

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica



**NUOVE TRASFORMAZIONI ENZIMATICHE
DI FOSFOLIPIDI NATURALI**

Relatore: Prof.ssa Paola D'Arrigo

Tesi di laurea di:

Roberto Colnaghi 800638

Carlo Manzoni 799620

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

Abstract	1
-----------------------	---

Sommario	2
-----------------------	---

Capitolo 1

I FOSFOLIPIDI

1.1 Introduzione ai fosfolipidi.....	5
1.2 Nomenclatura	7
1.3 Proprietà fisiche dei fosfolipidi.....	8
1.4 Funzione dei fosfolipidi negli organismi viventi	10
1.5 Applicazioni dei fosfolipidi.....	12
1.5.1 Liposomi	12
1.5.2 Farmaci antitumorali	15
1.5.3 Biosurfattanti.....	16
1.5.4 Biomarkers.....	17
1.6 Fosfolipasi	18

Capitolo 2

I LIQUIDI IONICI

2.1 Definizione.....	20
2.2 Sintesi dei liquidi ionici	23
2.3 Proprietà dei liquidi ionici.....	25
2.4 Applicazioni dei liquidi ionici	30
2.4.1 Biocatalisi.....	31
2.4.2 Applicazioni biomedicali.....	37
A) Biocatalisi.....	37
B) Attuatori meccanici.....	37
C) Elettrodeposizione	38
D) Gene delivery vector.....	39
2.4.3 Altre applicazioni.....	39
2.5 Vantaggi e svantaggi connessi all'uso dei liquidi ionici	40

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Introduzione	43
3.2 Riferimenti	44
3.2.1 PC.....	44

3.2.2 PG	45
3.2.3 PA.....	45
3.3 Enzimi.....	46
3.4 Liquidi Ionici.....	47
3.5 Apparecchiature	48

Capitolo 4

MODIFICAZIONI DELLE TESTE POLARI DI FOSFOLIPIDI

4.1 Introduzione	50
4.2 Sintesi del Fosfatidilglicerolo (PG)	51
4.2.1 Protocollo operativo	52
4.2.2 Risultati	54
4.3 Sintesi della Fosfatidiletanolamina (PEA).....	55
4.3.1 Protocollo operativo.....	55
4.3.2 Risultati	57
4.4 Sintesi del Fosfatidilisopropanolo (PIP)	59
4.4.1 Protocollo operativo.....	59
4.4.2 Risultati	62
4.5 Sintesi del Fosfatidilallile (PAL).....	63
4.5.1 Protocollo operativo.....	63
4.5.2 Risultati	65
4.6 Sintesi del Fosfatidilglucosio (PGI).....	67
4.6.1 Protocollo operativo.....	67
4.6.2 Risultati	69
4.7 Discussione dei risultati	70

Capitolo 5

DERIVATI DEL PG – PRODOTTI AD ALTO VALORE AGGIUNTO

5.1 Introduzione	71
5.2 Sintesi della Cardiolipina (CLP)	72
5.2.1 Protocollo operativo.....	73
5.2.2 Risultati	76

Capitolo 6

ACILAZIONE SELETTIVA DELLA GLICEROFOSFORILCOLINA

6.1 Introduzione	77
6.2 Sintesi del 1-lauroil-2-lisoPC	78
6.2.1 Protocollo operativo.....	79
6.2.2 Risultati	81
6.3 Sintesi del 1-acetil-2-lisoPC.....	81
6.3.1 Protocollo operativo.....	82

6.3.2 Risultati	83
6.4 Sintesi del 1-lauroil-2-palmitoilPC	83
6.4.1 Protocollo operativo	84
6.4.2 Risultati	84

Conclusioni	85
--------------------------	-----------

Bibliografia	127
---------------------------	------------

Ringraziamenti	131
-----------------------------	------------

Indice delle figure

Figura 1.1 Struttura di un comune glicerofosfolipide: la fosfatidilcolina (PC)	5
Figura 1.2 Principali costituenti della testa polare nei glicerofosfolipidi	6
Figura 1.3 Struttura dei lisofosfolipidi	7
Figura 1.4 Principali aggregati fosfolipidici	9
Figura 1.5 Sezione di una membrana cellulare.	10
Figura 1.6 Classificazione dei liposomi.	13
Figura 1.7 Schema delle principali patologie correlate alla maggiore presenza di acido lisofosfatidico (LPA).	18
Figura 1.8 Siti di attacco delle fosfolipasi.	19
Figura 2.1 I 5 gruppi di cationi costituenti i liquidi ionici: a) cationi eterociclici a 5 membri, b) cationi eterociclici a 6 membri, c) cationi non ciclici basati su azoto, fosforo, zolfo, d) cationi imidazolici funzionalizzati, e) cationi chirali.	21
Figura 2.2 I cationi più utilizzati per sintetizzare liquidi ionici.	21
Figura 2.3 I 6 gruppi di anioni costituenti i liquidi ionici: a) ione $AlCl_4^-$, b) ioni come PF_6^- , BF_4^- , c) anioni immidici, d) anioni come alchilsolfato e alchilfosfato, e) anioni acetato e trifluoroacetato, f) anioni borato.	22
Figura 2.4 Schema della preparazione tipica dei liquidi ionici.	24
Figura 2.5 Variazione della temperatura di fusione dei liquidi ionici basati su cationi imidazolici in relazione agli ioni presenti	26
Figura 2.6 Possibili applicazioni dei liquidi ionici in campo industriale e della ricerca.	31
Figura 2.7 Liquido ionico funzionalizzato usato per l'immobilizzazione degli enzimi	34
Figura 2.8 Schema di un attuatore elettromeccanico	38
Figura 3.1 Fosfatidilcolina (PC)	44
Figura 3.2 Fosfatidilglicerolo (PG)	45
Figura 3.3 Acido fosfatidico(PA)	45

Figura 3.4 Analisi di SDS-PAGE del preparato enzimatico grezzo fornito dalla CHEMI S.p.A; la banda relativa alla fosfolipasi D è quella a M=54 kDa	46
Figura 3.5 [BMIm][PF ₆]	47
Figura 3.6 [EMIm][AcO]	47
Figura 4.0 Reazione di transesterificazione della PC	50
Figura 4.1 Reazione di sintesi di Fosfatidilglicerolo (PG)	51
Figura 4.2 Reazione di sintesi di Fosfatidiletanolamina (PEA)	55
Figura 4.3 Reazione di sintesi di Fosfatidilisopropanolo (PIP)	59
Figura 4.4 Reazione di sintesi di Fosfatidilallile (PAL)	63
Figura 4.5 Reazione di sintesi di Fosfatidilglucosio (PGI)	67
Figura 5.1 Costi commerciali della Cardiolipina (estratto dal catalogo Sigma-Aldrich)	71
Figura 5.2 Struttura della Cardiolipina (CLP)	72
Figura 5.2 Schema di sintesi della Cardiolipina (CLP)	73
Figura 6.1A Schema della sintesi totalmente enzimatica di fosfolipidi.	77
Figura 6.1B Acilazione della GPC mediante dibutilstagno ossido (X=colina)	78
Figura 6.1C 1-Lauroil-2-lisofosfatidilcolina	78
Figura 6.2 1-Acetil-2-lisofosfatidilcolina	81
Figura 6.3 1-Lauroil-2-palmitoilfosfatidilcolina	83

Indice delle tabelle

Tabella 3.1 Gradiente HPLC	48
Tabella 4.1 Reazione CR021	52
Tabella 4.2 Reazione CR025	52
Tabella 4.3 Reazione CR023	52
Tabella 4.4 Reazione CR026	53
Tabella 4.5 Reazione CR024	53
Tabella 4.6 Risultati integrazione spettri HPLC	54
Tabella 4.7 Reazione CR022Z	56
Tabella 4.8 Reazione CR042	56
Tabella 4.9 Reazione CR035	56
Tabella 4.10 Reazione CR038	57
Tabella 4.11 Reazione CR061	57
Tabella 4.12 Risultati integrazione spettri HPLC	57
Tabella 4.13 Reazione CR055	60
Tabella 4.14 Reazione CR056	60
Tabella 4.15 Reazione CR057	60
Tabella 4.16 Reazione CR059	60
Tabella 4.17 Reazione CR058	61
Tabella 4.18 Risultati integrazione spettri HPLC	62
Tabella 4.19 Reazione CR050	64
Tabella 4.20 Reazione CR051	64
Tabella 4.21 Reazione CR046	64

Tabella 4.22 Reazione CR052	64
Tabella 4.23 Reazione CR053	65
Tabella 4.24 Risultati integrazione spettri HPLC	65
Tabella 4.25 Reazione CR064	68
Tabella 4.26 Reazione CR065	68
Tabella 4.27 Reazione CR066	68
Tabella 4.28 Reazione CR067	68
Tabella 4.29 Reazione CR068	68
Tabella 5.1 Reazione CR048	74
Tabella 5.2 Reazione CR049	74
Tabella 5.3 Reazione CR074	75
Tabella 5.4 Risultati integrazione spettri HPLC	76
Tabella 6.1 Reazione CR001	79
Tabella 6.2 Reazione CR002	79
Tabella 6.3 Reazione CR003	80
Tabella 6.4 Reazione CR004	80
Tabella 6.5 Reazione CR005	80
Tabella 6.6 Reazione CR006	80
Tabella 6.7 Reazione CR009	81
Tabella 6.8 Reazione CR010	81
Tabella 6.9 Reazione CR007	82
Tabella 6.10 Reazione CR008	82
Tabella 6.11 Reazione CR011	84
Tabella 6.12 Reazione CR012	84

Indice dei grafici

Grafico 2.1 Andamento della crescita delle pubblicazioni riguardanti i liquidi ionici dal 1986 al 2010.	23
Grafico 2.2 Temperatura di fusione predetta e osservata per una serie di liquidi ionici del tipo $[C_nMIm][PF_6]$	27
Grafico 2.3 Viscosità (η , grafico a) a 20 °C e densità (ρ , grafico b) a 30 °C di $[BMIm][BF_4]$ vs. la concentrazione molale di ioni cloruro, aggiunti come $[BMIm][Cl]$	29
Grafico 2.4 Viscosità (η) a 20 °C di una miscela $[BMIm][BF_4]$ -cosolvente vs. la frazione molare di cosolvente; la linea continua rappresenta il fit teorico dei dati ottenuti.	30
Grafico 2.5 Dati statistici sull'uso dei liquidi ionici in vari sistemi biocatalitici: (1) lipasi, (2) glicosidasi, (3) esterasi, (4) fosfatasi, (5) altre idrolasi, (6) citocromo c-ossidasi, (7) perossidasi, (8) deidrogenasi, (9) glucosio ossidasi, (10) laccasi, (11) altre ossido riduttasi, (12) proteine emetiche e (13) lieviti.	35
Grafico 4.1 Risultati elaborazione Excel	54
Grafico 4.2 Risultati elaborazione Excel	58
Grafico 4.3 Risultati elaborazione Excel	62
Grafico 4.4 Risultati elaborazione Excel	66
Grafico 5.1 Risultati elaborazione Excel	76

