1: Riassunto delle prove di purificazione di LAC dal bio-olio di cellulosa tramite cromatografia su colonna. Fase stazionaria: gel di silice Si60 40-63 μm . Campione: 0.5-1.0 g di bio-olio ottenuto dalla pirolisi catalitica della cellulosa a 500 $^{\circ}\text{C}$ con Sn-MCM-41 (esclusa N.4 idrossitalcite). Abbreviazioni: AcOEt, acetato di etile; DMC, diclorometano; d/h, diametro/altezza dello strato di silice.

N	Fase st. d/h cm	Eluenti	Osservazioni
1	5/15	Cicloesano cicloesano/AcOEt 6/4 cicloesano/AcOEt 1/1 AcOEt AcOEt/MeOH 98/2	66 frazioni da 20-25 ml; ca. 200 ml per eluente Contaminanti da solventi, necessaria distillazione. LAC eluisce con frazioni 46-47; recupero LAC 15%, purezza GC 25%. Contaminanti dei solventi non distillati.
2	5/10	Cicloesano/AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Cicloesano/AcOEt 7/3	Ca. 200 ml per miscela 20 frazioni 5-7 ml con la 3 $^{\circ}$ miscela eluente. Non ci sono frazioni di LAC puro, sempre contaminato da DGP LAC eluisce con CH : AcOEt = 7:3, frazioni 15-20, recupero 40%, area percentuale 53 %
3	5/8	Cicloesano/AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Cicloesano /AcOEt 7/3	Ca. 200 ml per eluente, 40 frazioni 5-7 ml con la 3 $^{\circ}$ miscela eluente LAC contaminato sempre da DGP. frazioni 35-37, recupero 35%, purezza GC 40%
4	3/1-2	Pentano/DCM 3/2 DCM	100-150 ml per eluente. Colonna corta e eluizione veloce per evitare perdite. Sottoprodotti epossidi di LG. Recupero 92%, purezza GC 66%
5	3/8	Pentano/DCM 3/2 DCM DCM/MeOH 95/5	LAC molto "sporco" aumentando l'altezza della colonna non migliora la separazione LG rimane in colonna (eluisce con AcOEt)
6	3/8-10	Pentano/DCM 3/2	DCM, metilfurani (110); AcOEt/CH 6/4,

		DCM Cicloesano/AcOEt 4/6 Cicloesano/AcOEt 2/8 AcOEt/MeOH 98/2	ciclopentanone/idrossipiranone (112/114); AcOEt/CH 8/2, LAC, DGP, HMF Recupero 30%, purezza GC 16 %
7	3/8	Pentano/AcOEt 9/1 Pentano/AcOEt 8/2 AcOEt/Et ₂ O 6/4	Recupero 30%, purezza GC 29 %
8	3/8	Pentano/AcOEt 9/1 Pentano/AcOEt 8/2 AcOEt/Et ₂ O 6/4	AcOEt/Et ₂ O 6/4, frazioni da 5-7 ml. . In tutte le frazioni LAC prodotto principale, ma significativa presenza di HMF e DGP Recupero 25%, purezza GC 60%
9	3/8	Pentano/AcOEt 9/1 Pentano/AcOEt 8/2 AcOEt/Et ₂ O 6/4	AcOEt/Et ₂ O 6/4, frazioni da 5-7 ml. LAC e DGP prodotti principali. Recupero 30%, purezza GC 53%
10	3/2	Pentano/AcOEt 9/1 Pentano/AcOEt 8/2 DCM	Frazioni da ca. 100 ml. Impurezza principale un composto non identificato (m/z 53, 68, 81, 96, 98). Recupero 89%
11	3/4	Cicloesano/AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Pentano/DCM 3/2 DCM	Frazioni da 25 ml; impurezze principali HMF (1%) e DGP Recupero 90%, purezza NMR 95.5 %
12	3/4	Cicloesano/AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Pentano/DCM 4/1 DCM	Frazioni da 25 mL HMF eluisce con Pentano/DCM 4/1 Recupero 98%
13	3/4	Cicloesano /AcOEt 9/1	50 ml per le prime due miscele, 150 ml le altre.

		Cicloesano/AcOEt 8/2 Pentano/DCM 4/1 Pentano/DCM 3/2 DCM	Raccolte frazioni da 25 mL Recupero 95%
14	$\frac{3}{4}$	Cicloesano /AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Pentano/DCM 4/1 Pentano/DCM 3/2 DCM	50 ml per la prima miscela, 150 ml per la seconda, 100 per la terza, 200-250 ml per la quarta, 100 ml di DCM. Raccolte frazioni da 25 mL Recupero 95%
15	$\frac{3}{4}$	Cicloesano /AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Pentano/DCM 4/1 Pentano/DCM 3/2 Pentano/DCM 2/3 DCM	50 ml per la prima miscela, 150 ml per la seconda, 100 per la terza, 200-250 ml per la quarta e la quinta, 100 ml di DCM. Raccolte frazioni da 25 mL Recupero 95%
16	$\frac{3}{4}$	Cicloesano /AcOEt 9/1 Cicloesano/AcOEt 8/2 Pentano/DCM 4/1 Pentano/DCM 3/2 Pentano/DCM 25/25 DCM	50 ml per la prima miscela, 150 ml per la seconda, 100 per la terza, 200-250 ml per la quarta e la quinta, 100 ml di DCM. Raccolte frazioni da 25 mL Recupero 95%

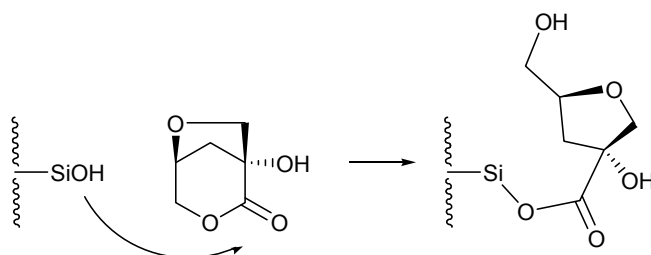
Reattività di LAC con la silice.

Su una aliquota di LAC (170 mg) e' stata eseguita una flash cromatografia su silice *LiChroprep* Si60 15-25 μm (Merck), con rapporto circa 50:1 di fase

stazionaria/campione di LAC eluendo con esano/AcOEt a polarità crescente. Si è riuscito a separare HMF eluita prima del LAC, poi tre frazioni contenenti LAC pulito e come componente più abbondante in miscela con altre impurezze; nemmeno le ultime frazioni eluite con acetone o metanolo contenevano il LAC. In totale il recupero di LAC non è stato superiore al 10%.

E' stata anche eseguita una prova di stabilità quantitativa su silice: LAC (mg 25) è stato trattato con silice (50 volte il suo peso) in presenza di esano / acetato di etile 1:1 sotto agitazione per alcuni giorni; da filtrazione, lavaggio con AcOEt e isopropanolo ed evaporazione si è ottenuto un residuo che da analisi $^1\text{HNMR}$ sembra LAC inalterato, ma che corrisponde solo al 37% del peso iniziale.

Dai risultati sopra riportati si deduce che LAC viene recuperato solo in piccola parte da cromatografia su silice. Una possibile spiegazione è che si leghi alla silice mediante la reazione riportata nello schema 4.2.2.1.



Schema 4.2.2.1: Ipotetico meccanismo di apertura dell'anello lattonico di LAC e reazione con la silice.

A conferma della avvenuta funzionalizzazione della silice con formazione del legame covalente Si-O-C via apertura del lattone, sono state eseguite le seguenti prove:

1) reazione di rottura del legame Si-O usando Bu_4NF in THF, reattivo in uso per la deprotezione dei silileteri, con formazione del legame Si-F e recuperare l'idrossiacido.

2) registrazione dello spettro FT-IR della silice usata nella cromatografia sopradescritta e confronto con lo spettro della silice non trattata.

Se la reazione tra i gruppi silanoli Si-OH e LAC riportata nello schema fosse accertata, questo dato potrebbe essere sfruttato per funzionalizzare la silice: si otterrebbe una fase stazionaria chirale con potenziali applicazioni in chimica analitica per la separazione di miscele racemiche e il riconoscimento chirale. Inoltre si potrebbero preparare superfici biocompatibili perché la silice può essere facilmente depositata su vari materiali (inclusi metalli e plastica) e il gruppo OH può essere opportunamente funzionalizzato.

Cromatografia su fase stazionaria RP-18

E' stata eseguita la purificazione del LAC per cromatografia liquida usando una colonna (flash cromatografia) con la fase stazionaria *LiChroprep CN 40-63 μm* (Merck) ed eluendo con acqua/acetonitrile; si è recuperato nelle prime frazioni il LAC, che da analisi ¹HNMR mostrava un grado di purezza paragonabile a quello di partenza. Anche da TLC su RP-18, ed usando come eluente acetonitrile il LAC viene trasportato con l'eluente in cima alla TLC e questa fase non si dimostra: ciò è dovuto molto probabilmente alla peculiarità strutturale del LAC, che è una molecola polare ma di dimensioni molto ridotte che non facilitano la ritenzione per interazione con la fase e risulta quindi insensibile alla polarità dell'eluente.

E' stata anche eseguita una prova di stabilità del LAC sulla fase RP-18: si è osservato che per trattamento a caldo (60 gradi) nelle condizioni necessarie per

evaporare a bassa pressione al rotavapor l'eluente acetonitrile/acqua si ottiene una piccola trasformazione del LAC ad idrossiacido, come evidenziato da spettro $^1\text{H-NMR}$ del campione dopo questo trattamento.

In base a queste evidenze si conclude che la cromatografia su fase RP18 non è indicata per la purificazione del LAC.

Cromatografia con fase stazionaria CN

Per la purificazione di LAC è stata considerata anche una fase stazionaria CN.

La silice utilizzata in cromatografia può essere funzionalizzata con gruppi sostituenti . E' stata eseguita anche in questo caso una prova di stabilità quantitativa di LAC su fase CN ed il recupero corrisponde ad un 70% della quantità iniziale di LAC, dato dovuto molto probabilmente al fatto che non tutti i gruppi SiOH della silice sono stati funzionalizzati con i gruppi CN. Se ne deduce che la fase CN sembra abbastanza promettente come sistema di purificazione del LAC anche se con un recupero non totale. Le fasi stazionarie con un maggiore grado di funzionalizzazione CN, da utilizzare come fase stazionaria per una purificazione cromatografica del LAC, sono estremamente costose per cui questa strada è stata abbandonata per una purificazione operativa.

Purificazione per distillazione

Sono stati eseguiti due esperimenti di distillazione tramite un distillatore a bolle Kugelrohr; il primo esperimento è stato svolto su un campione di LAC già parzialmente purificato, l'altro sul bio-olio di cellulosa grezzo.

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ mostra che LAC è il composto principale con una purezza del 95.5%.

Sono state identificate per confronto con spettri $^1\text{H-NMR}$ dei composti puri l'HMF, ed il 4-H-piran-4-one, attribuzioni confermate dall'analisi GC-MS. Sono stati inoltre identificati segnali non quantificabili attribuibili al DGP e ad un altro anidro zucchero non quantificato.

In un secondo esperimento sono stati sottoposti a distillazione 1,78 g di bio-olio. L'analisi TLC e dei tracciati gas cromatografici dei distillati sciolti in acetato di etile mostra che questi sono costituiti da miscele complesse e in nessuna di queste LAC è il prodotto principale. La distillazione non risulta essere un'efficace procedura di purificazione dal bio-olio grezzo.

Purificazione con carbone attivi.

Al fine di aumentare la purezza del prodotto ottenuto sono state svolte diverse prove di pulizia dei campioni su carboni attivi. Sono state eseguite diverse prove per determinare il rapporto ottimale carbone/eluente. I risultati sono mostrati in Tabella 4.2.2.2.

Su tutti i campioni sono state eseguite analisi $^1\text{H-NMR}$ per valutare la purezza. La prova che ha dato i migliori risultati in termini di resa e purezza è stata la prova N.1, per la quale LAC risulta avere una purezza > 99%.

Tabella 4.2.2.2: Recupero di LAC tramite passaggio su carboni attivi.

	Quantità Lac [mg]	Volume eluente [mL]	Carboni attivi [mg]	Resa [mg]
Prova 1	50	1	100	40
Prova 2*	50	1	100	30
Prova 3	51	1	50	25
Prova 4	51	0.75	100	15
Prova 5	51	0.5	100	12

* : Nella prova 2 è stato fatto un riciclo del solvente, per una seconda eluizione.

In conclusione, per quanto riguarda la sintesi e l'isolamento di LAC ottenuto dalla pirolisi catalitica della cellulosa in presenza di Sn-MCM-41, tra tutte le prove effettuate la migliore combinazione, che ha permesso di ottenere un prodotto puro al 99% è composta come segue.

- 1) Colonna cromatografica *flash* su gel di silice di un campione di bio-olio essiccato al rotavapor.
- 2) Ripetizione della colonna cromatografica, con lo stesso rapporto di eluenti, svolta sulla raccolta delle frazioni maggiormente ricche in LAC.
- 3) Lavaggio con carboni attivi delle frazioni raccolte precedentemente.

Il LAC così ottenuto è stato utilizzato per lo svolgimento delle sintesi descritte nei capitoli successivi.

Materiali e Metodi

Sintesi delle Sn-MCM-41

In una beuta dotata di ancoretta magnetica si introducono 120 mL di H₂O mQ e 2.4 g di CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro) e si agita la miscela per due ore a temperatura ambiente. Quindi si aggiungono lentamente 4.4 mmoli di stagno tetracloruro pentaidrato (SnCl₄*5H₂O) e si lascia in agitazione per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine delle due ore si aggiungono 10 mL di TEOS (44 mmoli, p.m. 208.33 g/mol; il rapporto molare Sn/Si è 1/10) e successivamente con un imbuto gocciolatore vengono addizionati lentamente 8 mL di una soluzione di NH₃ al 30% agitando vigorosamente la miscela di reazione. La sospensione che si è formata viene posta in lenta agitazione in un bagno termostato a 25 °C per almeno 48 ore sotto flusso laminare a 50 rpm per mezzo di un oscillatore TBVS HETOMIX.

Durante la policondensazione la sospensione si trasforma in un solido che viene filtrato su filtro di carta sotto vuoto e lavato poi con acqua .

Il solido è seccato in stufa a 80° C sotto vuoto per 4 ore per allontanare l'acqua e macinato con un pestello di ceramica. Per eliminare ogni CTAB residuo il solido è sottoposto a pirolisi a 500 °C per 5 minuti, o fino a totale scomparsa dei fumi, utilizzando il pirolizzatore da banco. Infine, il solido è trasferito in un crogiuolo e trattato in muffola a 550 °C per 5-6 ore.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei catalizzatori sono state determinate tramite diffrazione a raggi X per verificare la formazione della mesofase, di metallo, analisi BET per misurare l'area superficiale specifica. Nel caso della Sn-MCM-41 i

diffrattogrammi RX mostrano una mesofase MCM parzialmente strutturata e la presenza di ossido di stagno.