Indice degli allegati

ANALISI HPLC

Allegato 1 analisi HPLC della PC di riferimento.....	86
Allegato 2 analisi HPLC del PG di riferimento	87
Allegato 3 analisi HPLC del PG metilato di riferimento.....	88
Allegato 4 analisi HPLC del PA di riferimento	89
Allegato 5 analisi HPLC della miscela PC, PG, PA	90
Allegato 6 analisi HPLC della reazione CR021	91
Allegato 7 analisi HPLC della reazione CR025	92
Allegato 8 analisi HPLC della reazione CR023	93
Allegato 9 analisi HPLC della reazione CR026	94
Allegato 10 analisi HPLC della reazione CR024	95
Allegato 11 analisi HPLC della reazione CR022Z	96
Allegato 12 analisi HPLC della reazione CR042	97
Allegato 13 analisi HPLC della reazione CR035	98
Allegato 14 analisi HPLC della reazione CR061	99
Allegato 15 analisi HPLC della reazione CR038	100
Allegato 16 analisi HPLC della reazione CR055	101
Allegato 17 analisi HPLC della reazione CR056	101
Allegato 18 analisi HPLC della reazione CR057	103
Allegato 19 analisi HPLC della reazione CR059	104
Allegato 20 analisi HPLC della reazione CR058	105
Allegato 21 analisi HPLC della reazione CR050	106
Allegato 22 analisi HPLC della reazione CR051	107
Allegato 23 analisi HPLC della reazione CR046	108
Allegato 24 analisi HPLC della reazione CR052	109
Allegato 25 analisi HPLC della reazione CR053	110
Allegato 26 analisi HPLC della reazione CR064	111
Allegato 27 analisi HPLC della reazione CR049	112
Allegato 28 analisi HPLC della reazione CR048	113
Allegato 29 analisi HPLC della reazione CR074	114

SPETTRI DI MASSA

Allegato 30 spettro di massa della PC di riferimento	115
Allegato 31 spettro di massa del PG	116
Allegato 32 spettro di massa della reazione CR022Z.....	117
Allegato 33 spettro di massa della reazione CR057.....	118
Allegato 34 spettro di massa della reazione CR050.....	119
Allegato 35 spettro di massa della reazione CR064.....	120
Allegato 36 spettro di massa della reazione CR049.....	121
Allegato 37 spettro di massa della reazione CR001.....	122
Allegato 38 spettro di massa della reazione CR005.....	123
Allegato 39 spettro di massa della reazione CR003.....	124
Allegato 40 spettro di massa della reazione CR007.....	125
Allegato 41 spettro di massa della reazione CR011.....	126

ABSTRACT

Il presente lavoro di tesi si è focalizzato sulla ricerca di nuove metodologie di sintesi di fosfolipidi modificati ad alto valore aggiunto partendo da fosfolipidi naturali.

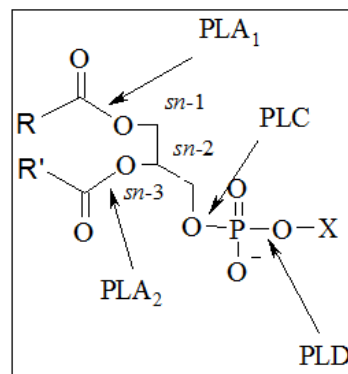
Sfruttando un processo già noto e messo a punto nel nostro laboratorio di tesi, di sostituzione, in ambiente bifasico solvente organico/acqua, della testa polare della fosfatidilcolina naturale mediante transfosfatidilazione catalizzata dall'enzima fosfolipasi D da *Streptomyces* PMF in presenza di un nucleofilo opportuno, è stata studiata la possibilità di migliorare le rese e la selettività delle reazioni condotte in modo classico mediante l'utilizzo di una nuova categoria di solventi: i liquidi ionici. La principale motivazione sull'utilizzo di questi particolari solventi nelle trasformazioni enzimatiche dei fosfolipidi è dovuta alla possibilità di diminuire/eliminare la reazione collaterale non desiderata di idrolisi nelle biotrasformazioni dei fosfolipidi per migliorare le rese e soprattutto le procedure di purificazione del prodotto finale che in questo campo risultano essere molto lunghe e onerose. Nella sintesi del fosfatidilglicerolo e della cardiolipina, fosfolipidi ad alto valore aggiunto e di grande interesse nel campo biomedico, i risultati ottenuti utilizzando il [BMIm][PF₆] sono molto promettenti.

SOMMARIO

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di esplorare il possibile utilizzo di una nuova categoria di solventi, i liquidi ionici, come mezzi di reazione nel campo delle biotrasformazioni di un'importante classe di biomolecole: i fosfolipidi (PLs).

Essendo i principali componenti delle membrane cellulari della maggior parte degli organismi viventi, i fosfolipidi rivestono un ruolo strutturale e funzionale. I fosfolipidi, quindi, a causa della loro evidente biocompatibilità, sono al centro di diverse aree di ricerca. L'enorme interesse scientifico è dovuto alla loro peculiare struttura e alle loro molteplici applicazioni. Essi sono importanti, e spesso fondamentali, componenti in numerose applicazioni di ricerca e industriali nel campo biomedico, diagnostico, biotecnologico e cosmetico.

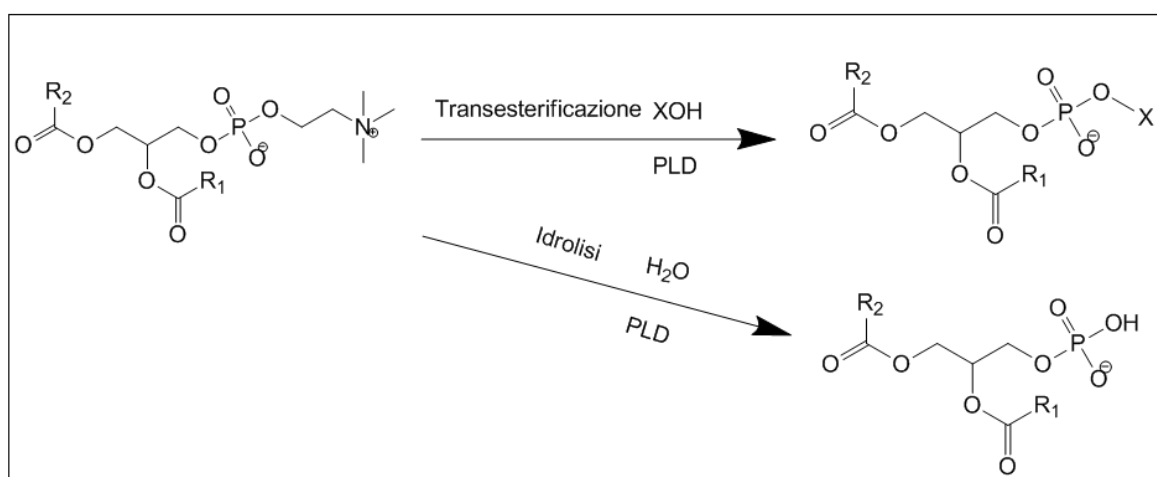
La struttura base comune a tutti i fosfolipidi è costituita dallo scheletro del glicerolo esterificato in posizione *sn*-1 e *sn*-2 con due code di acidi grassi che possono contenere anche insaturazioni (parte idrofobica, RCOO e R'COO) e in posizione *sn*-3 con un estere fosforico (testa polare idrofila, OPO₃X).



Dalla loro struttura discendono le proprietà anfifiliche di queste sostanze che hanno, di conseguenza, la capacità di formare particolari aggregati (come le micelle e i monostrati di fosfolipidi) soprattutto quando si trovano a contatto con l'acqua.

In questo lavoro di tesi, si è focalizzata l'attenzione sulla trasformazione dei fosfolipidi naturali (in particolare della fosfatidilcolina proveniente dalla soia) in altri fosfolipidi sia naturali che non, ad alto valore aggiunto, per catalisi enzimatica. I fosfolipidi naturali

sono ottenuti, in generale, catene aciliche e teste polari, soprattutto dai semi di soia, diversi oli vegetali, rosso d'uovo e biomasse. La parziale purificazione dei fosfolipidi è possibile per estrazione con solventi e cromatografie ma la sintesi totale dei fosfolipidi è molto complessa e soprattutto costosa. A causa di ciò, l'utilizzo di enzimi che permettono di modificare, con metodi biocatalitici, la struttura base dei fosfolipidi è oggetto di numerosi studi. Il successo della biocatalisi risiede nelle sue capacità di realizzare reazioni spesso difficilmente ottenibili con la chimica tradizionale se non con costi superiori e con tutta una serie di problemi di purificazione e di inquinamento ambientale. Gli enzimi che vengono utilizzati per effettuare tali trasformazioni sono le fosfolipasi, categoria di enzimi appartenenti alla classe degli enzimi idrolitici. Esistono 6 tipi di fosfolipasi (A_1 , A_2 , C, D, L_1 e L_2), ognuno dei quali risulta essere selettivo per uno dei legami della molecola di PL. Per questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata focalizzata principalmente sulla fosfolipasi D da *Streptomyces PFM* (PLD) al fine di ottenere fosfolipidi con la testa polare modificata. Questo enzima ha la capacità di catalizzare sia la reazione di idrolisi della PC (per sintetizzare l'acido fosfatidico, PA) sia quella di transesterificazione con un alcool (per sintetizzare il fosfolipide con la testa polare modificata, PX). La PLD ha, quindi, la capacità di trasferire un nucleofilo (l'alcool XOH) sulla testa polare dei PLs anche in presenza di acqua.



Il principale problema della reazione di transesterificazione è la formazione di acido fosfatidico come sotto-prodotto indesiderato che abbassa le rese di reazione e obbliga

ad effettuare altri complessi passaggi cromatografici per la purificazione del prodotto desiderato. La possibilità di aumentare la selettività della reazione può permettere, quindi, di semplificare la sintesi dei fosfolipidi naturali e non. A tale proposito, i liquidi ionici (ILs) possono essere utilizzati come mezzi di reazione innovativi.

I liquidi ionici sono sali organici con una temperatura di fusione inferiore a 100 °C e presentano numerose proprietà fisico-chimiche che li rendono di particolare interesse e importanza.

Essi possono, quindi, fungere da complemento/alternativa ai solventi organici, essendo in grado spesso di lavorare meglio di questi ultimi: molti enzimi mostrano, infatti, una migliore attività catalitica e una più elevata selettività verso il substrato in presenza di questi particolari solventi.

Uno degli aspetti più interessanti per l'utilizzo dei liquidi ionici in biocatalisi, è la possibilità di riutilizzare il sistema di reazione: gli enzimi (soprattutto quelli supportati) possono essere recuperati dal sistema di reazione, poiché non vengono solubilizzati dal liquido ionico, e riutilizzati per più cicli senza perdita di attività catalitica oppure l'intero sistema liquido ionico/enzima può essere più volte utilizzato per effettuare la reazione di interesse. Accanto a questo aspetto vi è un ulteriore vantaggio derivante dall'utilizzo di questi particolari solventi: i liquidi ionici consentono l'eliminazione o la riduzione di reazioni secondarie legate alla presenza dell'acqua nell'ambiente di reazione. La sostituzione della fase acquosa con un liquido ionico, infatti, evita che si verifichino reazioni indesiderate.

Gli scopi del presente lavoro di tesi sono stati quindi i seguenti:

- a. studiare l'attività della fosfolipasi D nei liquidi ionici;
- b. sintetizzare fosfolipidi modificati dalla fosfatidilcolina naturale proveniente dai semi di soia in sistemi contenenti liquidi ionici;
- c. effettuare sintesi enzimatiche di lisofosfolipidi (LPLs) modificati in liquidi ionici.

CAPITOLO 1: I FOSFOLIPIDI

1.1 INTRODUZIONE

I fosfolipidi costituiscono una vasta classe di composti caratterizzati dalla presenza di un gruppo fosfato legato a un gruppo polialcolico o amminoalcolico e da una o più catene idrocarburiche apolari. I glicerofosfolipidi (figura 1.1) costituiscono la classe più abbondante in natura. Sono costituiti dallo scheletro del glicerolo, da un gruppo fosforico in posizione *sn-3*, esterificato con un alcol di varia natura e da due catene lipofile di acidi grassi in posizione *sn-1* ed *sn-2*¹.

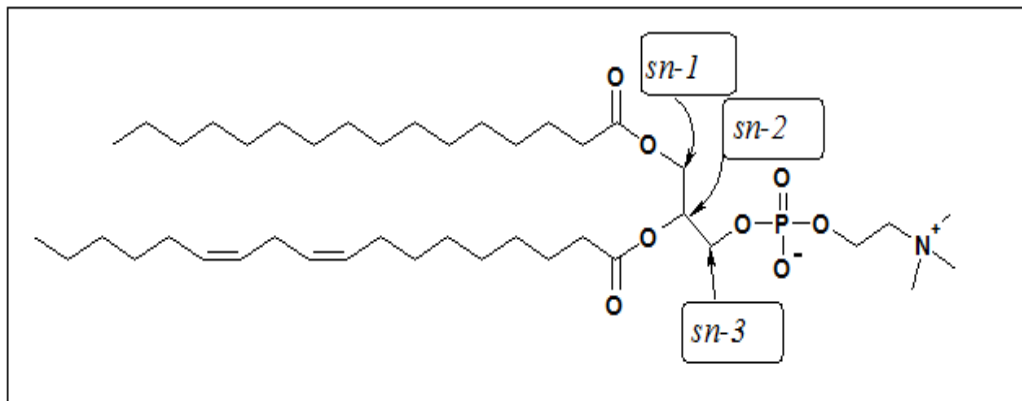


Figura 1.1 Struttura di un comune glicerofosfolipide: la fosfatidilcolina (PC).

Nei glicerofosfolipidi di origine naturale la lunghezza delle catene lipofile varia da 12 a 22 atomi di carbonio; la posizione *sn-1* è normalmente esterificata con acidi grassi saturi mentre, in *sn-2* spesso si trovano acidi grassi insaturi.

La testa polare è invece composta da un gruppo fosforico e da un alcol di varia natura che influenza le proprietà fisiche dei fosfolipidi: la PC e la fosfatidiletanolamina (PE) sono molecole zwitterioniche a pH 7 mentre l'acido fosfatidico (PA) è anionico.

Nella figura 1.2 sono indicati i vari gruppi funzionali che possono sostituire la colina nella esterificazione del gruppo fosforico ed il nome assunto dai rispettivi fosfolipidi. I corrispondenti lisofosfolipidi mantengono lo stesso nome preceduto dal prefisso liso-.

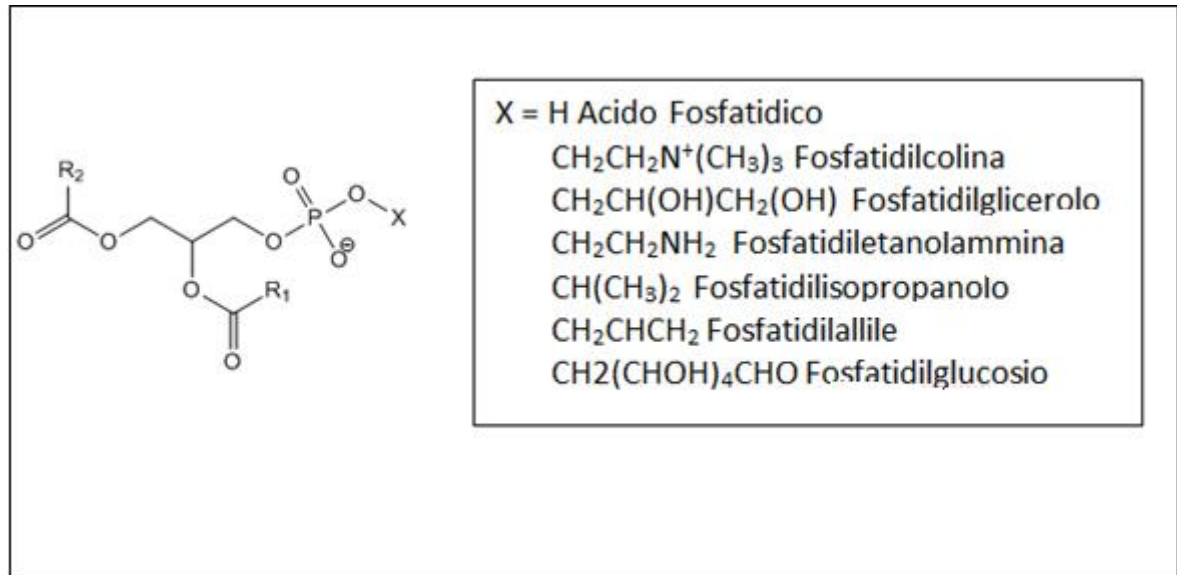


Figura 1.2 Principali costituenti della testa polare nei glicerofosfolipidi.

I lisofosfolipidi (figura 1.2) sono una importante sottoclasse dei glicerofosfolipidi in cui, lo scheletro del glicerolo è esterificato con una sola catena di acido grasso. Essi si formano in natura per azione delle fosfolipasi, enzimi che hanno la capacità di idrolizzare selettivamente una catena di acido grasso dalla posizione *sn-1* (fosfolipasi A₁) oppure *sn-2* (fosfolipasi A₂) dei fosfolipidi. I lisofosfolipidi con la posizione *sn-2* libera sono più abbondanti.

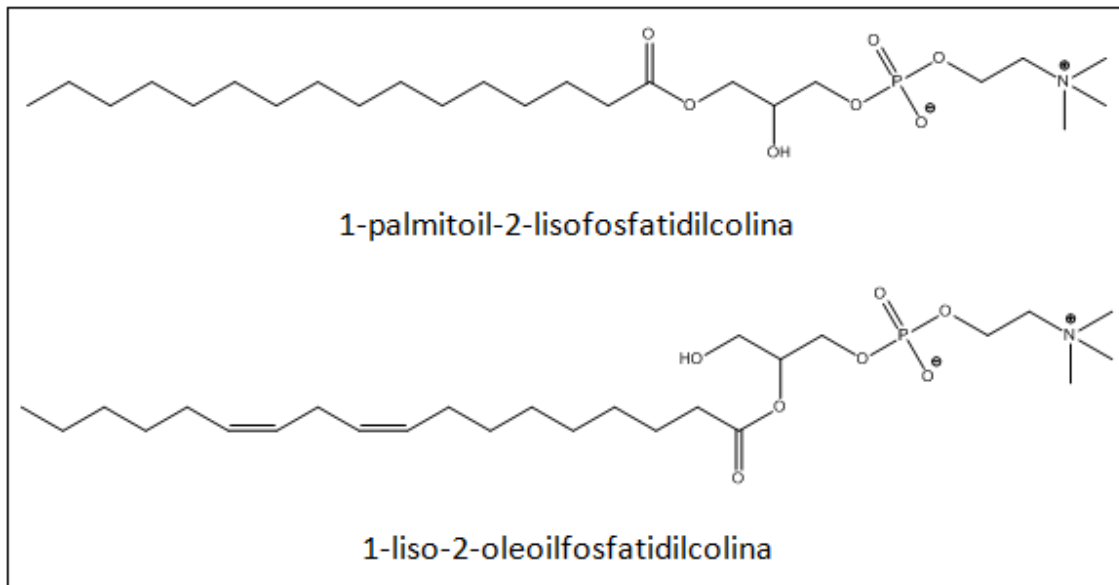


Figura 1.3 Struttura dei lisofosfolipidi.

1.2 NOMENCLATURA

La nomenclatura IUPAC² definisce i glicerofosfolipidi come fosfodiesteri derivati dell'1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfato. Il prefisso *sn* (stereospecific numbering)³ precede la numerazione del glicerolo prochirale assumendo che il gruppo alcolico secondario sia in configurazione assoluta (S). Il composto in figura 1.1 prende quindi il nome di 1-esadecanoil-2-(9Z,12Z-octadecadienoil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina. Questa nomenclatura è tuttavia raramente utilizzata per la sua complessità.

I fosfolipidi contenenti catene idrofobiche non definite vengono denominati in base al tipo di testa polare in posizione *sn*-3.

Pertanto il fosfolipide più abbondante in natura che reca la colina alla testa polare e delle catene aciliche di composizione mista viene chiamato fosfatidilcolina, mentre nel caso la colina sia sostituita da etanolamina, il composto prende il nome di fosfatidiletanolamina.