Colonne cromatografiche, fase stazionaria gel di silice

In una colonna in vetro di 3 cm di diametro sono stati messi 5 cm di gel di silice Si60 40-63 μm . La colonna è stata condizionata con acetato di etile : cicloesano in rapporto 1 : 1. Un campione di LAC da purificare (circa 1-2 g) viene finemente mescolato insieme ad una aliquota di silice e posto in testa alla colonna. L'eluizione del campione viene svolta con il rapporto di solventi scelto (cfr. Tabella 4.2.3.1); il solvente eluito viene raccolto in frazioni da 12-15 mL e le frazioni principali vengono analizzate tramite cromatografia su gel di silice (TLC). Le frazioni che contengono il maggior quantitativo di LAC vengono unite ed il solvente allontanato al rotavapor.

Cromatografia con fase stazionaria CN

Per le analisi è stata utilizzata una silice LiChroprep CN 40-63 μm (Merck). Sono state svolte TLC con eluenti esano/AcOEt in rapporto 7:3 - 1:1 - 3:7.

Le prove di stabilità su fase stazionaria sono state svolte utilizzando la silice in rapporto 50 volte il peso di LAC, in presenza di esano/acetato di etile 1:1, sotto agitazione per alcuni giorni; da filtrazione, lavaggio con AcOEt e isopropanolo ed evaporazione si è ottenuto un residuo analizzato in $^1\text{H-NMR}$.

Purificazione tramite distillatore Kugelrohr a bolle

Per le prove di distillazione è stato utilizzato un distillatore a bolle Buchi Glass oven B-585 Kugelrohr. Nel primo esperimento viene posto a distillazione circa 1 g di campione di LAC proveniente da cromatografia su colonna (Tabella 4.2.2.1, metodo 14). Il prodotto viene raccolto nell'ultima bolla. Si utilizza nella linea di vuoto una trappola a ghiaccio secco e acetone. La distillazione viene condotta per un'ora nelle seguenti condizioni:

- 50 rpm (rotazioni per minuto)
- Pressione: $3.8 - 4.5 \cdot 10^{-2}$ atm
- Temperatura: partendo da 50-60 °C viene aumentata di 10 °C alla volta fino a 110 °C, poi si innalza a 135 °C. A questa temperatura la maggior parte del prodotto condensa nella bolla 3 dove viene raccolto. Nella bolla 2 condensa una miscela di LAC, 3-metil-2-idrossiciclopentenone ed altri composti incogniti.

Viene recuperato nella bolla 3 un liquido chiaro trasparente costituito essenzialmente da LAC, con un recupero che rappresenta l'85% del campione iniziale sottoposto a distillazione.

La distillazione è stata condotta per un'ora e mezza nelle condizioni sono state le seguenti:

- 50 rpm (rotazioni per minuto)

- Pressione: $8.4 \cdot 10^{-2}$ atm.
- Temperatura: 50 °C, aumento di 10 °C alla volta fino a 110 °C, aumento progressivo fino a 145 °C, innalzamento da 145 °C a 165 °C .

Sono stati raccolti i seguenti distillati nelle bolle 3 e 4:

- 80° C: liquido giallino (80 mg)
- 100° C, $4.39 \cdot 10^{-1}$ atm
- 110° C
- 132° C, $3.81 \cdot 10^{-1}$ atm
- 135° C.

Purificazione con carboni attivi.

Le prove sono state effettuate su pipette *pasteur* accorciate con un tappo finale di cotone in cui viene introdotto il carbone attivo. Sono stati utilizzati activated carbon (decolorizing - 100 mesh sieves). Il solvente per l'eluizione è stato l'acetonitrile. I campioni raccolti sono stati analizzati tramite $^1\text{H-NMR}$.

4.3 Analisi in pirolisi offline e preparativa del 4-AcLG come substrato per la sintesi di LAC

Allo scopo di ottimizzare la sintesi di LAC, sono state provate diverse molecole come substrati di partenza di cui è stato valutato il potenziale come reattivi in pirolisi in presenza di catalizzatori dotati di acidità di Lewis. Le vie di sintesi pirolitiche di LAC sono indicate, conformemente a quanto indicato in altri studi ¹¹, in Figura 4.3.1.

In lavori precedenti è stato proposto un meccanismo di formazione attraverso il riarrangiamento dei precursori che presentano anelli zuccherini a 6 atomi di carbonio; nello specifico passando dall'ascopirone P, prodotto per via pirolitica a partire dalla cellulosa, e poi attraverso il riarrangiamento benzilico dei suoi derivati a dare il LAC.

Vie alternative di produzione di LAC, che comprendono la creazione dell'anello lattonico a partire dalla ciclizzazione dell'acido δ -isosaccarinico ottenibile per trattamento alcalino della cellulosa, non hanno dato buoni risultati.

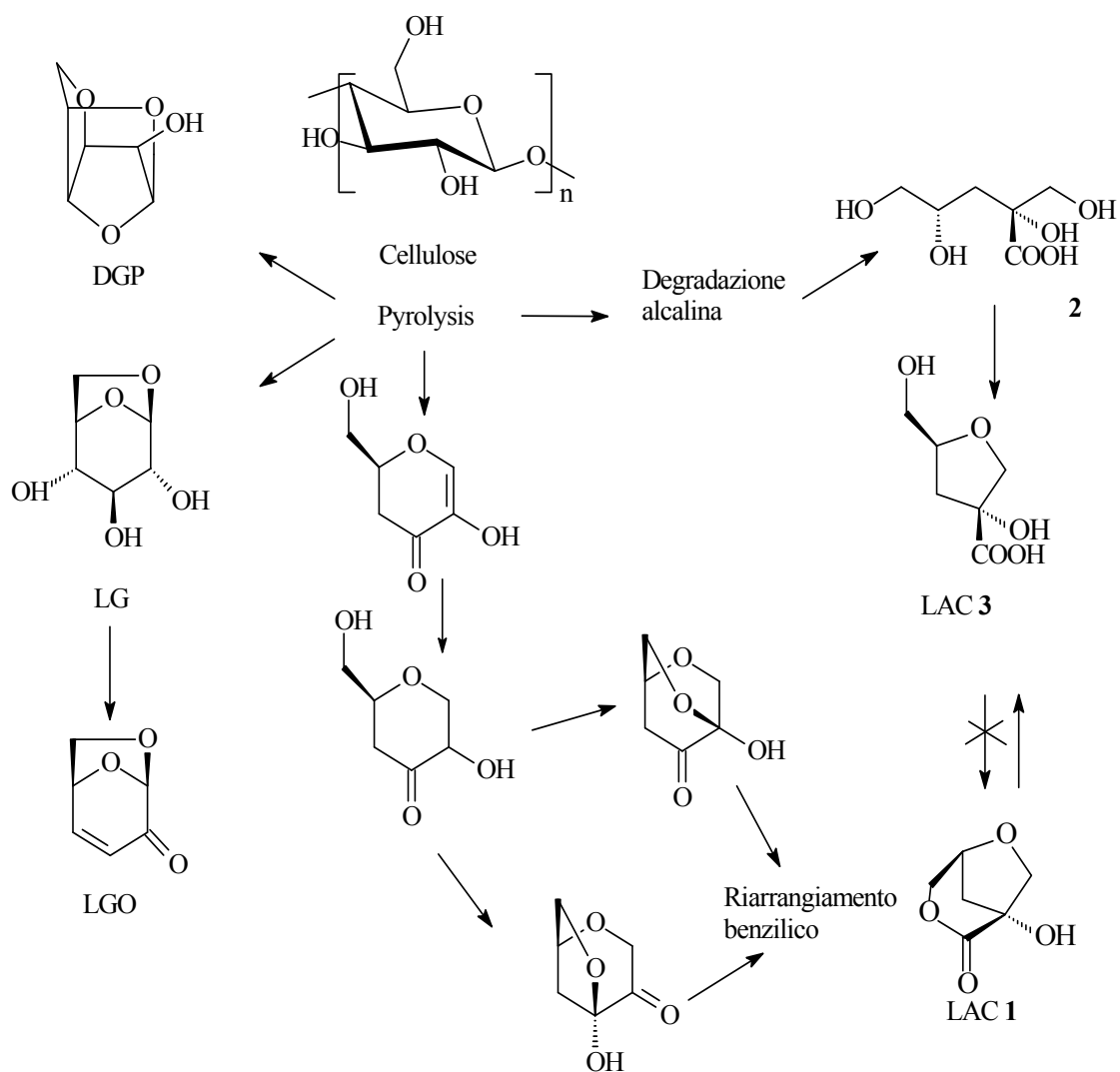
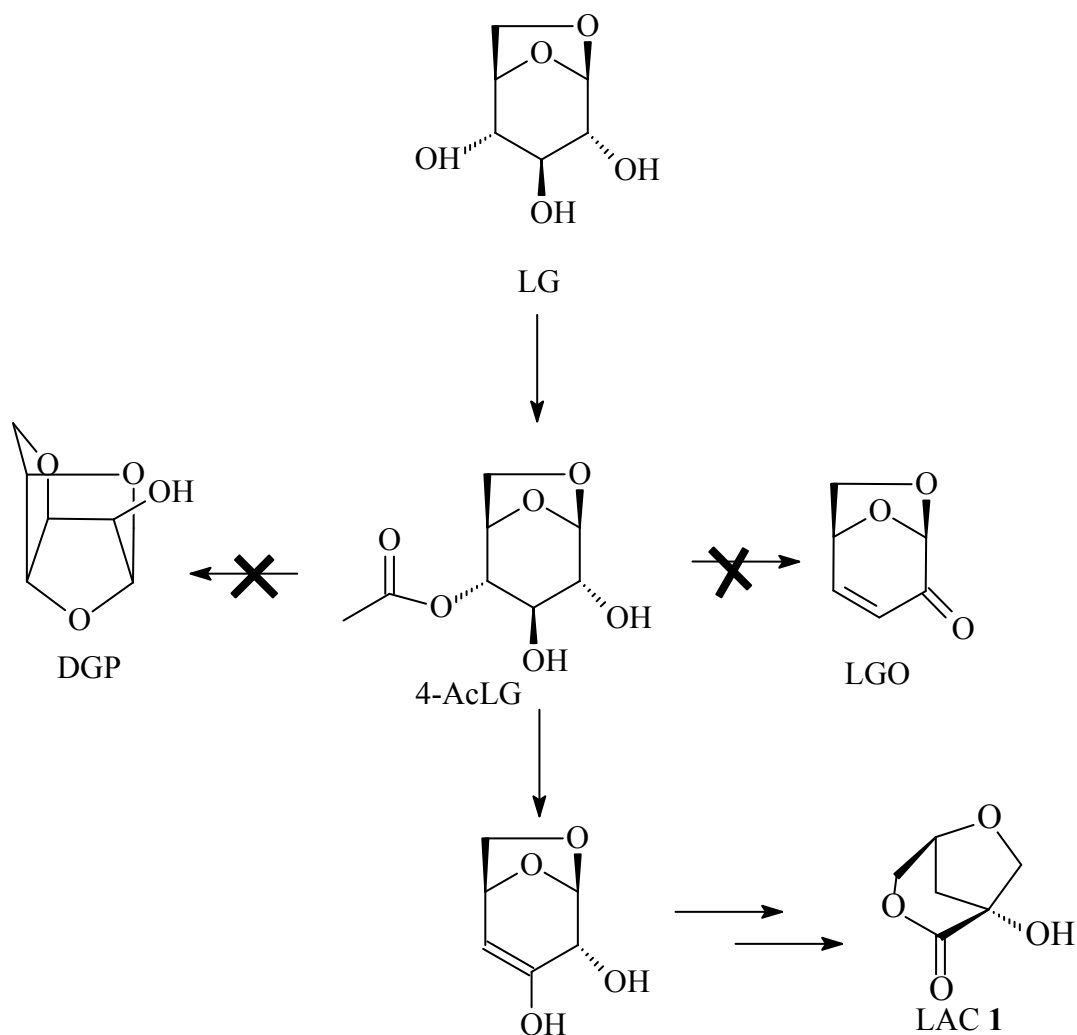


Figura 4.3.1: Principali anidrozuccheri che si formano dalla pirolisi della cellulosa. Formazione di LAC 1 catalizzata da acidi di Lewis secondo il meccanismo proposto da Furneaux et al.⁹ e degradazione alcalina che porta alla formazione dell'idrossiacido 3 passando attraverso l'acido β -D-isosaccarinico 2.

Parallelamente a questa via di sintesi proposta, si può notare che partendo da un altro substrato, il 4-AcLG, ottenibile tramite acetilazione enzimatica selettiva dell'ossidrile in posizione 4 del LG, si può proporre un'altra via di sintesi di LAC, che comprende sempre come precursore l'ascopirone P (Schema 4.3.1), ma che escluderebbe la

formazione di altri anidrozuccheri, quali il DGP. Non produrre il DGP per via pirolitica costituisce un buon passo in avanti nella sintesi di LAC, in quanto costituisce la principale impurezza che comporta lunghi passaggi di purificazione ed impiego di solventi organici volatili e tossici.



Schema 4.3.1: Rappresentazione schematica delle principali vie sintetiche che dal 4-AcLG portano alla presenza dei prodotti indicati in pirolisi catalitica.

Lo studio dei catalizzatori che rappresentano i migliori candidati nella trasformazione termochimica di substrati organici può essere effettuato tramite pirolisi analitica di

miscugli diverse miscele con diverso rapporto substrato/catalizzatore, al fine di individuare il catalizzatore capace di promuovere la sintesi di LAC maggiormente selettiva e con le rese migliori.

Poiché LG è il principale prodotto di pirolisi della cellulosa, abbiamo pensato di investigare una procedura alternativa di sintesi di LAC dalla cellulosa utilizzando LG come intermedio. La procedura è schematizzata in Figura 4.3.2. Seguendo questa linea in questo capitolo vengono analizzati i comportamenti pirolitici di miscele catalizzatore/4-AcLG in pirolisi analitica (Py-GC/MS, pirolisi *online*), al fine di confrontare i prodotti formati e la selettività di sintesi verso LAC.

La cellulosa viene pirolizzata in assenza di catalizzatori; dal bio-olio che si ottiene si separa il LG che trasformato nel 4-AcLG. Nonostante sia stata messa a punto una procedura per ottenere LG in laboratorio, per questa reazione è stato utilizzato del LG commerciale. Infine, il 4-AcLG viene pirolizzato in presenza di un catalizzatore per produrre LAC.