Nei fosfolipidi con catene aciliche definite è invece necessario nominare anche il tipo e la posizione degli acidi grassi.

Il composto in figura 1.1 contenente acido palmitico in posizione *sn*-1 e acido linoleico in posizione *sn*-2 viene comunemente chiamato 1-palmitoil-2-linoleoil-fosfatidilcolina (PLPC).

La nomenclatura IUPAC definisce i lisofosfolipidi come derivati dell' 1-acil-2-idrossi-*sn*-glicerolo-3-fosfato nel caso la catena lipofila sia in posizione *sn*-1, mentre se la catena acilica sta in *sn*-2 come derivati dell'2-acil-1-idrossi-*sn*-glicerolo-3-fosfato. I composti in figura 1.2 vengono dunque rispettivamente chiamati 1-esadecanoil-2-idrossi-*sn*-glicerolo-3-fosfolina ed 1-idrossi-2-(9Z,12Z-octadecadienil)-*sn*-glicerolo-3-fosfolina.

La nomenclatura più comune che verrà utilizzata in questa tesi chiama le stesse molecole 1-acil-2-lisofosfolipidi. I composti con il gruppo secondario libero; 2-acil-1-lisofosfolipidi i derivati con il gruppo alcolico primario libero.

1.3 PROPRIETA' FISICHE DEI FOSFOLIPIDI

I fosfolipidi appartengono alla classe delle molecole anfifiliche, per la loro capacità di instaurare contatti di varia natura con solventi sia polari che apolari. Ciò è dovuto alla peculiare struttura chimica in cui, le lunghe catene di acidi grassi costituiscono la parte idrofoba, la testa polare costituisce la porzione idrofila. Essi hanno la tendenza ad interagire con un solvente organico apolare con le catene idrofobiche e con un solvente polare come l'acqua nella testa polare. Uno schema dei principali stati di aggregazione dei fosfolipidi è riportato in figura 1.4. La forma e le dimensioni variano a seconda della concentrazione e della struttura chimica dei fosfolipidi. Il pH, la forza ionica della soluzione, la temperatura e la pressione possono inoltre influenzarne le caratteristiche.

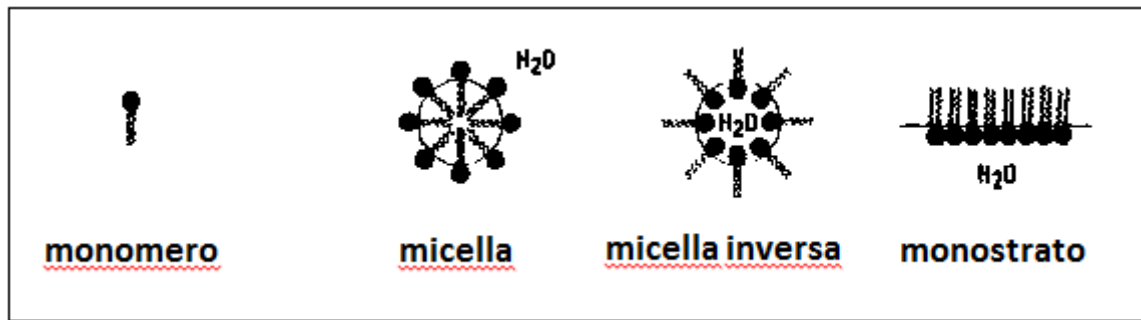


Figura 1.4 Principali aggregati fosfolipidici.

Se dispersi in una soluzione acquosa, i fosfolipidi formano delle micelle⁴ in cui viene minimizzato il rapporto area superficiale/volume; le teste polari si dispongono sulla superficie delle micelle ed interagiscono con l'acqua; le catene lipofile rimangono invece segregate all'interno delle micelle. Le interazioni delle catene apolari con l'acqua sono limitate se l'impaccamento è maggiore.

In presenza di solventi organici⁵ i fosfolipidi formano invece microemulsioni e si aggregano a formare micelle inverse, costituite da un "core" polare che può confinare sia acqua sia specie polari oppure ioni. Le catene lipofile costituiscono la cosiddetta "palizzata" che è esposta al solvente organico generalmente apolare della dimensione variabile tra i 20 e i 200 Å, circondato da uno monostrato fosfolipidico. In questo caso, la superficie delle micelle inverse è costituita dalle catene di acidi grassi, mentre le teste polari stanno all'interno.

Le proprietà fisiche di queste microemulsioni dipendono principalmente dal rapporto tra la molarità del solvente e la molarità del fosfolipide⁸. All'interfaccia acqua-aria si ha la formazione di un monostrato, caratterizzato dall'aver le catene idrofobiche nell'aria e le teste polari in acqua.

1.4 FOSFOLIPIDI NEGLI ORGANISMI VIVENTI

La membrana cellulare di organismi eucarioti e procarioti è costituita da un doppio strato lipidico all'interno del quale sono incastonate le proteine di membrana⁹ (figura 2.6). La composizione della membrana cellulare ed il contenuto in fosfolipidi varia da un tipo di cellula all'altro.

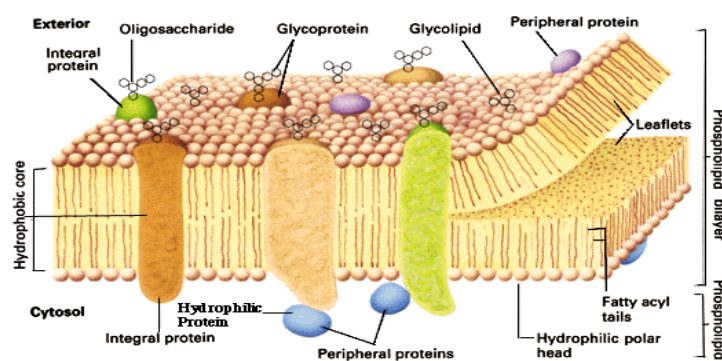


Figura 1.5 Sezione di una membrana cellulare.

Nella membrana cellulare sono state identificate cinque classi di composti lipidici: glicerofosfolipidi, glicerolipidi, sfingofosfolipidi, sfingolipidi, steroli. I glicerofosfolipidi sono la classe più abbondante.

La composizione specifica tuttavia varia da cellula a cellula ed è caratteristica di ogni specie vivente. Il numero di differenti lipidi presenti nella membrana può essere estremamente elevato. Nelle cellule maggiormente sviluppate se ne possono trovare fino a 700 diversi. Il ruolo di ogni singolo lipide non è stato ancora completamente chiarito. Alcuni fosfolipidi sono implicati nella trasduzione del segnale da extra a intracellulare¹⁰: accoppiati alle fosfolipasi fungono da regolatori e attivatori delle funzioni metaboliche cellulari modulando l'apertura di varie proteine canale, che regolano la concentrazione intracellulare di ioni Ca, Na, K ed altri.

Di grande importanza è il ruolo che i fosfolipidi hanno nella mediazione dei processi infiammatori: l'acido arachidonico che si libera dai fosfolipidi di membrana, per azione della fosfolipasi A₂ è il precursore biosintetico delle prostaglandine e dei leucotrieni. Questa via metabolica è stata lungamente studiata in quanto i farmaci antinfiammatori agiscono a questo livello.

Nella bile vengono sfruttate le proprietà anfifiliche dei fosfolipidi: la loro azione emulsionante è fondamentale per la digestione dei grassi assunti con l'alimentazione.

Nel sangue, invece, assemblati in chilomicroni, sono responsabili del trasporto di colesterolo e di altre sostanze grasse alle cellule.

Alcune patologie possono essere poste in relazione con una modificazione della composizione dei fosfolipidi.

Nel caso di tumori maligni è stata trovata una variazione della concentrazione e della composizione dei fosfolipidi plasmatici: sono stati riscontrati alti valori di acido lisofosfatidico (LPA) nei pazienti affetti da tumore ovarico¹¹ mentre, nel tumore al seno, esiste una chiara correlazione tra la patologia e la composizione e concentrazione di fosfolipidi¹².

Con la progressiva comprensione di queste correlazioni si sta sviluppando la possibilità di utilizzare i fosfolipidi come biomarkers per l'individuazione e la classificazione dei vari tipi di tumore.

Tra gli organismi procarioti è interessante notare, per comprendere la funzione strutturale di queste molecole, come alcuni batteri si adattano a cambiamenti dell'ambiente circostante (temperatura, pressione idrostatica, pH, etc) alterando la composizione degli acidi grassi nei fosfolipidi di membrana. Ciò permette loro di mantenere la stessa struttura, dimensione e forma in diverse condizioni.

I fosfolipidi costituiscono infine una importante riserva energetica che in caso di carenza di zuccheri, proteine o grassi comuni, può fornire l'energia necessaria per i processi metabolici degli organismi viventi.

1.5 APPLICAZIONI TECNOLOGICHE

I fosfolipidi vengono impiegati in numerosi processi tecnologici per la loro capacità di formare strutture sovramolecolari. In ambiente acquoso si associano formando micelle o strutture lamellari e possono interagire con lipidi ed altre molecole anfifiliche per dare miscele di fasi immiscibili: sono pertanto eccellenti agenti surfattanti ed emulsionanti. Queste proprietà sono sfruttate industrialmente per la produzione di vernici e coloranti. Nell'industria alimentare la fosfatidilcolina (E 322) è un emulsionante di uso comune, nell'industria cosmetica è inserita nella formulazione di numerose creme basi e lozioni.

Una proprietà molto interessante dei fosfolipidi è costituita dal fatto che si possono associare per formare membrane a doppio strato, dette liposomi, che agiscono da barriere fisiche e separano la stessa fase acquosa in zone distinte.

1.5.1 I liposomi

I liposomi¹³ sono particelle lipidiche circondate da uno o più strati vicini di fosfolipidi. Queste strutture racchiudono un volume acquoso o semplicemente spazio e si formano spontaneamente quando più strati di fosfolipidi vengono dispersi in acqua dando vita a un certo numero di vescicole che hanno dimensioni variabili da qualche decina di nm a qualche decina di μm . Le caratteristiche dei liposomi (densità di carica, fluidità della membrana, permeabilità, grandezza e forma) dipendono dalla loro composizione chimica, cioè dai fosfolipidi che li costituiscono. Generalmente la grandezza viene utilizzata per classificare i liposomi (Figura 1.6), in base ad essa essi vengono divisi in:

- vescicole multilamellari (MLV), cioè vescicole con un'ampia scala di dimensioni (100-10000 nm) costituite da più lamelle concentriche che possono contenere lo stesso volume (se sono equispaziate) o volumi differenti (se sono separati da spazi di dimensioni diversi);

- vescicole unilamellari piccole (SUV), sono i liposomi più piccoli possibile. Questo limite varia in accordo con la forza ionica delle soluzioni acquose e con la composizione lipidica della membrana ma è compresa tra i 20 e i 50 nm;
- vescicole unilamellari larghe (LUV) sono identiche alle precedenti ma hanno diametri superiori ai 50 nm.

I liposomi devono essere preparati a temperature superiori a quella di fusione delle catene di acidi grassi, al fine di mantenere gli strati lipidici in uno stato liquido-cristallino. La temperatura di fusione dipende dal tipo di testa polare e dalla lunghezza della catene alchilica.

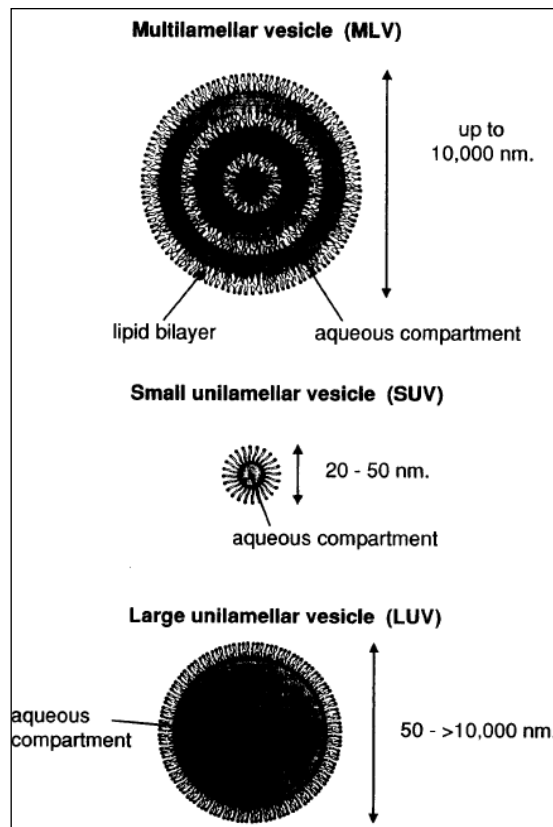


Figura 1.6 Classificazione dei liposomi.

La carica dei liposomi, fondamentale per determinare le loro interazioni con le strutture circostanti, è ovviamente dipendente dai fosfolipidi che compongono i liposomi stessi e può essere misurata valutando la loro mobilità in un campo elettrico.

I liposomi sono strutture così simili alle cellule da poter essere usate per studiare i fenomeni cellulari, in modo particolare il trasporto di sostanze¹³. Grazie alla loro biocompatibilità, essi possono essere anche usati come trasportatori di farmaci o altri agenti terapeutici (farmaci contro il cancro, fungicidi, antibiotici e antivirali) direttamente nei siti di interesse. All'interno della cavità racchiusa dallo strato lipidico, possono, infatti, essere ospitate le sostanze di interesse senza che queste subiscano delle modifiche poiché risultano essere isolate dall'ambiente circostante grazie alla struttura del liposoma. I liposomi possono incorporare e liberare sia sostanze lipofile che idrofile e possono essere usati come carriers non tossici per farmaci insolubili. Per svolgere la funzione di veicoli di farmaci, si sfrutta l'elevata biocompatibilità dei liposomi e la loro capacità di interagire con altre specie molecolari; tale capacità è influenzata dalla loro composizione in termini di lipidi.

Quando i liposomi hanno raggiunto il sito di interesse, rilasciano la sostanza in essi contenuta attraverso vari modi: adsorbimento, endocitosi, scambio di materiale o fusione.

I vantaggi forniti dall'utilizzo di tali strutture, rispetto alle tradizionali vie di somministrazione dei farmaci, sono: (1) protezione dei principi attivi dalla degradazione ad opera di enzimi che attaccherebbero la molecole se questa fosse libera nell'organismo, (2) aumento dell'efficienza terapeutica poiché si incrementa la quantità di principio attivo effettivamente utilizzabile nel tessuto malato, (3) rilascio controllato dei farmaci e (4) diminuzione degli effetti collaterali.

Il principale problema connesso all'utilizzo dei liposomi è la loro instabilità alle aggressioni chimiche, meccaniche e biochimiche, soprattutto a lungo termine; a questo proposito occorre ricordare che i farmaci da somministrare devono risultare sufficientemente stabili e conservarsi inalterati per almeno un anno. Le dispersioni liposomiali, invece, vanno incontro a degradazione per via ossidativa (soprattutto i liposomi contenenti catene di acidi grassi insaturi) e per via idrolitica in acqua (i quattro legami esterei della molecole fosfolipidica sono, infatti, attaccate dalle fosfolipasi). In più i liposomi vengono degradati dal sistema macrofagocitario del pancreas.

Per superare tali limiti, si studia la possibilità di sintetizzare fosfolipidi polimerizzabili che stabilizzano stericamente il liposoma. In questo caso si crea una barriera sterica che inibisce l'adsorbimento delle componenti del sangue che richiamano i macrofagi.

I liposomi trovano inoltre applicazione nell'imaging per la diagnosi di tumori, come adiuvanti dei vaccini, come agenti cosmetici (per creare una fase stabile che unisce acqua e olii) e come vettori nella terapia genica.

1.5.2 Farmaci antitumorali

Con il termine cancro si indica la presenza di una massa di cellule che proliferano in modo incontrollato e che presentano un certo grado di similitudine con le loro cellule di origine. I tumori maligni sono spesso letali, soprattutto per invasione diretta dei tessuti d'origine e di quelli circostanti e per formazione di metastasi in luoghi distanti dal sito di origine del tumore¹⁴.

La cura più efficace, ad oggi, è rappresentata dalla chemioterapia sistemica, il cui obiettivo è l'eradicazione di tutte le cellule neoplastiche (guarigione). Per fare ciò occorre prima ridurre con la terapia chirurgica e/o radiante la massa neoplastica e poi procedere con la chemioterapia. Essa, in una piccola parte degli ammalati, risulta essere curativa o comunque garantisce una remissione prolungata ma nella maggior parte dei casi essa provoca solo una regressione della malattia¹⁵.

La ricerca in questo campo è, quindi, sempre molto attiva al fine di garantire i migliori risultati senza gravi effetti collaterali. A questo proposito, i fosfolipidi (soprattutto la fosfatidilcolina e i suoi derivati) possono garantire l'effetto desiderato: nell'organismo, infatti, fosfolipidi e lisofosfolipidi si occupano della regolazione della divisione cellulare; è pertanto possibile pensare di utilizzare tali composti al fine di indurre l'apoptosi delle cellule cancerogene.

In questo campo, i composti che hanno destato maggiore interesse sono le alchilfosfocoline (APC). Esse sono un gruppo di composti, derivati dalla fosfatidilcolina (di cui conservano, generalmente, la testa polare e una lunga catena idrocarburica) che

mostrano una spiccata attività antitumorale grazie alla loro capacità di interferire con la trasmissione dei segnali cellulari.

Il meccanismo di azione di tali composti è il seguente: grazie alla loro somiglianza con i fosfolipidi possono inserirsi facilmente nella membrana cellulare. Qui essi non vengono degradati chimicamente, poiché contengono il gruppo etere (non contenuto nei fosfolipidi naturali) e possono quindi accumularsi nella membrana cellulare. A questo punto sono in grado di interferire con la trasmissione dei segnali cellulari, impedendo la sintesi di nuova fosfatidilcolina (gli APC competono con i substrati naturali per la sintesi, da parte di enzimi come le fosfolipasi), ed indurre quindi la morte cellulare.

1.5.3 Biosurfattanti

I biosurfattanti¹⁶ sono composti, sintetizzati dalle cellule viventi, caratterizzati dalla proprietà di abbassare la tensione superficiale di un liquido (attraverso la formazione di emulsioni), favorendo la bagnabilità della superficie o la miscibilità tra liquidi diversi.

La capacità dei fosfolipidi di essere dei surfattanti dipende dalla loro composizione chimica e dalla loro struttura anfifilica che consente l'interazione con altre sostanze contenenti catene idrocarburiche. La maggior parte dei biosurfattanti costituiti da fosfolipidi sono anionici o neutri¹⁷ e vengono sintetizzati dall'organismo al fine di degradare le sostanze idrocarburiche e favorirne il trasporto all'interno delle cellule.

L'utilizzo di surfattanti di origine biologica ha numerosi vantaggi, tra i quali: (1) l'elevata attività a livello superficiale, (2) la resistenza al pH e alla temperatura, (3) la forza ionica di tali composti, (4) la biodegradabilità e (5) la possibilità di avere una produzione su vasta scala a costi ridotti.

I lisofosfolipidi, in particolare, mostrano spiccate proprietà come surfattanti grazie al fatto che la loro concentrazione micellare critica (CMC, cioè la concentrazione del fosfolipide al di sopra della quale esso si aggrega a formare strutture micellari) è inferiore rispetto a quella dei fosfolipidi e quindi la loro azione risulta essere più efficace già a basse concentrazioni. Tale caratteristica è tipica dei sistemi costituiti da sali biliari-fosfolipidi che si occupano del corretto assorbimento dei grassi da parte della parete

intestinale¹⁸. Questi sali sono in grado di solubilizzare grassi, altrimenti insolubili nel corpo, attraverso la formazione di micelle, uniche per forma e composizione, ad una concentrazione inferiore a quella critica.

Grazie al fatto che tali surfattanti non provocano danni all'ambiente, è possibile utilizzarli per eliminare composti dannosi per l'ecosistema (come olii industriali o altri scarti di lavorazione) e produrre erbicidi, pesticidi, cosmetici o altre preparati farmaceutici¹⁹.

1.5.4 Biomarkers

Con il termine biomarker si fa riferimento ad una qualsiasi sostanza (cellule intere, molecole come i fosfolipidi, proteine o altri prodotti genici) la cui concentrazione, misurata nel sangue o in un tessuto, riflette la presenza e/o la gravità di uno stato patologico di un organismo.

E' necessario distinguere tra i biomarkers correlati ad una patologia (disease-related biomarker) e i biomarkers correlati ai farmaci (drug-related biomarker). I biomarkers correlati ad una patologia forniscono un'indicazione sulla presenza di una predisposizione a sviluppare una certa patologia (biomarker prognostico) e/o informazioni sullo stato patologico del soggetto (biomarker diagnostico), cioè se egli al momento è affetto da tale malattia. I biomarkers correlati ad un farmaco, invece, fanno riferimento alla presenza di sostanze capaci di agire sui biomarkers specifici per una certa patologia, al fine di bloccare l'insorgenza o la progressione della malattia considerata.