La Figura 4.3.3 mostra un esempio di pirogramma ottenuto dalla pirolisi catalitica del 4-AcLG. Si osserva che gran parte del 4-AcLG volatilizza prima di reagire. I prodotti di reazione principale sono LGO e LAC per eliminazione di acido acetico. Si formano anche prodotti di acetilazione (3,4 e 2,4-diacetile-LG). Il DGP è un prodotto minore e non si osserva HMF. Con diversi catalizzatori si formano due altri composti identificati come gli epossidi del levoglucosano (1,6:3,4-dianidro- β -D-galactopiranosio e 1,6:2,3-dianidro- β -D-mannopiranosio).

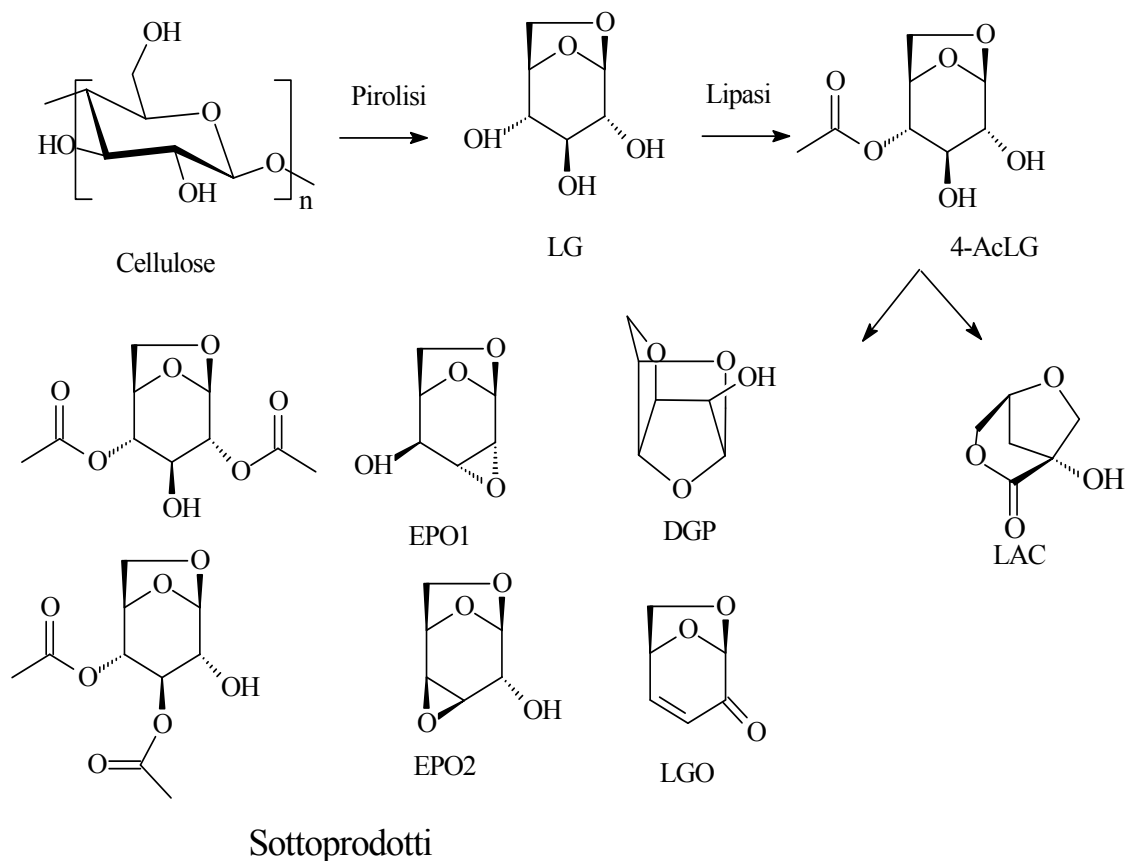


Figura 4.3.2: Sintesi alternativa di LAC a partire da LG.

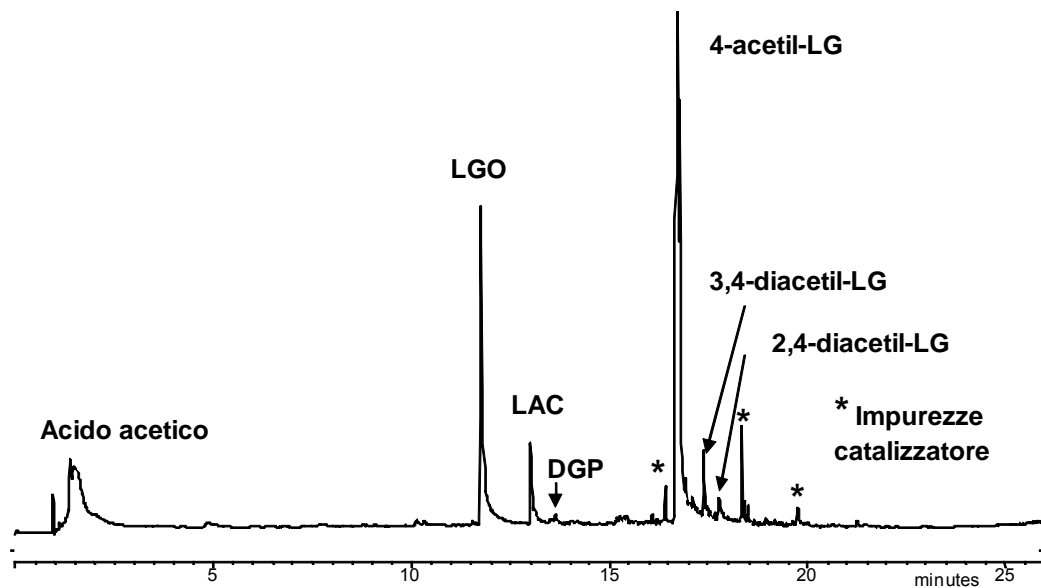


Figura 4.3.3: Pirogramma ottenuto dalla Py-GC/MS di 4-AcLG pirolizzato a 500 °C con il 30% di titanio alluminato nanopolveri. Le strutture dei composti sui picchi GC sono mostrate in Figura 4.3.2.

Il DGP rappresenta la principale impurezza nei campioni di LAC, sempre presente dopo tutti i passaggi di purificazione. In aggiunta questo anidro zucchero isomerico mostra lo stesso comportamento cromatografico di LAC. 4-AcLG ha fornito le maggiori rese di LAC rispetto a quello ottenuto da zuccheri differenti, per la presenza del gruppo acetato come leaving group sul carbonio C-4. Precedenti studi hanno mostrato che le performance dei catalizzatori candidati nella conversione termochimica dei substrati organici possono essere testati in pirolisi analitica¹¹. L'applicazione di questa tecnica a svariati sistemi di 4-AcLG/catalizzatore apre la via all'individuazione di catalizzatori mesoporosi che contengono centri come acidi di Lewis, come solidi capaci di promuovere una formazione maggiormente selettiva di LAC. Per questa ragione abbiamo deciso di testare una serie di catalizzatori mesoporosi drogati con differenti metalli. Una breve lista dei catalizzatori usati è mostrata in Tabella 4.3.1.

Durante la pirolisi online (Py-GC/MS) non catalitica del 4-AcLG l'idrossilattone LAC non è stato identificato. Dal lato opposto la presenza di catalizzatori ha determinato un aumento nella resa del LGO, di LAC e dei derivati acetilati del 4-AcLG (Figura 4.3.3). Superando le considerazioni strutturali dello zucchero precursore, il ruolo giocato dai catalizzatori è determinante nel promuovere la formazione di LAC.

La giusta scelta del catalizzatore è cruciale per una efficace purificazione di LAC. I materiali mesoporosi come Ti-MCM o Zr-MCM hanno dato una bassa ma consistente produzione di epossidi (1,6:3,4-dianidro- β -D-galattopiranosio and 1,6:2,3-dianidro- β -D-mannopiranosio, EPO₁ e EPO₂ in tabella 4.3.1), composti difficilmente separabili da LAC e DGP. Questa tendenza deve essere considerata per un utile impiego di LAC in sintesi di composti che necessitano di un alto grado di purezza, come i polimeri.

Tabella 4.3.1: Abbondanze relative (% area del picco) di acido acetico (AcOH), anidro zuccheri (LG, LAC, DGP) ed epossidi (EPO₁, EPO₂ vedi testo) dalla Py-GC/MS di 4-AcLG in presenza di differenti catalizzatori.

Catalizzatore	AcOH	LGO	LAC	EPO ₁	EPO ₂	DGP
						6.0 ±
MCM-0	24 ± 1	17 ± 2	27 ± 2	2.1 ± 1.1	2.8 ± 1.2	0.5
						2.7 ±
MCM-Sn	1.7 ± 0.7	11 ± 1	21 ± 3	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.3	0.3
						0.5 ±
MCM-Al	33 ± 2	30 ± 2	29 ± 2	-	-	0.1
						3.6 ±
MCM-Mg	15 ± 3	3.3 ± 0.8	5.2 ± 1.4	3.2 ± 0.2	7.6 ± 0.4	1.0
						1.4 ±
MCM-Fe	39 ± 1	21 ± 2	23 ± 1	-	0.7 ± 0.9	0.4
						1.1 ±
MCM-Mo	2.4 ± 0.9	2.2 ± 0.4	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.5	-	0.5
			19.8 ±			5.2 ±
MCM-Zr	20.6 ± 1.1	13.7 ± 0.6	1.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.3	1.4

Media ± S.D. per 3 repliche.

E' stato stabilito che la formazione degli epossidi può essere connessa alla presenza di piccole quantità di ossidi metallici sul catalizzatore me soporoso, effetto che è aumentato per il ripetuto uso del catalizzatore. I materiali me soporosi drogati con metalli trivalenti come l'alluminio ed il ferro (MCM-Al, MCM-Fe) danno differenti rese di LAC, benché l'esposizione di Al (III) e Ti (IV) è difficilmente accessibile. Le relative basse rese di LGO devono essere parzialmente ascritte alla disidratazione del 4-AcLG quando sono in contatto con il catalizzatore, in modo simile a quanto osservato precedentemente quando la cellulose è pirolizzata in presenza di piccolo quantità di

acidi di Lewis (e.g. Fe^{3+} , Zn^{2+}). In aggiunta, l'acidità di Lewis dei composti col titanio e la loro capacità di coordinare i glucopiranosidi è ben conosciuta. Anche le MCM-0 non drogate con metalli ha dato consistenti quantità di LAC in assenza di altri anidro zuccheri come il DGP e gli epossidi, probabilmente a causa dell'alta superficie disponibile per l'assorbimento del reagente sul catalizzatore. Nel suo complesso il sistema deve essere migliorato, considerando la frazione significativa di 4-AcLG non reagita con il catalizzatore (Figura 4.3.5). Questo studio mostra che la pirolisi accoppiata con catalizzatori mesoporosi può essere un valido strumento nella ricerca di sostanze chimiche ottenibili dal trattamento della biomassa.

Quando applicati alla pirolisi della cellulosa, i catalizzatori mesoporosi hanno portato alla produzione di monomeri C6 disidratati con il potenziale di rimpiazzare forti acidi inorganici usati ampiamente fino ad oggi (ad esempio nella produzione del LGO), catalizzatori che possono essere riutilizzati efficacemente. Come altri anidrozuccheri, LAC è un prodotto importante della pirolisi della cellulosa e non è ottenibile da altri processi chimici. Un catalizzatore MCM-41 completamente riciclabile, drogato con bassi quantitativi di elementi tossici come stagno e alluminio potrebbe essere usato al posto di precedenti catalizzatori nano strutturati.

I risultati degli esperimenti mostrano che:

- 1) Tutte le mesofasi esibiscono attività catalitica promuovendo la formazione di LAC e LGO, e deprimendo la produzione di HMF.
- 2) Le mesofasi drogate con metalli sono più attive della mesofase "pura" (Si-MCM-41).

La mesofase Al-MCM-41 è quella caratterizzata dalla maggiore resa di LAC per area superficiale, poiché produce le rese maggiori di LAC, ma presenta l'area superficiale più piccola, probabilmente a causa della disgregazione della struttura dei mesopori quando l'alluminio va a sostituire il silicio (Si). Questa mesofase è stata selezionata per gli esperimenti di pirolisi preparativa con il reattore da banco.

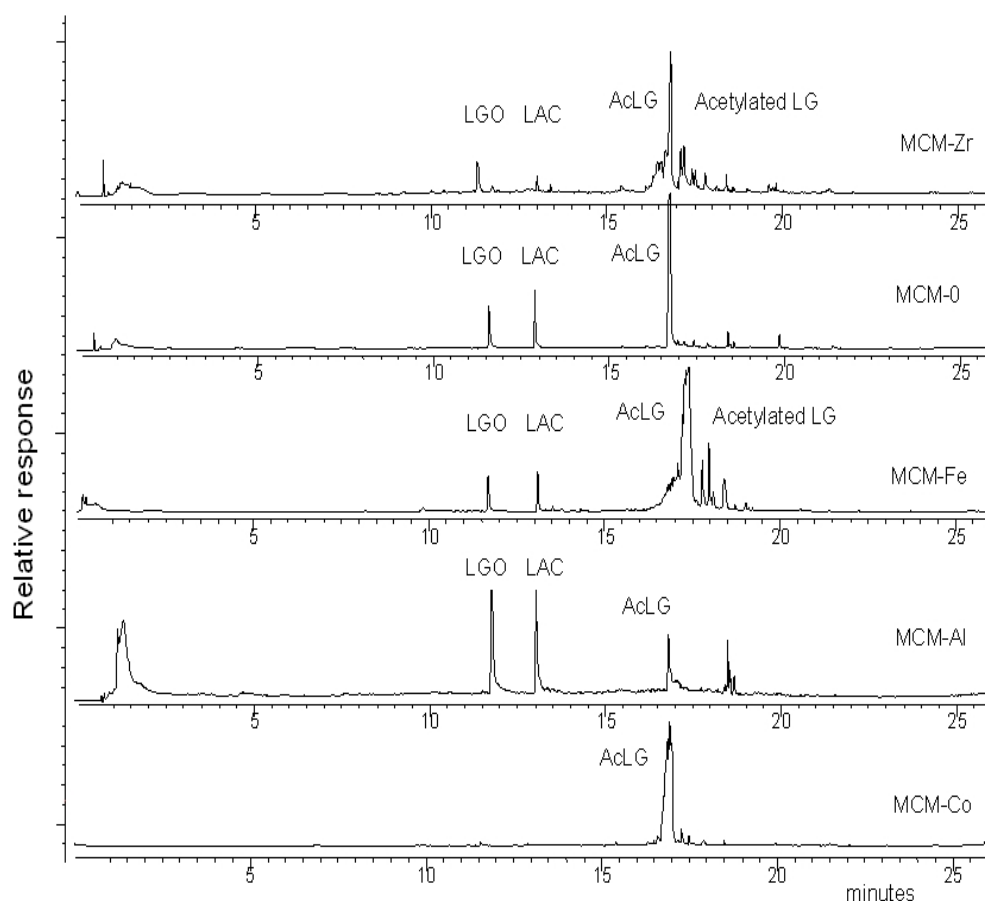


Figura 4.3.5: Esempi di Py-GC/MS ottenuti dalla pirolisi del 4-AcLG in presenza di differenti catalizzatori. Le etichette dei picchi si riferiscono ai composti in Tabella 4.3.1.