Attualmente sono in corso molti studi volti ad individuare nuovi biomarkers che permettano lo sviluppo di una medicina maggiormente volta alla prevenzione e all'erogazione di cure personalizzate per ogni specifico paziente. A tale proposito, i fosfolipidi possono svolgere sia la funzione di biomarkers correlati alla patologia sia quella di biomarkers correlati ai farmaci.

Un esempio di fosfolipide appartenente alla prima categoria di biomarker è rappresentato dall'acido lisofosfatidico (LPA). Esso è un biomarker^{20,21,22} per diverse

patologie quali il glioblastoma multiforme, l'Alzheimer²³, il cancro alla prostata, il linfoma follicolare, l'epatite cronica ma soprattutto il cancro ai polmoni, il cancro alle ovaie e il melanoma (Figura 1.7).

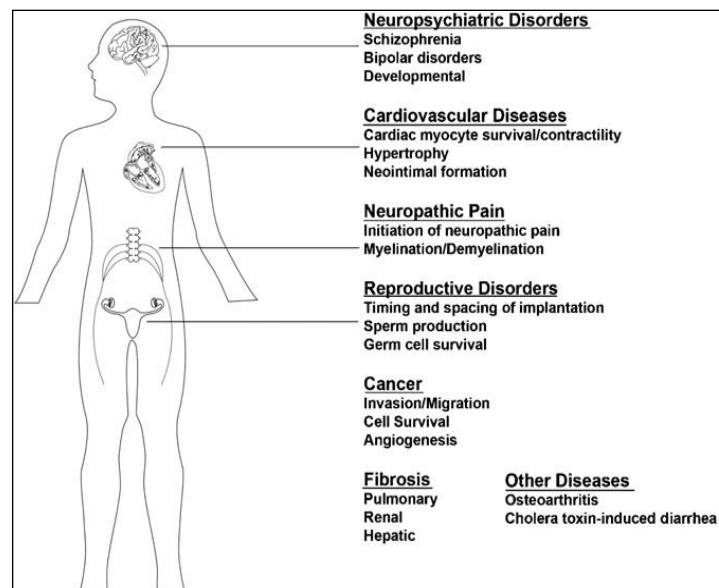


Figura 1.7 Schema delle principali patologie correlate alla maggiore presenza di acido lisofosfatidico (LPA)²⁴.

1.6 LE FOSFOLIPASI

Gli enzimi che catalizzano la rottura/formazione di specifici legami della molecola di fosfolipide sono quattro :

- la PLA₁ e la PLA₂ che attaccano le posizioni *sn*-1 ed *sn*-2;
- la PLC rompe il legame estere fra il gruppo fosfato e il glicerolo, formando il diacilglicerolo e una testa polare contenente il gruppo fosfato;
- la PLD scinde il legame estere tra il gruppo fosfato e la testa polare.

Le posizioni selettivamente attaccate dai vari enzimi sono rappresentate in figura 1.8.

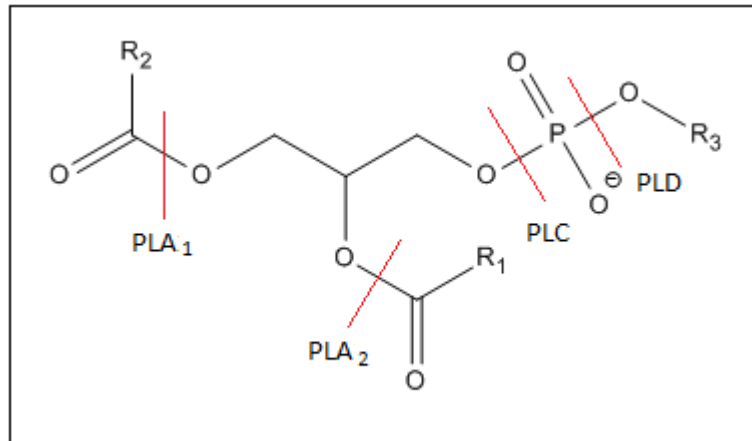


Figura 1.8 Siti di attacco delle fosfolipasi.

CAPITOLO 2: I LIQUIDI IONICI

2.1 DEFINIZIONE

I liquidi ionici sono sali organici con una temperatura di fusione inferiore a 100 °C²⁶. Essi sono costituiti da ioni positivi e negativi che conferiscono al sistema carica netta nulla e che, date le loro differenti dimensioni, impediscono al sale di formare un reticolo cristallino e lo mantengono liquido anche a temperatura ambiente^{27,30} (Room Temperature Ionic Liquids, RTILs).

I cationi sono generalmente strutture organiche a bassa simmetria il cui centro è costituito da un atomo di azoto o di fosforo caricato positivamente. Sulla base del catione, i liquidi ionici possono essere divisi in cinque gruppi (Figura 2.1)²⁸:

- A. cationi eterociclici a cinque membri
- B. cationi eterociclici a 6 membri
- C. cationi non ciclici basati su azoto, fosforo e zolfo
- D. cationi imidazolici funzionalizzati
- E. cationi chirali

Tra i possibili cationi, gli anelli dialchilimidazolici asimmetrici (soprattutto l'1-butil-3-metilimidazolo e l'1-etil-3-metilimidazolo, Figura 2.2) sono quelli maggiormente studiati poiché conferiscono al liquido ionico una bassa temperatura di fusione.

Dalla tipologia di catione, infatti, dipendono le proprietà fisico-chimiche (temperatura di fusione, viscosità, miscibilità con altri solventi, densità, conduttività) del liquido ionico che li contiene.

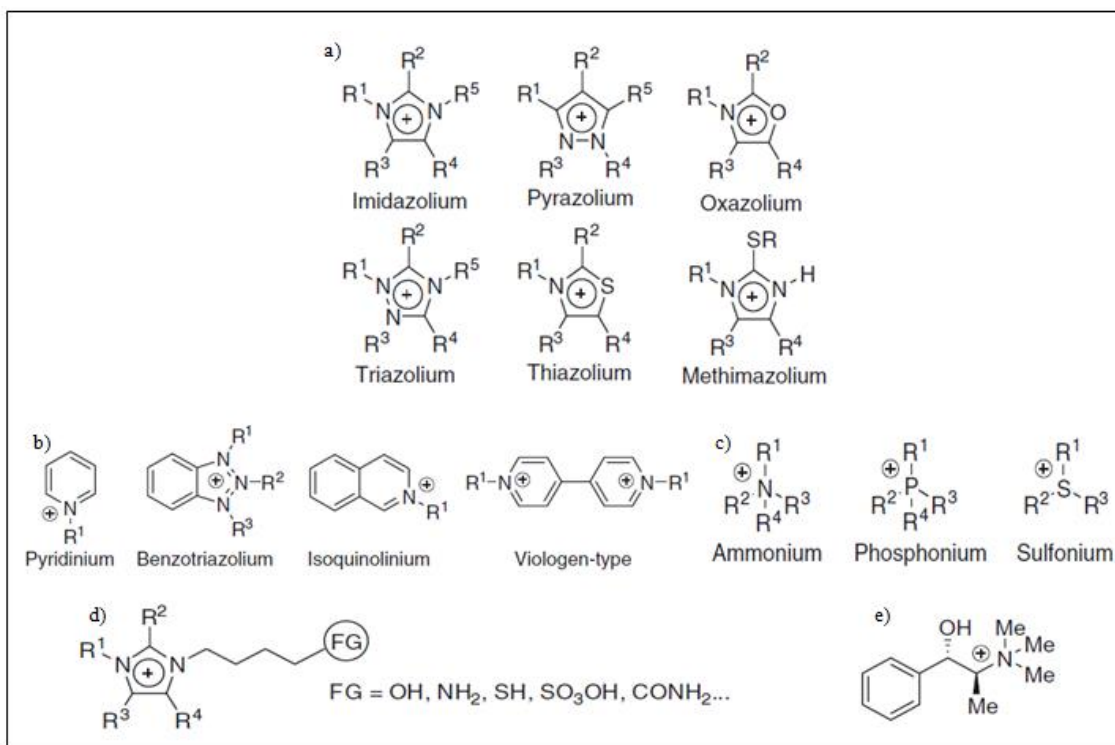


Figura 2.1 I 5 gruppi di cationi costituenti i liquidi ionici: a) cationi eterociclici a 5 membri, b) cationi eterociclici a 6 membri, c) cationi basati su azoto, fosforo, zolfo, d) cationi imidazolici funzionalizzati, e) cationi chirali.

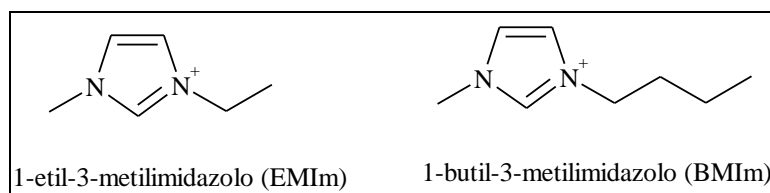


Figura 2.2 I cationi più utilizzati per sintetizzare liquidi ionici.

Gli anioni che formano liquidi ionici, sono generalmente basi inorganiche deboli o composti organici che hanno carica negativa diffusa o deprotetta. Sulla base degli anioni, i liquidi ionici possono essere divisi in sei gruppi²⁸:

- A) liquidi ionici basati su AlCl₄⁻ e sali organici
- B) liquidi ionici basati su anioni come PF₆⁻, BF₄⁻
- C) liquidi ionici basati su anioni ammidici

D) liquidi ionici basati su anioni come alchilsolfato, alchilsolfonato, alchilfosfato, alchilfosfonato ed alchilfosfinato.

E) liquidi ionici basati su anioni come acetato (CH_3CO_2^-) e trifluoroacetato (CF_3CO_2^-)

F) liquidi ionici basati su anioni borato

Dagli anioni dipendono sia le proprietà fisico-chimiche del liquido ionico che le interazioni del solvente stesso con gli enzimi.