Produzione catalitica di LAC in presenza di ILs e microonde

Poiché la produzione di LAC è stata favorita dalla presenza di catalizzatori con acidità di Lewis, si è pensato di valutarne la produzione in presenza di catalizzatori dotati di acidità di Lewis in presenza di variabili quantità di liquidi ionici.

Grazie alla possibilità, per i ILs di essere sintetizzati seguendo le necessità del sistema in cui vengono impiegati, sono stati utilizzati dei liquidi ionici che posseggono essi stessi debole attività catalitica di Lewis. In Tabella 4.3.2 sono indicati i liquidi ionici utilizzati in questo studio ed i catalizzatori testati.

Sono stati utilizzati sia liquidi ionici con attività di Lewis che liquidi ionici che hanno la capacità di solubilizzare i carboidrati e catalizzatori mesoporosi precedentemente testati dotati di acidità di Lewis.

Tabella 4.3.2: Liquidi ionici utilizzati nelle reazioni di sintesi di LAC a partire da 4-AcLG.

substrato	Liquido ionico	catalizzatore
4-AcLG	BMIM N(CN) ₂	
4-AcLG	BMIM Cl	
4-AcLG	PrI OTf	Al MCM
4-AcLG	PrI N(CN) ₂	Al MCM
4-AcLG		Al MCM
4-AcLG	BMIM Cl	Al MCM

Per lo svolgimento delle reazioni si è scelto di utilizzare una apparecchiatura che utilizza le microonde come fonte energetica. Questa tipologia di apparecchiature permettono di svolgere le reazioni con un minore dispendio energetico ed in tempi brevi. Inoltre in microonde si dimostrano particolarmente efficienti quei solventi che sono prevalentemente polari, come acqua ed alcoli, che allo stesso tempo sono anche sostanze ambientalmente compatibili e dotate di bassa tossicità.

In Tabella 4.3.3 sono riassunti i dati delle prove svolte maggiormente promettenti.

E' da notare che vengono confermati i dati che vedono la produzione delle rese maggiori in presenza di catalizzatori o coadiuvanti che posseggono acidità di Lewis.

E' da notare la produzione delle rese maggiori in presenza del liquido ionico 1,metil-1,butil-pirrolidinio triflato (Prl OTf).

Tabella 4.3.3: Rese di LAC a partire da 4-AcLG in presenza di catalizzatori di Lewis e liquidi ionici.

Sistema	4-AcLG(%)	LG (resa%)	LAC (resa%)
BMIM N(CN) ₂	±	4 ± 0,4	2,3 ± 0,6
BMIM Cl 1c	20 ± 1	-	1,5 ± 1
Prl OTf AIMCM	-	5 ± 0,2	4 ± 0,3
Prl OTf AIMCM	-	21 ± 1	9,5 ± 0,8
Prl N(CN) ₂ AIMCM	-	10 ± 1,3	2 ± 0,7
AIMCM	20 ± 2	-	6 ± 0,5

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati nelle reazioni chimiche sono stati impiegati senza ulteriori purificazioni. Cellulosa microgranulare ad alta purezza è stata fornita dalla Sigma Aldrich. Le rese di reazione sono state calcolate sui prodotti dopo purificazione cromatografica. Le Thin Layer Chromatography (TLC) sono state condotte su gel di silice Merck Kieselgel 60 PF254. I solventi usati per le purificazioni sono stati distillati prima dell'uso.

La configurazione del reattore a letto fisso usato per la pirolisi preparativa è simile a quella descritta da Cozzani et al.¹⁴⁴ e mostrata in Figura 4.1.4.1. Il reattore è composto da un tubo di quarzo (lunghezza: 650 mm, diametro interno: 37 mm) piazzato orizzontalmente in una fornace di materiale refrattario (Carbolite, Italia), equipaggiato con una termocoppia, connessa con un raccordo per flusso di azoto ed a valle con una trappola a freddo, un separatore ed un gorgogliatore per intrappolare i composti condensabili. I miscugli (3 g di cellulosa e 3 grammi di catalizzatori) sono stati mescolati uniformemente e piazzati su una lancia ritraibile di quarzo, il flusso è stato calibrato a 1500 cm³ min⁻¹ e la lancia chiusa. Quando la temperatura raggiunge il valore desiderato il campione è stato esposto alla pirolisi per un periodo di 5 minuti, e poi ritratto nella parte più fredda del reattore. Il bio-olio recuperato nella parte fredda del reattore è stato raccolto e poi diluito in aceto nitrile ed analizzato in GC/MS per la quantificazione degli anidrozuccheri. Le rese degli anidro zuccheri (esprese in %) sono state calcolate relativamente al peso della cellulosa.

Pirolisi preparative della cellulose e caratterizzazione del LAC e del LG.

La cellulosa è stata mescolata (10 g) con 10 g di Sn-MCM-41, sintetizzate secondo la procedura riportata¹¹. Quattro batch sono stati pirolizzati a 500 °C per 5 minuti sotto azoto. Il bio-olio (resa circa 50%, contenente circa 8% di **1**) ottenuto è stato intrappolato insieme ai prodotti creati in aceto nitrile. Il prodotto è stato isolato per colonna cromatografica su gel di silice, condotta due volte eluendo con rapporti 9:1 e 8:2 di cicloesano/etilacetato e poi con pentano/diclorometano in gradiente, seguito da

¹⁴⁴ V. Cozzani, C. Nicoletta et al., Ind. Eng. Chem. Res., 1995, 34, 2006-2020.

filtrazione su carboni attivi. La procedura fornisce la molecola 1 con purezza al 99% analizzata per GC e con un recupero del 60% dal bio-olio, con dati strutturali ottenuti per NMR e MS confrontabili con quelli precedentemente riportati⁹.

Il LG è stato ottenuto per pirolisi preparativa, impiegando il reattore precedentemente descritto. In una reazione tipica 10 g di cellulosa sono stati posizionati nella parte centrale del reattore per 5 minuti, poi ritirata superiormente nella parte fredda del reattore. Il bio-olio recuperato nella parte fredda del reattore e nel separatore è stato pesato e dissolto in aceto nitrile. Una aliquota della soluzione in bio-olio è stata ulteriormente diluita con acetonitrile e analizzata in GC/MS per la quantificazione degli anidro zuccheri. La colonna cromatografica su gel di silice eluita con cicloesano/etilacetato ha fornito il LG nella frazione di etilacetato come un solido giallo dopo l'evaporazione del solvente.

Sintesi del 4-O-acetil-1,6-anidro- β -D-glucopiranoside (4-AcLG)

Il 4-AcLG è stato preparato per esterificazione enzimatica seguendo la procedura precedentemente pubblicata¹⁴⁵. In una sintesi tipica, LG (150 mg), vinilacetato (170 mL) e la lipase *Pseudomonas cepacea* supportata su particelle di ceramica (Fluka, 18 mg) e sono stati dispersi in 5 mL di aceto nitrile ed hanno permesso di controllare la reazione in agitazione magnetica a 45-50 °C per 6 giorni. Dopo la centrifugazione il surnatante è stato seccato ed il residuo trattato con diclorometano per dare cristalli

¹⁴⁵ P. Galletti, F. Moretti et al., 2007, Green Chem., 9, 987-991.

bianchi di 4-AcLG con purezza del 95% in GC/MS, definito per analisi del derivato trimetilsilil derivato, usando l'eritrolo meso come standard interno ¹⁴⁶.

Analisi GC/MS

Soluzioni del campione sono state iniettate usando condizioni splittless nell'iniettore e mantenuti a 250 °C in un gas cromatografo Agilent 6850 connesso con uno spettrometro di massa Agilent 5975. Gli analiti sono stati separati con una MDN-5S (Supelco) colonna capillare di silice (fase stazionaria poli(5% difenil/ 95% dimetil)silossano, 30 m, 0.25 mm i. d., 0.25 mm) con la seguente programmata termica: da 50 °C (mantenuti per 10 minuti) a 310 °C (mantenuti per 5 minuti) con gradiente a 10 °C min⁻¹, usando l'elio come gas di trasporto (a temperatura costante, 33 cm s⁻¹ velocità lineare a 200 °C). Gli spettri di massa sono stati registrati in full scan in ionizzazione elettronica (70 eV) con 1 scan s⁻¹ nell'intervallo 50-450 m/z.

Sintesi dei catalizzatori MCM-41

Per la sintesi dei materiali mesoporosi si veda la sezione Materiali e metodi del capitolo 4.1.

¹⁴⁶ D. Fabbri, C. Torri et al., 2007, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 80, 24-29.

Analisi Py-GC/MS

Una aliquota (1 mg) di 4-AcLG è stato mescolato con 1 mg di catalizzatore solido mantenuto nella parte central del reattore di quarzo. Il miscuglio è stato pirolizzato a 700 °C per 10 s al massimo grado usando un CDS 1000 pyroprobe scaldato con un filamento di platino (Chemical Data System, Oxford, USA) connesso direttamente alla porta di iniezione di un gas cromatografo Varian 3400 per mezzo di una interfaccia Py-GC mantenuta a 250 °C. La distribuzione dei composti è stata espressa come percentuale dell'area dei picchi determinata dal cromatogramma e riportata come media (% relativa alla deviazione standard, % RSD) di 3 repliche.

4.4 Un nuovo δ -amminozucchero da LAC

Gli amminoacidi zuccherini (SAAs) vengono derivati dei carboidrati largamente usati come building block e conferiscono la possibilità di imitare le sintesi di svariati composti naturali. Negli anni recenti sono stati utilizzati nello sviluppo di peptidomimetici e glicomimetici^{147 148} con applicazioni anche nella progettazione di farmaci¹⁴⁹. I vantaggi sono collegati alla loro alta densità di gruppi funzionali e ad una ben definita stereochimica, rendendoli dei buoni sintoni chirali capaci di incorporare sostituenti molecolari sia idrofobici che idrofilici. Un esempio è rappresentato dal potenziale di creare delle librerie di composti ammidici tramite studi combinatoriali al fine di imitare la struttura delle biomolecole¹⁵⁰. In aggiunta, l'incorporazione in una zona specifica di sequenze peptidiche può indurre un cambio conformazionale responsabile di specifiche posizioni o di un particolare ripiegamento nei peptidi¹⁵¹. Le strutture di amino zuccheri includono variazioni relative alla posizione dei gruppi amminici e carbossilici (α , β) e sull'ossigeno dell'eterociclo (creando anelli ossianici, ossetanici, di tetraidrofurani e tetraidropirani)¹⁵². In particolare i δ -SAAs sono isosteri di legami peptidici facilmente scindibili¹⁵³, e per questa ragione sono stati indagati nella progettazione di peptidi verso la proteolisi enzimatica rispetto ai peptidi naturali.

¹⁴⁷ Schweizer F, 2002 *Angew Chem Int. ed.* 41: 230-253.

¹⁴⁸ Chakraborty TK, Srinivasu P, Tapadar S, Mohan BK, 2004, *J Chem Sci* 116: 187-207.

¹⁴⁹ Gruner S A W, Locardi E, Lohof E, Kessler H, 2002, *Chem Rev* 102: 491-514.

¹⁵⁰ Edwards AA, Ichihara O, Murfin S, Wilkes R, Whittaker M, Watkin DJ, Fleet GWJ, 2004, *J Comb Chem* 6: 230-238.

¹⁵¹ Lohof E, Planker E, Mang C, Burkhardt F, Dechantsreiter M A, Haubner R, Wester H J, Schwaiger M, Hölzemann G, Goodman S L, Kessler H 2000, *Angew Chem, Int Ed* 39: 2761-2764.

¹⁵² Risseuw M DP, Overhand M, Fleet GWJ, Simone M I 2007 *Tetrahedron Asymm*, 18, 2001-2010.

¹⁵³ Trabocchi A., Menchi G., Danieli E., Guarna A., 2008, *Amino Acids*, 35, 37-44.

Inoltre, la serie di δ -tetraidrofurani è caratterizzata da una relative rigidità strutturale che creano arrangiamenti molecolari che rendono i SSAs interessanti candidati come elementi nella sintesi di peptidomimetici ^{154 155}. Molti di questi composti consistono di catene lineari di atomi di carbonio in accordo con la loro origine di carboidrati semplici ²⁶. Partendo dalla struttura semplice di un ribonolattone ottenibile dal D-ribosio, il metil(3R,4R,5S)-5-azidometil 3,4-diidrossi-tetraidrofuran-3-carbossilato (**1**, Figura 4.4.1) ed il corrispondente epimero in posizione 5 sono stati sintetizzati come i primi scaffold di δ -SAA contenenti una catena di carbonio ramificata. La sequenza include una serie di step sintetici, tra i quali la riduzione a lattone, una funzione chimica richiesta al fine di inserire la ramificazione attraverso una reazione di condensazione aldolica con la formaldeide. Il lattone è stato creato con successo attraverso l'ossidazione, seguita dalla ciclizzazione del ribonolattone derivato dall'anello tetraidrofuranosico ²⁹.

Precedentemente gli stessi autori hanno riportato che l'azido estere **1** non si è rivelato un buon substrato per ottenere l'amminoacido metilestere **2** (Figura 4.4.1) tramite idrogenazione catalitica con palladio, a causa della spontanea ciclizzazione a lattame biciclico ¹⁵⁶.

¹⁵⁴ Smith MD, Claridge TDW, Tranter GE, Sanson MSP, Fleet GWJ 1998, 2041- 2042.

¹⁵⁵ Simone M I, Edwards AA, Tranter GE, Fleet GWJ 2008 Tetrahedron Asymm 19: 2887-2894.

¹⁵⁶ Simone M I, Soengas R, Newton C R, Watkin D J, Fleet G W J 2005 Tetrahedron Lett 46: 5761-5765.

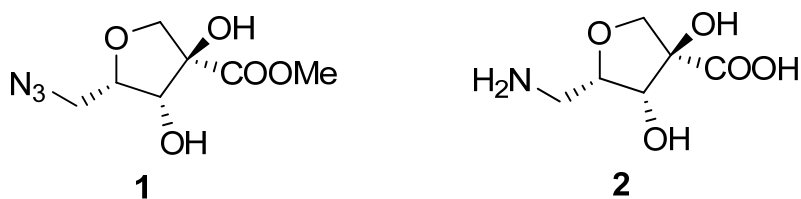


Figura 4.4.1: Struttura dell'azido estere **1** come intermedio dell'SAA tetraidrofurano δ -ramificato**2**.

In questo studio un lattone biciclico, ottenibile in quantitativi di grammi dalla pirolisi catalitica della cellulosa, è stato utilizzato come building block chirale nella sintesi di un δ -amminoacido zuccherino attraverso una via sintetica costituita da 5 step intermedi con una resa complessiva del 76%.

Il lavoro svolto è stato condotto in collaborazione con la professoressa Ines Mancini ed Andrea Defant del dipartimento di chimica bio-organica dell'Università di Trento.

Il trattamento della biomassa include la conversione di biocarburanti capaci di conciliare la richiesta energetica sotto investigazione come un'alternativa alle fonti fossili che permettano un rispetto dell'ambiente, ma anche capaci di fornire prodotti chimici, che includono building blocks che possono essere impiegati nella sintesi di composti utili.

La cellulosa, un polisaccaride proveniente da molte fonti vegetali, è la sostanza maggiormente abbondante sulla superficie terrestre, e quindi rappresenta una fonte chiave. La rilevanza e l'interesse per questo processo è collegata all'utilizzo di energia da fonti rinnovabili, dovuto all'impiego di cellulose pura ed al recupero di materiali cellulosici (ad esempio il legno). La cellulosa può essere convertita in una vasta serie di

prodotti attraverso molti processi chimici e tra questi la pirolisi, che consiste in una degradazione chimica in condizioni non ossidative che porta ad un prodotto liquido (bio-olio). Il bio-olio contiene composti a basso peso molecolare, inclusi molti composti zuccherini polifunzionalizzati denominati genericamente anidrozuccheri, che mantengono nella struttura delle funzionalità a composizione enantiomerica pura, che sono responsabili del loro impiego come building block chirali.

L'idrossilattone **3** (Figura 4.4.2), nella nomenclatura IUPAC (1R,5S)-1-idrossi-3,6-dioxa-biciclo[3.2.1]ottan-2-one, LAC, è un anidrozucchero isolato per la prima volta in quantità dell'ordine dei milligrammi dalla pirolisi catalitica in presenza di acidi di Lewis ¹⁵⁷. Come indicato nei precedenti capitoli, una serie di materiali mesoporosi drogati con differenti metalli di transizione è stata analizzata al fine di massimizzare la resa di LAC, e questo è stato possibile con dei catalizzatori mesoporosi Sn-MCM-41 ¹⁵⁸. Recentemente ad esempio è stato ottenuto un'amide dal composto **3** tramite l'utilizzo di sintesi che impiegano microonde ¹¹, e successivamente LAC è stato impiegato come monomero nella sintesi di poliesteri attraverso una ring-opening polymerisation con L-lattide ¹⁵⁹.

In questo capitolo viene riportato un modo semplice per la sintesi dell'aminoacido **4** (Figura 4.4.2), che presenta i sostituenti metilamminico e carbossilico nelle posizioni 4 e 2 dell'anello tetraidrofuranico con una configurazione relativa *cis*. La

¹⁵⁷ Furneaux RH, Mason JM, Miller I J 1988 J Chem Soc Perkin I 49-51.

¹⁵⁸ Torri C, Lesci I G, Fabbri D 2009b J Anal Appl Pyrol 85: 192-196.

¹⁵⁹ Dobrzynski P, Fabbri D, Torri C, Kasperczyk J, Kaczmarczyk B, Pastusiak M 2009 J Polymer Sci A 47: 247-257.

sintesi impiega la sostanza **3** come reagente chirale, il che sorpassa la necessità della presenza di step sintetici di ossidazione/riduzione nella porzione lattonica.

Questa procedura rappresenta il primo metodo sintetico per la formazione del composto tetraidrofuranico SAA contenente una struttura carboniosa ramificata in forma libera, dopo l'ottenimento del primo δ -SAA ramificato derivato dal D-ribosio ²⁹.

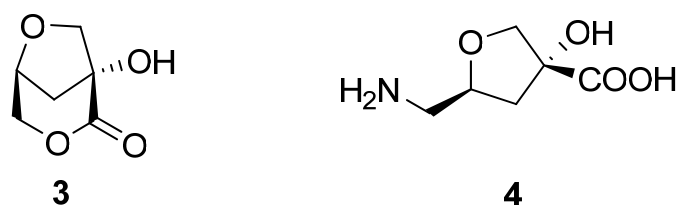


Figura 4.4.2: Struttura del prodotto **3** dalla pirolisi della cellulosa, usato come building block chirale per la sintesi di nuovi aminoacidi zuccherini δ -tetraidrofuranosi **4**.

Sintesi dell'aminoacido 4

L'idrossilattone **3**, ottenuto qui attraverso una procedura sperimentale leggermente modificata che comprende l'utilizzo di MCM-41 drogate con Sn (vedi materiali e metodi), è stato convertito nell'aminoacido **4** secondo la sequenza mostrata nello schema 4.4.1. Tutti i prodotti sono stati purificati con cromatografia su gel di silice e caratterizzati strutturalmente (vedi materiali e metodi).

In dettaglio, il sostituente lattonico del composto **3** può essere facilmente aperto al suo derivato metilestere **5** attraverso trattamento con trietilammina in metanolo temperatura ambiente per 12 ore. Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 95% e caratterizzato

con tecniche ^1H - and ^{13}C -NMR, ed i dati si sono dimostrati confrontabili con quelli riportati precedentemente ^{9 11}. Il valore di purezza ottica (vedi parte sperimentale) è in accordo con quello riportato in letteratura, confermando la stereochimica (3R, 5S). Tramite la conversione del gruppo ossidrilico primario con 1.2 equivalenti di p-toluensolfonilcloruro in piridina, ottenuta agitando la soluzione a temperature ambiente per tutta una notte, è stato ottenuto il tosilato **6** con una resa dell'88 %.

L'OH-3 non hanno richiesto step di protezione/deprotezione, ma è da notare che un eccesso del tosilcloruro è stato capace di produrre anche il derivato ditosilato attraverso la conversione della funzione ossidrilica terziaria. L'intermedio azidico **7** è stato ottenuto per sostituzione nucleofila del tosilato **6** con sodio azide in un sistema eterogeneo contenente metil-triottil ammonio cloruro (Aliquat[®] 336). Benché l'utilizzo di questo catalizzatore sia generalmente riportata in acqua ¹⁶⁰, nel nostro caso l'acetonitrile si è mostrato un solvente promettente dando una resa del 85%, mentre in acqua è stata osservata una parziale idrolisi del gruppo tosilato. D'altra parte la sintesi standard ha coinvolto l'utilizzo di sodio azide in dimetilformammide (DMF) come solvente, applicata al tosilato **6** ha fornito una resa molto bassa dell'azide **7**, dovuto al difficile isolamento del prodotto solubile in acqua. La conversione dell'azido estere nell'aminoacido **4** comprende un primo step di idrolisi tramite idrossido di sodio in tetraidrofurano (THF) a temperatura ambiente per 3 ore fornendo l'azido acido puro **8** in rese quantitative, che successivamente è stato sottoposto ad idrogenazione catalitica in Pd/C in etanolo per 3 ore con una resa del 95%. D'altro canto, la riduzione diretta della funzione amminica ad azido nel composto **7** non ha funzionato, ma la ciclizzazione del

¹⁶⁰ Balo C., Blanco J.M., Fernández F., Lens E., López C. 1998 Tetrahedron 54: 2833-2842.

lattame **9** è avvenuta, in linea con il composto **1**, dando il corrispondente lattame ³⁰, la cui struttura è stata confermata attraverso analisi ai raggi X ¹⁶¹.

L'aminoacido è stato isolato in forma protonata, a causa delle condizioni acide presenti nella lavorazione dell'azide carbossilato quando è stato sottoposto a filtrazione su resina cationica prima della riduzione attraverso Pd/C. Spettri di massa all'elettrospray (ESI) hanno mostrato il segnale con rapporto m/z 162 corrispondente allo ione molecolare in forma protonata, e gli esperimenti di frammentazione di questa massa hanno dato segnali per la perdita di ammoniaca, acqua, biossido di carbonio e acido formico. Misure in alta risoluzione attraverso (MALDI)-MS hanno confermato la struttura molecolare di composizione C₆H₁₂NO₄. Gli spettri ¹H- and ¹³CNMR registrati in D₂O hanno permesso di assegnare la struttura completa, supportata da etero correlazioni HSQC e HMBC. Attraverso spettroscopia all'infrarosso ATR (Attenuated Transmitted Reflection) la configurazione su un campione solido ha fornito un forte picco a 1716 cm⁻¹ attribuibile allo stretching del gruppo CO nell'unità carbossilica, così come un'ampia banda ed un forte segnale incentrato a 2910 cm⁻¹ dovuto agli stretching CH e OH. I gruppi OH sono probabilmente coinvolti in legami a idrogeno inter e intramolecolari come suggerito dall'allargamento delle bande e dalla diminuzione nelle lunghezze d'onda se confrontate con i gruppi liberi. Diversamente, nella struttura dell'aminoacido **4**, o nella sua forma protonata, il numero di legami a idrogeno donatore/accettore è maggiore che non nell'idrossilattone **3**, il cui gruppo OH è coinvolto in legami a idrogeno intramolecolari con il gruppo carbonilico vicinale, come

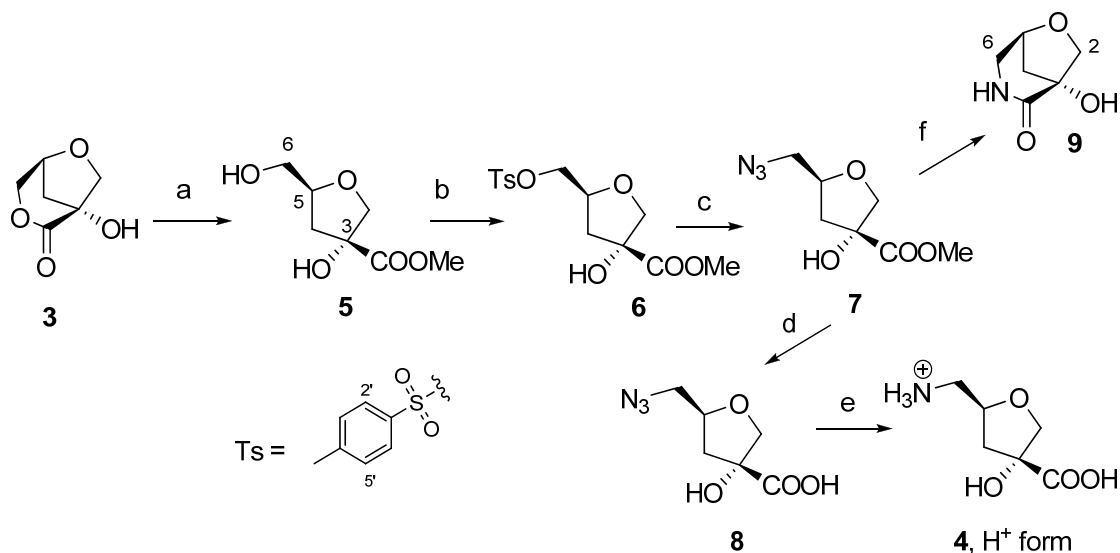
¹⁶¹ Punzo F, Watkin D.J., Simone M.I., Fleet, G.W.J. 2004 Acta Cryst E60: 2315-2317.

confermato da analisi spettroscopica FT-IR allo stato solido e in soluzione ³³. La purezza enantiomerica del composto **4** è basata sull'impiego dell'idrossilattone **3** come building block esistente nelle forme enantiomericamente pure dovute alla sua naturale origine dalla cellulosa, combinazione di una serie di sequenze di reazione che non modificano i centri asimmetrici. Queste osservazioni sono in linea con l'attività ottica mostrata dall'aminoacido finale **4**, così come da ogni intermedio di sintesi. Un ulteriore supporto arriva dallo studio dei chimici shift chirali, dove lo spettro dell'azido estere **7** è stato investigato in presenza di europio trifluoridrossimetilen-*d*-canofrato, Eu(tfc)₃. La scelta del prodotto **7** è imposta dalla sua solubilità in CDCl₃ e dalla presenza di un ben rilevabile segnale di singoletto in H-NMR (il gruppo COOMe) da monitorare tramite l'aggiunta di quantità crescenti di un complesso di Europio (Eu). D'altra parte il composto Eu(tfc)₃ è stato selezionato come reagente chirale per la sua capacità di complessarsi con metilesteri terziari α -idrossilici ¹⁶². Nessuno splitting è stato osservato per il singoletto COOMe, neppure per gli altri segnali, e questi risultati indicano la mancanza di complessi diastereoisomerici e confermano la purezza enantiomerica del composto; sono stati osservati degli shift per tutti i protoni. Il maggiore shift è stato osservato per l'idrogeno della funzionalità OH, fornendo indicazioni sul tipo di chelazione con il gruppo funzionale, mentre uno shift pronunciato è stato osservato anche per l'H 5 che sta dalla stessa parte del piano con l'OH, confermando la posizione relativa syn.

¹⁶² Fraser R R, 1983 In Morrison J D ed 9 Asymmetric Synthesis vol.1 Analytical methods, Academic Press, New York, 173-194.

Aminoacido zuccherino 4 come H-Gly-Al-OH

E' stato riportato che i δ -amminoacidi sono capaci di influenzare la struttura dei peptidi in cui sono coinvolti ¹⁶³. L'aminoacido **4** è confrontabile con il dipeptide *H-Gly-Ala-OH*, con la peculiarità di assumere una conformazione ristretta dovuta alla presenza dell'anello tetraidrofuranico, derivato dalla chiusura tra l'atomo di ossigeno del legame peptidico ed il gruppo metile del residuo dell'alanina. In particolare, l'aminoacido 2,5 *cis*-tetraidrofuranosico ha fornito dei building block per il peptide, le cui strutture a β -foglietto dovute ai legami a idrogeno, come predetto dai calcoli in fase gassosa ¹⁶⁴.



Schema 4.4.1: Numerazione arbitraria. Reagenti di reazione e condizioni **a** MeOH/Et₃N (2.5eq), r.t., 12 h, 95%; **b** TsCl (1.2 eq) / Py, r.t., per tutta la notte, 88%; **c** NaN₃ (1.5 eq)/ Aliquat[®] 336 (0.1 eq), CH₃CN, refluxo 17 h, 85%; **d** 0.5M aq. NaOH (1 eq), THF, r.t., 3 h, 99%; **e** H₂, p=1 atm, Pd/C 10%; EtOH, , 3 h, 95%; **f** H₂, p=1 atm, Pd/C 10%; EtOH, , 1 h, 73%.