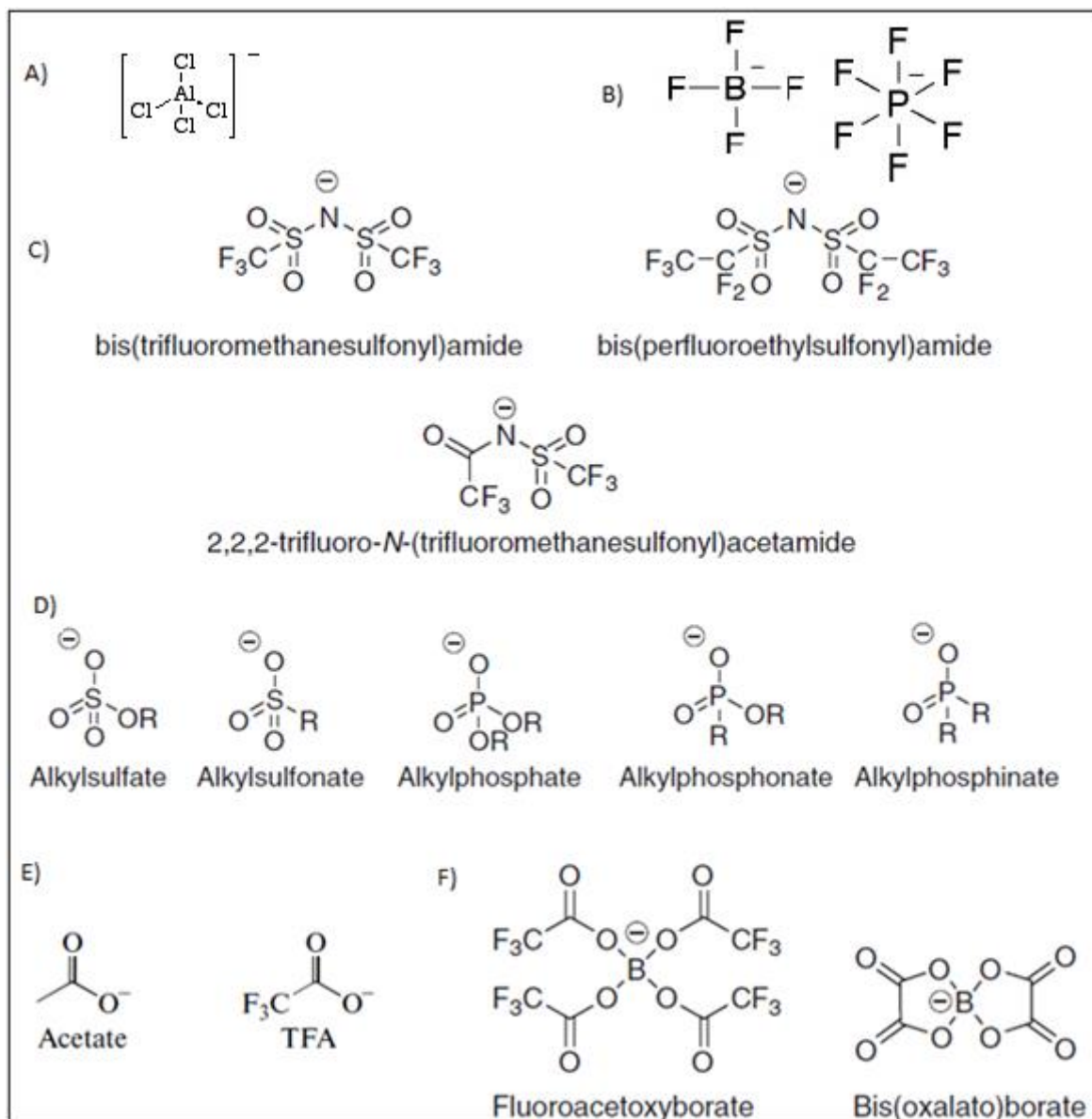


Figura 2.3 I 6 gruppi di anioni costituenti i liquidi ionici: A) ione AlCl_4^- , B) ioni come PF_6^- , BF_4^- , C) anioni immidici, D) anioni come alchilsolfato, alchilfosfato, alchilfosfonato e alchilfosfinato E) anioni acetato e trifluoroacetato, F) anioni borato.

Dalla combinazione dei numerosi cationi e anioni disponibili, è possibile ottenere oltre 10^6 liquidi ionici, con proprietà fisiche e chimiche differenti che li rendono adatti a numerose applicazioni³⁷ (sostituzione dei solventi organici nelle reazioni di biocatalisi, realizzazione di biosensori, produzione di biodiesel, applicazioni biomedicali...). Nell'ultimo decennio, infatti, l'attenzione nei confronti di queste sostanze è fortemente aumentata (Grafico 2.1) non solo in relazione alle loro possibili applicazioni ma anche grazie alla loro immagine di solventi "green" derivante dalla loro tensione di vapore nulla o quasi.

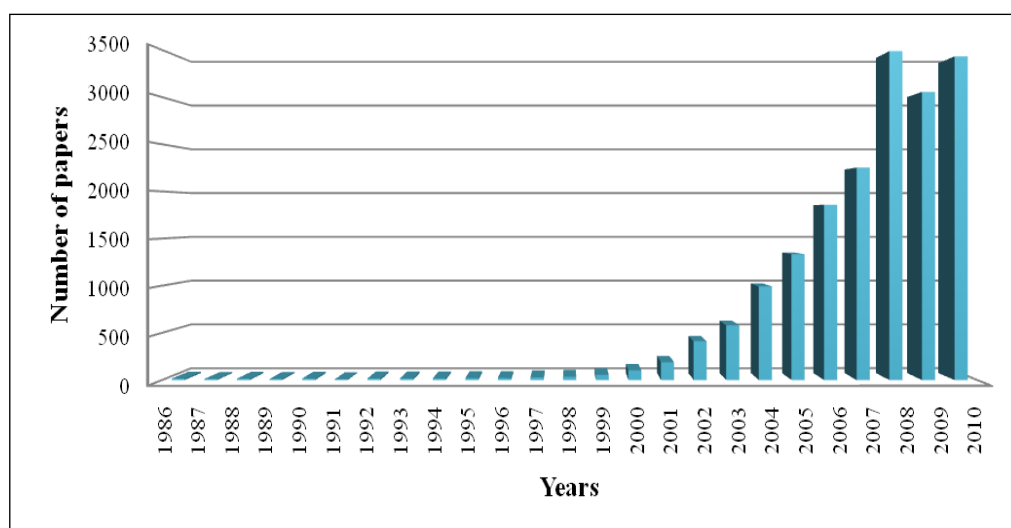


Grafico 2.1 Andamento della crescita delle pubblicazioni riguardanti i liquidi ionici dal 1986 al 2010.

2.2 SINTESI DEI LIQUIDI IONICI

La maggior parte dei liquidi ionici viene sintetizzata (Figura 2.4) a partire da un precursore del catione, ottenuto dall'alchilazione di un eterociclo azotato, per via metatetica (reazione del precursore cationico con un sale di metalli del Gruppo 1, in particolare sali di sodio o argento) o tramite reazioni di neutralizzazione acido-base³⁵. A seconda del tipo di anione scelto, il risultante liquido ionico forma un sistema bifasico con l'acqua o una soluzione omogenea con essa. Se il sistema ottenuto è bifasico, è

possibile rimuovere con acqua l'acido o il metallo presenti; se il liquido ionico è miscibile con acqua, invece, occorre rimuovere le impurezze e l'acqua presenti attraverso ripetute addizioni di CHCl_3 e successive filtrazioni (via metatetica) o attraverso addizioni di acqua e rimozioni di acqua/acido a pressione ridotta (reazione acido-base). In entrambi i casi la purificazione del liquido ionico è molto complessa e non del tutto soddisfacente, soprattutto se è stata scelta la via metatetica per sintetizzare il liquido ionico.

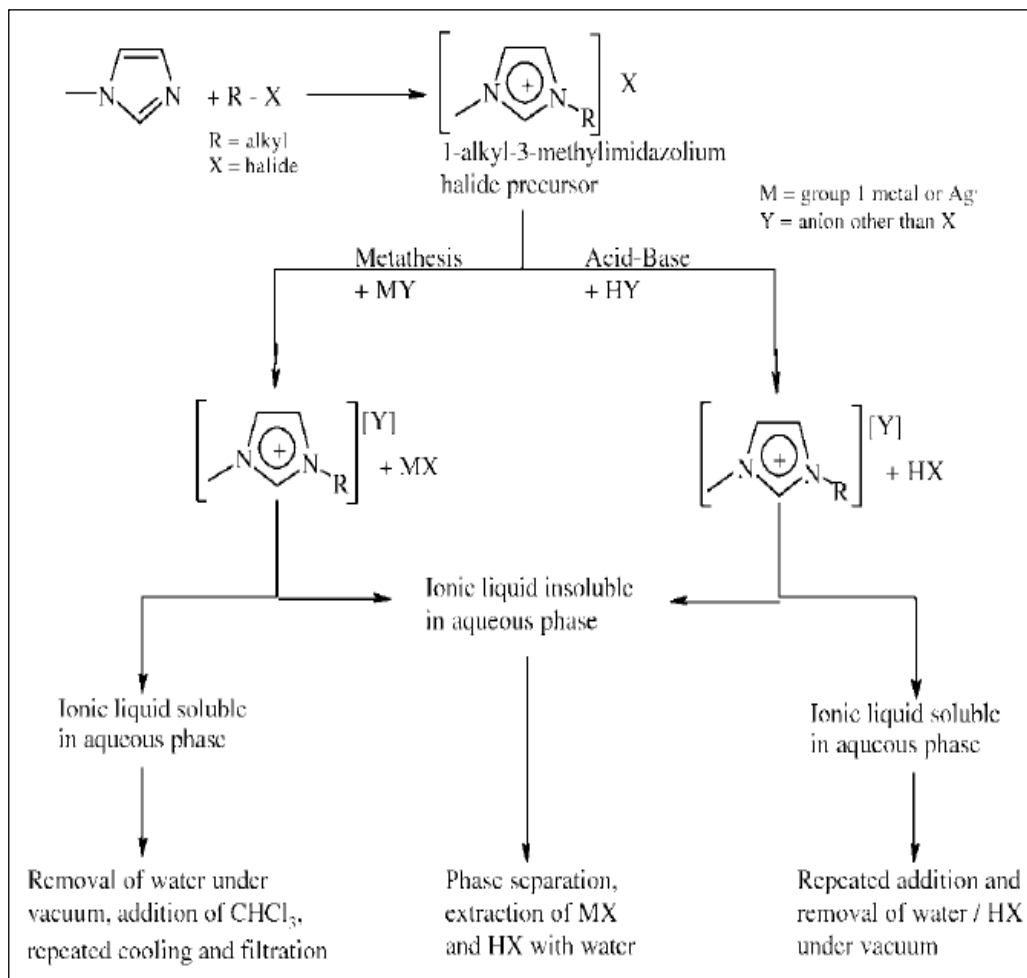


Figura 2.4 Schema della preparazione tipica dei liquidi ionici.