¹⁶³ Edwards AA, Fleet GWJ, Tranter GE 2006 Chirality 18:265-272.

¹⁶⁴ Jockusch RA, Talbot FO, Rogers PS, Simone MI, Fleet GWJ, Simons JP 2006 J Am Chem Soc 128: 16771-16777.

Utilizzando studi di teoria di densità funzionale (DFT) con il modello PCM (vedi materiali e metodi), i conformeri maggiormente stabili sono stati calcolati in acqua per simulare l'effetto di solvatazione ¹⁶⁵. A queste condizioni, il confronto delle strutture ad energie minimizzate sono state fatte per il dipeptide *H-Gly-Ala-OH* e per il composto **4** (Figura 4.4.3). Fleet e coautori per esempio hanno mostrato che degli oligomeri abbastanza corti degli isosteri del dipeptide tetraidrofuranosico derivati dai carboidrati adottano conformazioni regolari in soluzione, fenomeno dovuto alla stabilizzazione dei legami a idrogeno ¹⁶⁶.

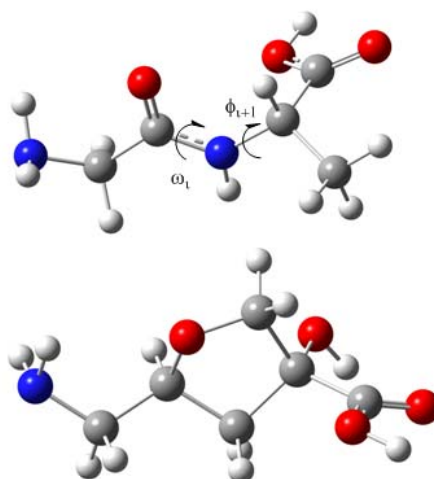


Figura 4.4.3: Struttura ottimizzata energeticamente DFT-B3LYP 6-31g (d) calcolata in acqua del dipeptide Gly-Ala, con indicazione degli angoli di torsione (sopra), e dell'amminoacido **4** (sotto).

¹⁶⁵ Iwaoka M, Okada M, Tomoda S 2002 J Mol Struct Theochem 586:111-124.

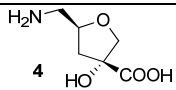
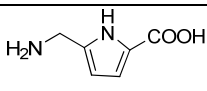
¹⁶⁶ Smith MD, Fleet GWJ 1999 J. Peptide Sci 5: 425-441.

Al fine di considerare l'effetto dato dal composto **4** come rimpiazzo per il residuo di *Gly-Ala* nella sequenza peptidica, sono stati considerati i valori dei corrispondenti angoli diedri per le rotazioni intorno al legame OC-N (angolo ω_i) e intorno al legame N-COO nel residuo aminoacidico (angolo Φ_{i+1}) come riportato in Figura 4.4.3. Nel dettaglio, gli angoli torsionali sono stati valutati attraverso le strutture ad energie minimizzate del composto **4** e del dipeptide *H-Gly-Ala-OH* attraverso calcoli DFT in acqua. Una tendenza inversa è stata ottenuta (Tabella 4.4.1), così da indurre un probabile cambiamento nella conformazione del peptide con **4** che rimpiazza l'unità *Gly-Ala*. L'amminoacido pirrolico **5** è stato progettato e riportato come un surrogato del gruppo *Gly-Ala* in studi di peptidomimetici¹⁶⁷. Da una simile valutazione sull' α -amminoacido sono stati ottenuti gli angoli diedri riportati in Tabella 4.4.1, mostrando una aggiuntiva e differente combinazione dei valori, probabilmente dovuta alla presenza di una struttura planare.

L'idrossilattone chirale **3**, ottenibile su scala di grammi dalla pirolisi della cellulose in presenza di materiali mesoporosi MCM-41 drogati con stagno (Sn), è stato utilizzato per la sintesi di un nuovo amminoacido zuccherino **4**, ottenuto attraverso una efficiente via di sintesi composta da 5 stadi successivi con una resa totale del 67%. Ogni step è stato ottimizzato per i nostri substrati, come nella produzione dell'azido estere **7**, dove l'utilizzo dell'acetonitrile al posto dell'acqua ha resa la lavorazione dei prodotti più facile ed ha portato ad un miglioramento nel recupero del prodotto.

¹⁶⁷ Chakraborty TK, Mohan BK, Kumar SK, Kunwar AC 2002, Tetrahedron Lett. 43: 2589-2592.

Tabella 4.4.1. Angoli torsionali per strutture ad energia minimizzata dell'amminoacido **4**, H-Gly-Ala-OH e l'acido 5-(amminoetil)pirrolo-2-carbossilico(**5**) tramite calcoli DFT-B3LYP 6-31g(d) in acqua.

Composto	ω_i	Φ_{i+1}
<i>H-Gly-Ala-OH</i>	+173	-98
 4	-157	+145
 5	+178	+179

L'amminoacido **4** è il primo δ -tetraidrofurano a struttura ramificata ottenuto in forma libera (e isolato come forma protonata), dopo il precedente report descritto come azido metilestere **1**. La struttura del composto **4** nella sua forma protonata è stata caratterizzata tramite analisi NMR, includendo esperimenti che hanno confermato la purezza enantiomerica e misure di spettrometria di massa con ESI-MS e MALDI-TOF/TOF.

L'amminoacido qui riportato si pensa sia utilizzabile come monomero nella sintesi di peptidi così come nella sintesi di building block chirali per ottenere peptidomimetici conformazionalmente costretti. Questa molecola rappresenta l'isoestere del dipeptide *Gly-Ala*, con la peculiarità di poter assumere una conformazione ristretta. Al fine di valutare la peculiarità del composto **4**, calcoli DFT sono stati condotti ed i valori degli

angoli torsionali sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite calcolo per il dipeptide *H-Gly-Ala-OH* e l'aminoacido pirrolico **5**. Studi relativi alla caratterizzazione di questi composti sono sotto esame.

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati nelle reazioni chimiche sono stati usati senza ulteriori purificazioni. La cellulosa microgranulare ad alta purezza è stata fornita dalla Aldrich. Le rese di reazione sono state calcolate sui prodotti dopo purificazione cromatografica. Le Thin Layer Chromatography (TLC) sono state condotte su gel di silice Merck Kieselgel 60 PF254. I solventi usati per le purificazioni sono stati distillati prima dell'uso. Le mesofasi MCM-41 drogate con stagno (Sn-MCM-41) sono state preparate come descritto precedentemente³². Tutte le evaporazioni sono state condotte al rotavapor a temperatura ambiente. Le rese di reazione sono state calcolate sui prodotti dopo purificazione cromatografica. Gli spettri infrarossi sono stati registrati usando uno spettrometro FT-IR Tensor 27 Bruker (Attenuated Transmitter Reflection, configurazione ATR) con una risoluzione a 1 cm^{-1} nella regione di assorbimento $4000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. Uno strato sottile è stato ottenuto per evaporazione della soluzione di metanolo dal campione. Lo strumento è stato esposto ad un flusso costante di aria ed a un cristallo ATR pulito. Il trattamento degli spettri è stato condotto usando un pacchetto software Opus. I punti di fusione sono stati determinati tramite un microscopio Reichert Thermovapor. I dati polarimetrici sono stati ottenuti con un apparato Bellingham &

Stanley Limited ADP 440, riportando $[\alpha]_D$ in dm^{-1} grado ml g^{-1} . Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Bruker-Avance 400 usando una sonda BBI da 5 mm; gli spettri sono stati acquisiti a 400 MHz per i protoni e per il ^{13}C a 100 MHz in CDCl_3 , i valori di chimica shift δ sono espressi in ppm, rispetto ai segnali residui del CDCl_3 a $\delta_{\text{H}} = 7.25$ e $\delta_{\text{C}} = 77.00$ ppm, o in D_2O relativamente a $\delta_{\text{H}} = 4.70$, le J sono espresse in Hz.

Gli spettri in ionizzazione elettrospray (ESI-MS) sono stati acquisiti con un Bruker Esquire-LC e con una fonte elettrospray a fonte ionica: temperatura della fonte $300\text{ }^\circ\text{C}$, gas nebulizzante N_2 , 4 l/min, metodo ionico positivo, ISV 4 kV, OV 38.3 V, intervallo di scansione 100–1000 m/z . Misure matrix assisted laser desorption ionization –time of flight (MALDI-TOF) sono state condotte su uno spettrometro di massa Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF-TOF equipaggiato con una unità a riflessione. Il voltaggio di accelerazione è stato settato a 20 kV. Per il desorbimento dei componenti, un fascio laser a $\lambda = 337\text{ nm}$ è stato concentrato sul sistema. Dopo la cristallizzazione in condizioni ambiente.

I calcoli di quantomeccanici sono stati condotti su un computer Pentium IV/3.6 GHz utilizzando il programma Gaussian 03W versione E.01¹⁶⁸. Sono stati condotti studi DFT, applicando l'ottimizzazione della geometria in acqua usando un Polarized Continuum Model (PCM) ed utilizzando l'ottimizzazione del gradiente di geometria. Il set base delle scelte è risultato in un 6-31 G (d) per tutti gli atomi. Il gradiente corretto

¹⁶⁸ Frisch M J 2004 Gaussian, revision E.01 Inc Wallingford CT.

con calcoli DFT con una funzione a 3 parametri ibrida (B3)¹⁶⁹ per la parte di scambio e la funzione di correlazione di Lee–Yang–Parr (LYP)¹⁷⁰.

Produzione di (1R,5S)-1-idrossi-3,6-dioxa-biciclo[3.2.1]ottan-2-one 3 dalla cellulosa

La cellulosa (10 g) è stata mescolata con 10 g di catalizzatori mesoporosi (Sn-MCM-41), sintetizzati come riportato precedentemente³². Quattro batch sono stati pirolizzati a 500 °C per 5 minuti sotto azoto. Il bio-olio (circa 50% di resa, contenente il 12 % del composto **3**) è stato ottenuto intrappolando i prodotti creati con una trappola in acetonitrile a freddo. Tramite cromatografia su gel di silice con eluizione 9:1 in cicloesano/acetato di etile e poi pentano/diclorometano, seguita da distillazione sotto vuoto e filtrazione su carboni attivi, così da fornire il composto **3** con una purezza del 99% analizzata in GC ed un recupero dal bio-olio del 65%, mostrando dati NMR confrontabili con quelli presenti in letteratura¹¹.

(3R,5S)-Metil 3-idrossi-5-(idrossimetil)tetraidrofuran-3-carbossilato 5

Ad una soluzione del composto **3** (288 mg , 2.0 mmol) in metanolo anidro (5 ml) è stata aggiunta trietilammina (0.28 ml, 2.0 mmol). Il misto di reazione risultante è stato agitato per 12 ore a temperatura ambiente. Dopo l'evaporazione del solvente sotto

¹⁶⁹ Becke A D 1993, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. J. Chem. Phys. 98: 5648-5652.

¹⁷⁰ Lee C, Yang W, Parr R G 1988 Phys Rev B 37: 785-789.

vuoto, il residuo è stato soggetto a cromatografia su gel di silice con eluizione in gradiente di diclorometano/metanolo, per dare l'estere **5** come olio viscoso (334 mg, 95%).

$[\alpha]_D^{20} = +10.2^\circ$ (c 0.5 in MeOH). L'attività ottica, i dati NMR e MS sono in accordo con quelli pubblicati precedentemente ^{9 11}.

(3R,5S)-Metil 3-idrossi-5-(tosilmetil)tetraidrofuran-3-carbossilato 6

Ad una soluzione del composto **5** (334 mg, 1.90 mmol) in 3 mL di piridina anidra a 0 °C sono stati aggiunti lentamente una soluzione di tosil cloruro (400 mg, 2.1 mmol) in piridina anidra (2 ml). La soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 18 ore e poi spenta in un beaker contenente ghiaccio, il miscuglio è stato ripartito tra acqua e diclorometano, le fasi organiche sono state separate (x 3), le fasi sono state combinate e lavate in sequenza con una soluzione 0.5 M di HCl, una soluzione satura di NaHCO₃ in acqua, seccato su Na₂SO₄ e concentrato sotto vuoto. Il residuo è stato soggetto a cromatografia flash su gel di silice con rapporto esano/AcOEt in gradiente, per dare il tosilato **5** come olio giallo viscoso (552 mg, 88%).

$[\alpha]_D^{20} = +19.7$ (c 0.04, CH₂Cl₂). ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.80 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2' and H-6'), 7.33 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3' and H-5'), 4.39 (1H, m, H-5), 4.15 (1H, dd, J = 10.6, 3.8 Hz, H-6), 4.10 (1H, dd, J = 10.6, 4.8 Hz, H-6), 4.09 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-2), 3.81 (3H, s, OMe), 3.77 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-2), 3.38 (1H, br.s, OH), 2.44 (3H, s, Me-4'), 2.23 (1H, dd, J = 12.8, 9.9 Hz, H-4), 2.09 (1H, dd, J = 12.8, 6.0 Hz, H-4). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 174.3 (COO), 146.7 (C-1'), 144.9 (C-4'), 129.8 (C-3' e C-5'), 127.9 (C-2')

e C-4'), 81.0 (C-3), 78.2 (C-5), 76.6 (C-2), 70.1 (C-6), 53.4 (OMe), 41.5 (C-4), 21.6 (q, Me-4'). Significantive correlazioni HMBC: δ 7.80 ppm (H-2' e H-6') con C-1'; 7.33 (H-3' and H-5') con Me-4'; 4.15 (H-6) con C-4, 4.09 (H-2) con COO, 3.81 (OMe) con C-3 e COO, 3.77 (H-2) con COO, 2.09 (H-4) con C-3 e C-5. ESIMS (modo positivo): m/z 353 ($[M+Na]^+$), 331 ($[M+H]^+$); ESI-MS/MS (331): 159($[M+H-TsO]^+$).

(3R,5S)-Metil 5-(azidometil)-3-idrossitetraidrofuran-3-carbossilato 7

Un misto del tosilato **6** (552 mg, 1.67 mmol), sodio azide (163 mg, 2.5 mmol) e aliquat 336 (101 mg, 0.25 mmol) in acetonitrile anidro (20 ml) è stato messo a refluxo per 17 ore. Dopo aver raffreddato e filtrato, il solvente è stato rimosso sotto vuoto ed il residuo è stato soggetto a cromatografia flash su gel di silice con esano/AcOEt in gradiente, per fornire l'azide **7** come un limpido olio viscoso (292 mg, 87%).

$[\alpha]_D^{20} = +90.3$ (c 0.06, MeOH). 1H NMR ($CDCl_3$): δ 4.40 (1H, m, H-5), 4.23 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-2), 3.85 (3H, s, OMe), 3.83 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-2), 3.54 (1H, dd, J = 12.8, 3.6 Hz, H-6), 3.40 (1H, br. s, OH), 3.31 (1H, dd, J = 12.8, 5.6 Hz, H-6), 2.28 (1H, dd, J = 12.8, 9.9 Hz, H-4), 2.08 (1H, dd, J = 12.8, 5.4 Hz, H-4). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 174.4 (COO), 77.8 (C-5), 81.6 (C-3), 78.2 (C-2), 53.3 (OMe), 53.2 (C-6), 53.3 (OMe), 42.3 (C-4). Significantive correlazioni HMBC: δ 3.85 ppm (H-2) con C-4; 4.23 (H-2) con C-4, C-5 e C-4 COO, 3.85 (OMe) con COO, 4.40 (H-5) con C-2, C-6 e C-4, 3.54 (H-6) con C-4 e C-5; 3.31 (H-6) con C-2 e C-4; 2.28 (H-4) con C-6, C-2 e COO; 2.08 (H-4) con C-2. Significantive correlazioni HMBC: δ 4.23 ppm (H-2) con C-5 e COO; 3.83 (H-2) con C-3, C-5 e COO; 3.54 (H-6) con C-4, C-5; 2.28 (H-4) con C-2, C-6, COO; 2.08 (H-4) con C-3. ESIMS (positive mode): m/z 224 ($[M+Na]^+$).

Reagente chirale utilizzato con il prodotto 7. Al composto **7** (2.0 mg, 0.01 mmol) in 0.5 ml di CDCl₃ sono stati aggiunti da 1-30 µl di soluzione di Eu(tfc)₃ in CDCl₃ osservando lo spostamento dei protoni senza splitting dei segnali. Dopo l'aggiunta di 0.3 mol. equiv del reagente per i segnali dei protoni sono stati: 2.79 (OH), 0.79 (H-5), 0.75 and 0.73 (2H-4), 0.67 and 0.65 (2H-2), 0.59 and 0.37 (2H-6), 0.42 ppm (OMe).

Acido (3R,5S)-5-(Azidometil)-3-idrossitetraidrofuran-3-carbossilico 8

Ad una soluzione di **7** (146 mg, 0.725 mmol) in THF (5 ml) è stato aggiunto NaOH 0.5 M (1.5 ml, 0.363 mmol) ed agitato per 3 ore. Il miscuglio è stato passato attraverso una colonna di Amberlyst 15 (forma acida), lavato con acetonitrile ed acqua. L'eluato, di valore di pH 4, è stato evaporato sotto vuoto per dare l'acido **8** (135 mg, 99%), abbastanza puro da poter esser usato durante lo step successivo.

Polvere bianca. $[\alpha]_D^{20} = +87.4$ (c 0.2, EtOH). ¹H NMR (CDCl₃): δ 4.45 (1H, m, H-5), 4.30 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), 3.90 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), 3.85 (1H, s, HO-3), 3.55 (1H, dd, J = 12.8, 3.5 Hz, H-6), 3.36 (1H, dd, J = 12.8, 5.6 Hz, H-6), 2.37 (1H, dd, J = 12.9, 9.8 Hz, H-4), 2.16 (1H, dd, J = 12.9, 5.8 Hz, H-4). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 177.5 (COOH), 83.3 (C-3), 78.8 (C-2), 78.3 (C-5), 53.1 (C-6), 42.2 (C-4). Significantive correlazioni HMBC: δ 4.30 ppm (H-2) con C-4, C-5 e COO; δ_H 3.90 (H-2) con C-4, C-5 e COO; 3.55 e 3.36 (2H-6) con C-4 e C-5; 2.37 (H-4) con C-2, C-6 e COO. ESIMS (metodo negativo): *m/z* 186 ([M-H]).

(1R,5S)-1-idrossi-6-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]ottan-2-one 9

Una soluzione del composto **7** (73 mg, 0.36 mmol) in 5 ml di etanolo è stata idrogenata per 3 ore a temperatura ambiente ed a pressione atmosferica in presenza di un 10% di Pd/C. Dopo la filtrazione, il solvente è stato evaporato sotto vuoto per ottenere il composto **9** (38 mg, 73%).

^1H NMR (CDCl_3): δ 5.50 (1H, br s, NH), 4.56 (1H, br s, H-5), 4.00 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2), 3.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2), 3.46 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-6), 3.36 (1H, d, $J = 12.6$, H-6), 2.50 (1H, dd, $J = 11.9, 5.7$ Hz, H-4), 2.06 (1H, br d, $J = 11.8$ Hz, H-4). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 175 (CONH), 85.0 (C-3), 74.5 (C-5), 73.3 (C-2), 45.2 (C-6), 54.0 (C-4). Significative correlazioni HMBC: δ 4.00 e 3.73 ppm (2H-2) con C-5 e C=O; 2.06 (H-4) con C=O. ESIMS (metodo positivo): m/z 144 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 166 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Acido (3R,5S)-5-(Ammionetil)-3-idrossitetraidrofuran-3-carbossilico (4H⁺)

Una soluzione della sostanza **8** (135 mg, 0.72 mmol) in 10 ml di etanolo è stata idrogenata per 3 ore a pressione atmosferica in presenza di Pd/C al 10%. Dopo la filtrazione, il solvente è stato evaporato sotto vuoto per ottenere il prodotto **4**, come forma protonata dovuta alla condizione acida dei reagenti di partenza (110 mg, 95%).

Solido bianco cristallino, m. p. 192-194 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +24.3$ (c 0.15, H_2O). IR ν_{max} : 2910(v br) 1716(vs), 1591(s), 1502, 1,394, 1225(s), 1134, 1024 (vs), 812 e 710 cm^{-1} .

^1H NMR (D_2O): δ 4.40 (1H, m, H-5), 4.11 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-2), 3.80 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-2), 3.17 (1H, dd, $J = 13.0, 3.1$ Hz, H-6), 3.07 (1H, dd, $J = 13.0, 8.7$ Hz, H-6), 2.20 (2H, m, H-4). ^{13}C NMR (D_2O): δ 176.8 (COOH), 81.4 (C-3), 76.8 (C-2), 75.1 (C-

5), 41.5 (C-4), 41.3 (C-6). Significant correlations HMBC: δ 4.40 ppm (H-5) con C-2; 4.11 e 3.80 (2H-2) con C-3, C-4, C-5 and COO; 3.17 e 3.06 (2H-6) con C-4, C-5; 2.20 (2H-4) con C-3, C-6 e COO. ESIMS (metodo positivo): m/z 162 ($[M+H]^+$); ESI-MS/MS (162): 145 ($[M+H-NH_3]^+$), 144 ($[M+H-H_2O]^+$), 117 ($[M+H-CO_2]^+$), 116 ($[M+H-HCOOH]^+$), 99 ($[C_5H_7O_2]^+$). HR-MALDI-TOF/TOF MS (metodo positivo): m/z 162.0751 ± 0.005 , calc. per $C_6H_{12}NO_4$ ($[M+H]^+$) 162.0766.

5 Conclusioni

Il principale obiettivo di questa Tesi è consistito nello sviluppo di materiali innovativi da trattamento pirolitico di biomasse e nella valutazione delle proprietà di tossicità di un gruppo di ILs per la progettazione di sostanze ambientalmente compatibili.

Sintesi di liquidi ionici, batteria eco tossicologica, test biochimici e saggi con modelli di membrana.

Una scelta appropriata della struttura del catione e dell'anione degli ILs è fondamentale al fine di progettare sostanze chimiche che siano intrinsecamente meno dannose sotto un profilo eco-tossicologico. Nel caso dei composti qui presi in considerazione, i test biologici hanno indicato che gli ILs con un atomo di ossigeno nella struttura generano un minor grado di tossicità rispetto ai loro analoghi che non presentano atomi di ossigeno. La presenza di atomi di ossigeno diminuisce tutti gli effetti biologici, benché quelli attribuibili alla lunghezza della catena cambiano a seconda del target biologico e della testa cationica. D'altra parte la comprensione dei dettagliati meccanismi di tossicità è ancora lacunosa e rappresenta un obiettivo importante per la progettazione di materiali intrinsecamente meno dannosi a cui questo lavoro di tesi ha cercato di contribuire.

Nel complesso i nostri dati indicano diversi gradi di sensibilità del batterio *Vibrio fischeri* e delle cellule in coltura utilizzate (valori di EC50, ordine di grandezza millimolare) rispetto al crostaceo *Daphnia magna* (valori di EC50, ordine di grandezza

micromolare). E' importante sottolineare che delle così grandi differenze specie-specifiche suggeriscono che alla base della tossicità vi siano meccanismi di azione specie-dipendenti.

I liquidi ionici sintetizzati sono stati analizzati nei loro effetti verso modelli di membrane cellulari considerando relazioni tra struttura molecolare ed effetti di membrana. E' stato utilizzato un ampio spettro di test biochimici per valutare gli effetti sui doppi strati fosfolipidici e test che impiegano delle matrici composte da sonde capaci di emettere segnali colorimetrici e di fluorescenza se sottoposte a perturbazioni di membrana.

I liquidi ionici a corta catena alchilica presentano gli effetti maggiori, in termini di destabilizzazione dei modelli di membrana. Nei test di fusione di membrane lipidiche questi ILs hanno mostrato effetti considerevoli (10-20%) a concentrazioni vicine al millimolare se confrontati con l'attività di noti detergenti.

I liquidi ionici a catene monoetossilate si sono dimostrati meno attivi nei test di fusione ed in generale anche negli altri test. Il comportamento maggiormente articolato è stato osservato per i liquidi ionici con due funzionalità etossi nelle catene laterali dei cationi. Queste sostanze sono maggiormente attive dei liquidi ionici mono-ossigenati ma non altrettanto tossici rispetto ai loro equivalenti strutturali non ossigenati.

Per quanto riguarda gli effetti di membrana gli ILs analizzati possono essere suddivisi in tre grandi gruppi. Gli ILs diossigenati presentano un'attività maggiormente variegata, dipendente dalla struttura della testa cationica. ILs a testa cationica pirrolidinica sono maggiormente attivi rispetto agli analoghi strutturali che presentano una testa di tipo imidazolinico. I dati hanno indicato che gli ILs dotati di atomi di

ossigeno nelle catene laterali sono meno dannosi in termini di vitalità cellulare, ma sono tutte sostanze attive sulle membrane. La presenza di un atomo di ossigeno è l'elemento chiave per la diminuzione della tossicità e dell'attività di membrana in senso ampio, conclusione sostenuta dall'unione dei dati di fluorescenza, vitalità cellulare e microscopia al confocale. I dati raccolti aprono delle prospettive riguardo all'impiego dei liquidi ionici come materiali, la cui attività verso i sistemi biologici può essere modulata scegliendo gli elementi strutturali giusti che permettano di mantenere proprietà di membrana ma non siano dannose per i sistemi viventi.

Prodotti da pirolisi di fonti rinnovabili

Dopo avere dimostrato che la cellulosa rappresenta il substrato migliore per l'ottenimento di LAC, le ricerche sono state indirizzate verso la scelta di catalizzatori, approfondendo lo studio delle mesofasi del tipo MCM-41 in alternativa alle nanopolveri. Sono state sintetizzate numerose MCM-41 drogate con vari metalli, fra cui alluminio, titanio, stagno, zirconio per essere testate nella pirolisi analitica della cellulosa. Tutte hanno esibito una certa attività catalitica, ovvero hanno aumentato le rese di LAC fino a valori confrontabili con quelli ottenuti con le nanopolveri di titanio alluminato. La mesofase contenente stagno (Sn-MCM-41) è stata scelta per le pirolisi preparative con il pirolizzatore da banco. Gli esperimenti hanno evidenziato la stabilità termica di Sn-MCM-41, e la possibilità di riciclare il catalizzatore per pirolisi successive, arrivando fino a sei cicli di utilizzo-rigenerazione senza osservare diminuzioni significative delle rese di LAC.

Isolamento e purificazione di LAC dal bio-olio. Il bio-olio ottenuto dalle pirolisi della cellulosa con Sn-MCM-41 è stato sottoposto a numerose prove di separazione al fine di isolare LAC con un buon grado di purezza e di recupero. Le prove hanno confermato le difficoltà di isolare il composto da una miscela complessa come il bio-olio in cui LAC è presente a concentrazioni intorno 10%. Sono state investigate procedure cromatografiche variando la fase stazionaria (gel di silice, RP18, CN, carboni attivi) e la fase mobile. La procedura di separazione cromatografica ottimizzata permette di ottenere LAC con una purezza del 95% ed un recupero del 95%. I contaminanti sono stati identificati come HMF, DGP e 4-idrossipiranone. La purezza di LAC è stata migliorata tramite distillazione sotto vuoto e filtrazione su carbone attivi fino ad ottenere una purezza del 99%.

Il substrato 4-AcLG è stato usato come molecola di partenza per migliorare l'efficienza nella sintesi di LAC, in presenza di catalizzatori mesoporosi. Tramite un'ampia indagine di diversi catalizzatori drogati con differenti metalli di transizione, le MCM-41 drogate con alluminio (Al) si sono dimostrate le migliori nel favorire una sintesi selettiva di LAC.

Quest'indagine è stata condotta tramite esperimenti in pirolisi accoppiata alla gascromatografia/spettrometria di massa (Py-GC/MS). Successivamente all'identificazione del migliore catalizzatore, questo è stato impiegato per una sintesi di LAC su scala preparativa.

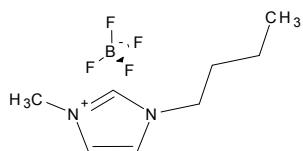
E' stato utilizzato un pirolizzatore da banco per indagare su grande scala il procedere della reazione di pirolisi catalitica e la sua selettività. Le prove svolte non si sono dimostrate efficienti nel fornire buone rese di LAC; le variabili di reazione vengono analizzate selettivamente in uno studio in corso di svolgimento.

LAC è stato utilizzato con successo per la sintesi di un nuovo amminoacido a base tetraidrofuranica (l'acido 5-amminometil-3-idrossi-3-carbossilico), con una serie di sei passaggi ed una resa globale del 40%, suscettibile di miglioramento. Nel tentativo di sintetizzare l'amminoacido è stato ottenuto con buone rese il lattame analogo di LAC, anche questo un nuovo composto. Questi composti potranno fungere da monomeri nella sintesi di oligomeri o polimeri strutturalmente simili ai peptidi. Per quanto riguarda i composti con potenziale attività biologica da utilizzare in campo farmaceutico, è stata ottimizzata la sintesi di uno dei composti progettati come potenziali agenti muscarinici, che potrà essere applicata per l'accesso alle altre molecole progettate. Un nuovo composto di questa famiglia, individuato come modello per i test di bioattività, è stato sintetizzato in piccole quantità.

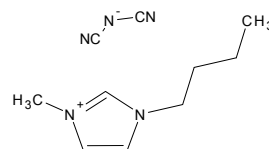
Sono state messe a punto delle tecniche di isolamento e purificazione di altre due molecole, il DGP ed il LG, ottenibili con considerevoli rese dalla pirolisi della cellulosa. Le analisi svolte sono state sostenute dal disegno di diminuire la quantità di solventi utilizzati e di selezionare solventi a ridotta tossicità.

Appendice

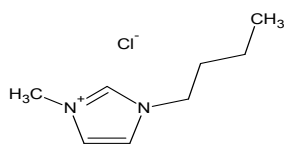
Nomi e strutture dei liquidi ionici utilizzati in questa tesi.



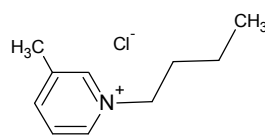
[BMIM][BF₄] **1a**



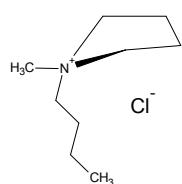
[BMIM][N(CN)₂] **1b**



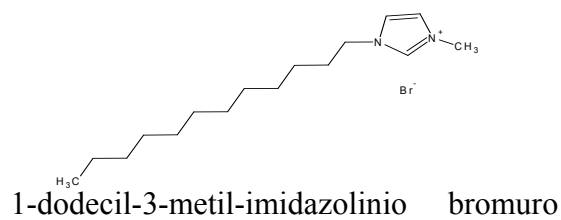
[BMIM][Cl] **1c**



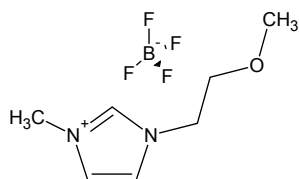
[BMpy][Cl] **1e**



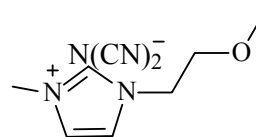
[MBprl][Cl] **1f**



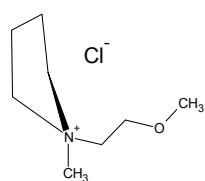
1g



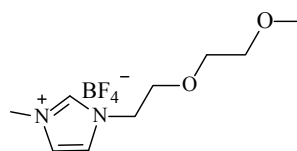
[MOEMIM][BF₄] **2a**



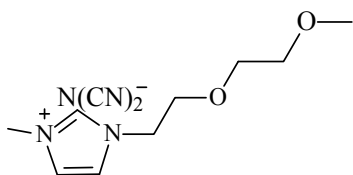
[MOEMIM][N(CN)₂] **2b**



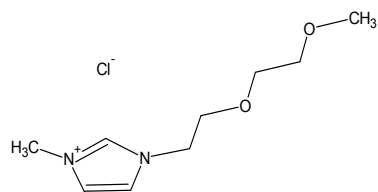
[MOEprl][Cl] **2f**



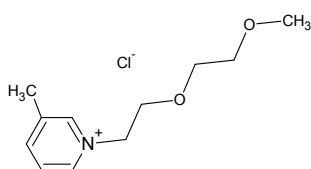
[M(OE)₂MIM][BF₄] **3a**



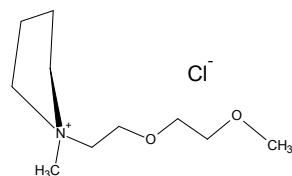
$[M(OE)_2MIM][N(CN)_2]$ **3b**



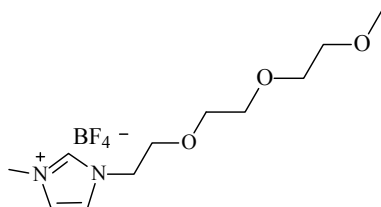
$[M(OE)_2MIM][Cl]$ **3c**



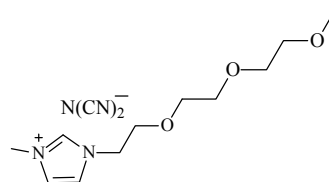
$[M(OE)_2py][Cl]$ **3e**



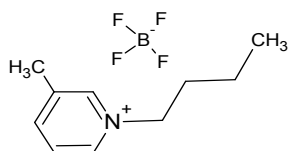
$[M(OE)_2prl][Cl]$ **3f**



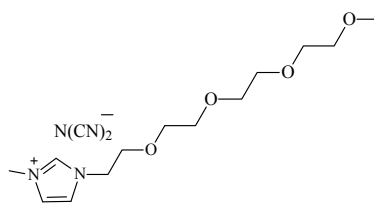
$[M(OE)_3MIM][BF_4]$ **4a**



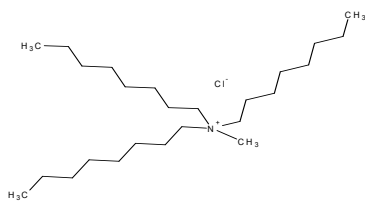
$[M(OE)_3MIM][N(CN)_2]$ **4b**



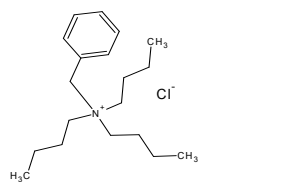
$[BMpy][BF_4]$ **4e**



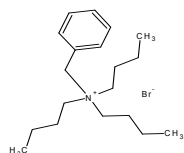
$[M(OE)_4MIM][N(CN)_2]$ **5b**



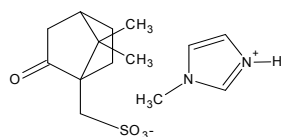
Aliquat 366 Cl **6a**



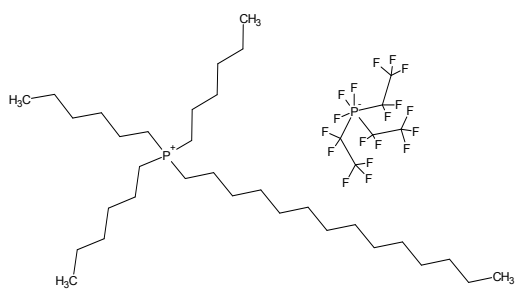
BTAC **6b**



BTAB **6c**



Acido H-metilimidazolinio
canforsolfonico **6d**



C66614 6e

Attività svolta

Durante il corso dei tre anni di dottorato il lavoro svolto ha portato alla pubblicazione dei seguenti articoli (pubblicati o in fase di pubblicazione):

Noga Gal, Danilo Malferarri, Sofiya Kolusheva, Paola Galletti, Emilio Tagliavini, Raz Jelinek*; “**Membrane interactions of ionic liquids – possible determinants for biological activity and toxicity**”, 2012, ChemBioChem, in progress.

Paola Galletti, Danilo Malferrari*, Chiara Samorì, Giorgio Sartor, Emilio Tagliavini; “**Effects of ether functionalized ionic liquids on membrane fusion related to their aggregation properties**”, 2012, Langmuir, sottomesso.

Chiara Samorì, Danilo Malferrari, Paola Valbonesi, Adele Montecavalli, Fabio Moretti, Paola Galletti*, Giorgio Sartor, Emilio Tagliavini, Elena Fabbri, Andrea Pasteris; “**A comprehensive evaluation of the effects of oxygenated-imidazolium ionic liquids at different biological organization levels**”, Environmental and Toxicological Safety, 2010, 73, 6, 1456-1464.

Andrea Defant*, Ines Mancini, Cristian Torri, Danilo Malferrari, Daniele Fabbri; “**An efficient route towards a new branched tetrahydrofurane δ -sugar amino acid from a pyrolysis product of cellulose**”, 40, 2, 2010, Amino acids, 633-640.

Partecipazione a congressi-workshop:

Danilo Malferrari, Chiara Samorì, Paola Galletti, Giorgio Sartor, Emilio Tagliavini;
“Effects of ether functionalized ionic liquids on membrane fusion related to their
aggregation properties” Minerva Meeting, Israele, 28-30 Marzo, 2011.

Danilo Malferrari, Chiara Samorì, Paola Valbonesi, Adele Montecavalli, Fabio Moretti,
Paola Galletti, Giorgio Sartor, Emilio Tagliavini, Elena Fabbri, Andrea Pasteris;
“Evaluation of the effects of oxygenated-imidazolium ionic liquids at different
biological organization levels”, presentato al Convegno SETAC – Ecomondo, Rimini 3-
6 Novembre, 2010.

Danilo Malferrari, Andrea Defant, Daniele Fabbri, Ines Mancini, Cristian Torri; “A
novel chiral synthone from biomass. Production of anhydro isosaccharino- δ -lactone
from catalytic pyrolysis of cellulose and its application to the synthesis of bio-mimetic
molecules”, Presentato alla 8th Green Chemistry conference. An international event.
Zaragoza Spain, 2009.

Danilo Malferrari, Chiara Samorì, Paola Valbonesi, Adele Montecavalli, Fabio Moretti,
Paola Galletti, Giorgio Sartor, Emilio Tagliavini, Elena Fabbri, Andrea Pasteris;
“Evaluation of the effects of oxygenated-imidazolium ionic liquids at different
biological organization levels”, Presentato alla 8th Green Chemistry conference. An
international event. Zaragoza Spain, 2009.

Durante il terzo anno di dottorato, per il periodo Febbraio-Aprile 2011 è stato svolto un periodo di studio e ricerca all'estero presso il dipartimento di chimica e nanotecnologie dell'università di Beer Sheva, Israele, presso il gruppo di ricerca del Professor Jelinek Raz, tramite progetto Marco Polo dell'Università di Bologna.

Durante il primo anno di dottorato, nel mese di Gennaio 2009 è stato svolto un periodo di studio e ricerca presso il dipartimento di chimica bio-organica dell'università degli studi di Trento, presso il gruppo di ricerca del Professoressa Mancini Ines.

Indice delle abbreviazioni

ILs	Liquidi ionici
BMIM Cl	1-butil-3-metil-imidazolinio cloruro
BMIM BF ₄	1-butil-3-metil-imidazolinio trifluoroborato
BMIM C(CN) ₂	1-butil-3-metil-imidazolinio dicianamide
C12	1-dodecil-3-metil imidazolinio bromuro
BTAC	Benzil tributilammonio cloruro
MOEMIM Cl	1-metossietil-3-metil-imidazolinio cloruro
MOEMIM BF ₄	1-metossietil-3-metil-imidazolinio tetrafluoroborato
MOEMIM N(CN) ₂	1-metossietil-3-metil-imidazolinio dicianamide
M(OE) ₂ MIM Cl	1-[2-(2-Metossietil)-etil]-3-metil-imidazolinio cloruro
M(OE) ₃ MIM Cl	1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3- metilimidazolinio cloruro
M(OE) ₄ MIM N(CN) ₂	1-(2-{2-[2-(2-metossi-etossi)-etossi]-etossi}-etil)-3- metilimidazolinio dicianamide
M(OE) ₂ MIM BF ₄	1-[2-(2-Metossietil)-etil]-3-metil-imidazolinio tetrafluoroborato
M(OE) ₂ MIM N(CN) ₂	1-[2-(2-Metossietil)-etil]-3-metil-imidazolinio dicianamide
M(OE) ₃ MIM BF ₄	1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3- metilimidazolinio tetrafluoroborato
M(OE) ₃ MIM N(CN) ₂	1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3-metilimidazolinio dicianamide

M(OE) ₂ MIM OTs	1-[2-(2-Metossietil)-etil]-3-metil-imidazolinio tosilato
M(OE) ₃ MIM OTs	1-(2-[2-(2-Metossi-etossi)-etossi]-etil)-3-metilimidazolinio tosilato
M(OE) ₄ MIM OTs	1-(2-{2-[2-(2-metossi-etossi)-etossi]-etossi}-etil)-3-metilimidazolinio tosilato
MBuPy Cl	1-butil-3metil-piridinio cloruro
MMoePy Cl	1-metossietil-3-metil-piridinio cloruro
M(MOE) ₂ Py Cl	1-[2-(2-Metossietil)-etil]-3-metil-piridinio cloruro
MBuPyr Cl	1-butil-1-metil-pirrolidinio cloruro
MMoePyr Cl	1-metossietil-1-metil-pirrolidinio cloruro
M(MOE) ₂ Pyr Cl	1-[2-(2-Metossietil)-etil]-1-metil-pirrolidinio cloruro
DPH	1,6-difenilesatriene
Py	Pirene
Egg PC	Fosfatidilcolina da uova
DMPC	Dimiristoil fosfatidil colina
DMPG	Dimiristoil fosfatidil glicerolo
PDA	Polidiacetilene
TR	Acido 10,12-tricosadinoico
TRITON X-100	Polietilenglicole p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenilettere
SDS	Sodio dodecilsolfato
OTGLC	Ottil-glucoside
CTAB	Cetiltrimetilammonio bromuro
GUV	Giant unilamellar vescicles
PC	Fosfatidilcolina

PG	Fosfatidilglicerolo
NaBF ₄	Sodio tetrafluoroborato
NaN(CN) ₂	Sodio dicianamide
NaCl	Cloruro di sodio
LG	Levoglucosano – 1,6-dianidro-β-glucopiranosio
4-AcLG	4-acetil levoglucosano
LGO	Levoglucosenone - (1S)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]ottan-2-en-4-one
LAC	(1R, 5S)-1-idrossi-3,6-dioxa-biciclo [3.2.1] ottan-2-one
DGP	3,6 : 1,4 - dianidroglicopiranosio
HMF	Idrossimetil furaldeide
DDGS	Dried Distilled Grains with Solubles
AChE	Acetilcolinesterasi
SAAAs	SugarAminoAcids – amminoacidi zuccherini
PrI OTf	Pirrolidinio triflato
PrI N(CN) ₂	Pirrolidinio dicianamide

Ringraziamenti

Voglio ringraziare il mio Tutor Emilio Tagliavini, la mia relatrice Paola Galletti ed il mio Correlatore Daniele Fabbri per l'aiuto ed il sostegno datomi durante lo svolgimento del Dottorato.

Ringrazio il Professor Jelinek Raz, la dottoressa Sofiya Kolusheva e tutti i ragazzi del laboratorio di chimica del Nanobuilding per la gentilezza e la disponibilità accordatami durante il periodo di studio presso l'Università Ben Gurion di Beer Sheva, Israele.

Ringrazio i gruppi di ricerca ed i dottorandi del CIRSA (Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali) che mi hanno aiutato durante lo svolgimento degli esperimenti nel corso del dottorato.

Un ringraziamento particolare al Professor Giorgio Sartor, alla Professoressa Elena Fabbri ed al Professor Giuseppe Falini per l'aiuto.

Ringrazio in particolare i dottorandi e gli amici dei laboratori del CIRSA: Roberto, Lorenzo, Marco, Chiara, Cristian, Alessio, Alessandro, Fabio, Stefano.

Un grazie speciale a Federica.