2.3 PROPRIETA' DEI LIQUIDI IONICI

I liquidi ionici presentano numerose proprietà fisico-chimiche che li rendono di particolare interesse :

- La possibilità di ottenere specifiche proprietà fisiche e chimiche³¹ è la proprietà più utile dei liquidi ionici. Cambiando catione e anione che compongono il liquido ionico è, infatti, possibile “disegnare” o “modificare” un set di specifiche proprietà. Il range di proprietà disponibili è considerabilmente maggiore per i liquidi ionici che non per i solventi organici tradizionali. Si parla, infatti, di “Task Specific Ionic Liquid” (TSIL) per indicare liquidi ionici le cui proprietà fisiche e chimiche sono state ottenute, per raggiungere particolari scopi, scegliendo gli ioni che compongono il solvente;
- La bassa o nulla pressione di vapore³¹ permette ai liquidi ionici di non essere dispersi nell’ambiente attraverso l’evaporazione e di essere utilizzati come solventi alle alte temperature in reazioni di biocatalisi. La non volatilità rende, quindi, i liquidi ionici dei potenziali sostituti dei solventi organici che sono al contrario volatili e perciò pericolosi per l’uomo e l’ambiente;
- Il basso punto di fusione³² rende questi sali, generalmente, liquidi a temperatura ambiente. Esso è regolato da:
 - simmetria del catione (cationi a bassa simmetria come l’1-butil-3-metilimidazolo conferiscono le temperature di fusione più basse perché impediscono la formazione del reticolo cristallino, Figura 2.5)
 - lunghezza della catena alchilica (per i cationi imidazolici, una catena costituita da meno di 7 atomi di carbonio, $n < 7$, provoca una diminuzione della temperatura di fusione dovuta ad un abbassamento della simmetria generale del catione; al contrario, catene alchiliche formate da più di 7 atomi di carbonio, provocano un aumento della temperatura di fusione per l’attrazione delle forze di van der Waals tra le catene alchiliche stesse, Grafico 2.2)
- la presenza o l’assenza di forti legami idrogeno $C-H \cdots X$ ($X=Cl, Br$; gli alogeni formano legami idrogeno che aumentano la temperatura di fusione mentre anioni come BF_4^- possono formare solo deboli legami idrogeno; l’anione PF_6^- generalmente non partecipa alla formazione di questo tipo di legami);

- La densità²⁷ a temperatura ambiente (18-30 °C) varia nell'intervallo 1,1-1,5 g/cm³, quindi è generalmente maggiore di quella dell'acqua. Dipende³² principalmente dalla struttura del catione, infatti, diminuisce con la diminuzione della lunghezza della catena alchilica ed è influenzata solo in minima parte dalla massa molare dell'anione;
- La viscosità^{27,33} è maggiore di quella dell'acqua a temperatura ambiente di un fattore che varia tra 10 e 100. L'introduzione di sostituenti ingombranti e l'allungamento della catena alchilica del catione aumenta considerevolmente la viscosità del liquido ionico.

In generale, la viscosità è influenzata:

- ❖ Dall'eventuale presenza di legami idrogeno
- ❖ Dalla basicità dell'anione e, soprattutto
- ❖ Dalle forze di van der Waals.

In base a questi fattori, si è notato che, per lo stesso catione, la viscosità dei liquidi ionici diminuisce secondo il seguente ordine di anioni: $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- \sim \text{NO}_3^- > \text{Tf}_2\text{N}^-$;

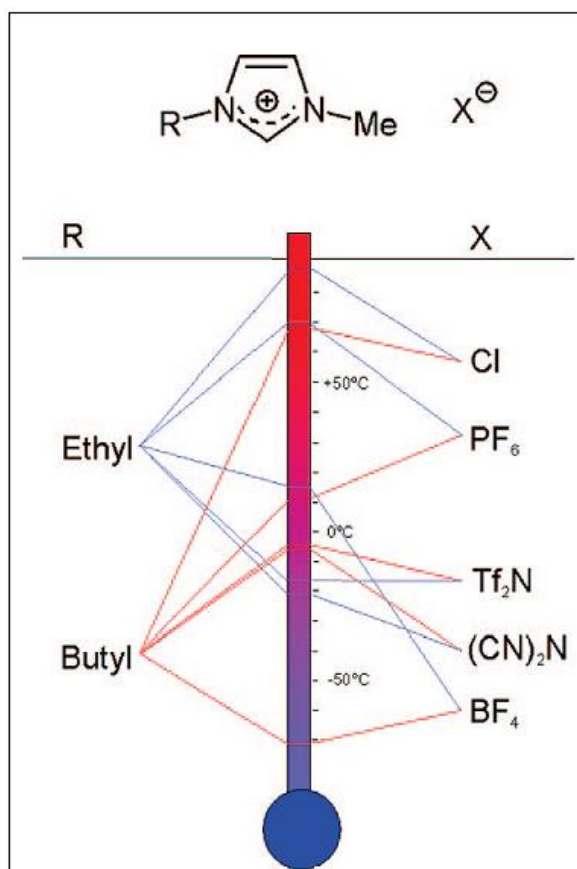


Figura 2.5 Variazione della temperatura di fusione dei liquidi ionici, basati su cationi imidazolici in relazione agli ioni presenti.

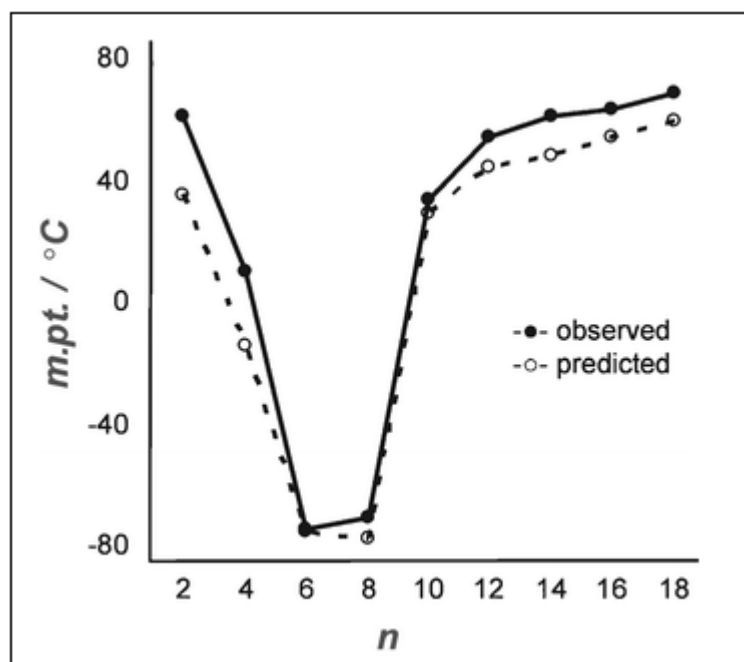


Grafico 2.2 Temperatura di fusione predetta e osservata per una serie di liquidi ionici del tipo $[C_nMIm][PF_6]$.

- La conduttività specifica²⁷ a temperatura ambiente è, generalmente, pari a 10^{-1} S/m ed è generalmente influenzata da :
 - ❖ Dalle dimensioni degli ioni (più piccolo è l'anione, più elevata è la conduttività)
 - ❖ Dal grado di dissociazione
 - ❖ Dalla viscosità (secondo un legame di proporzionalità inversa)
 - ❖ Dalla densità del liquido ionico
- La stabilità³² dei liquidi ionici è molto elevata. Essi sono non esplosivi e hanno una temperatura di decomposizione compresa tra i 300 °C e 400 °C. La decomposizione è poco legata al tipo di catione presente (anche se si è notato che i cationi imidazolici offrono la maggiore stabilità) mentre dipende maggiormente dalle caratteristiche dell'anione (la stabilità diminuisce all'aumentare dell'idrofilicità dell'anione). In generale la stabilità diminuisce in base al seguente ordine: $PF_6^- > Tf_2N^- > BF_4^- > X^-$, anche se, ioni contenenti fluoro, in presenza di acqua e a contatto con aria si decompongono liberando HF ³⁶;

- La polarità^{32,33} è correlata alla capacità del solvente di dissolvere altri composti; non si conoscono con precisione quali fattori possono influenzarla, ma si è notato che anioni, capaci di formare forti legami idrogeno, aumentano la polarità del solvente. Anche le caratteristiche dell'ambiente influenzano la polarità del liquido ionico;
- L'idrofobicità/miscibilità con acqua^{27,33} dipende da quali ioni compongono il liquido ionico, in particolare dipende dalla natura idrofila o idrofobica dell'anione (il catione ha un ruolo secondario nel determinare la miscibilità con acqua).

Anioni idrofilici (Cl^- , Br^- , NO_3^- , CH_3COO^- , TFA^-) formano liquidi ionici capaci di miscelarsi con acqua in ogni quantità; anioni come BF_4^- e TFSI, invece, compongono liquidi ionici le cui caratteristiche di idrofilicità dipendono dal tipo di anione e dalla quantità di acqua presenti (generalmente sono liquidi idrofilici). Anioni come PF_6^- e Tf_2N^- formano liquidi ionici idrofobici, immiscibili con acqua. In generale la catalisi in liquidi ionici miscibili con acqua è meno efficace di quella in liquidi idrofobici poiché la stabilità del biocatalizzatore aumenta all'aumentare dell'idrofobicità del liquido ionico stesso (anche il catione, quindi, se maggiormente idrofobico contribuisce a stabilizzare ulteriormente il catalizzatore).

Le proprietà sopra elencate, soprattutto densità e viscosità, sono influenzate dai seguenti fattori²⁶:

- Purezza del liquido ionico
- Presenza di acqua
- Presenza di cosolventi.

Le impurezze presenti con maggior frequenza nei liquidi ionici sono i sali di cloro che vengono utilizzati durante la sintesi e che restano non reagiti al termine della produzione del liquido ionico. La presenza anche di piccole concentrazioni di sali di cloro aumenta notevolmente la viscosità del liquido stesso. Seddon et al.²⁶ hanno dimostrato, aggiungendo quantità note di $[\text{C}_n\text{MIm}][\text{Cl}]$ a $[\text{C}_{4-6}\text{MIm}][\text{BF}_4]$ e $[\text{C}_{4-6}\text{MIm}][\text{PF}_6]$, che la presenza di ioni cloro fa aumentare drasticamente la viscosità e diminuire la densità del liquido ionico, secondo una relazione non lineare, a causa della formazione di legami idrogeno tra l'atomo di cloro e i protoni dell'anello imidazolico (Grafico 2.3), influenzando così il comportamento chimico del liquido ionico.

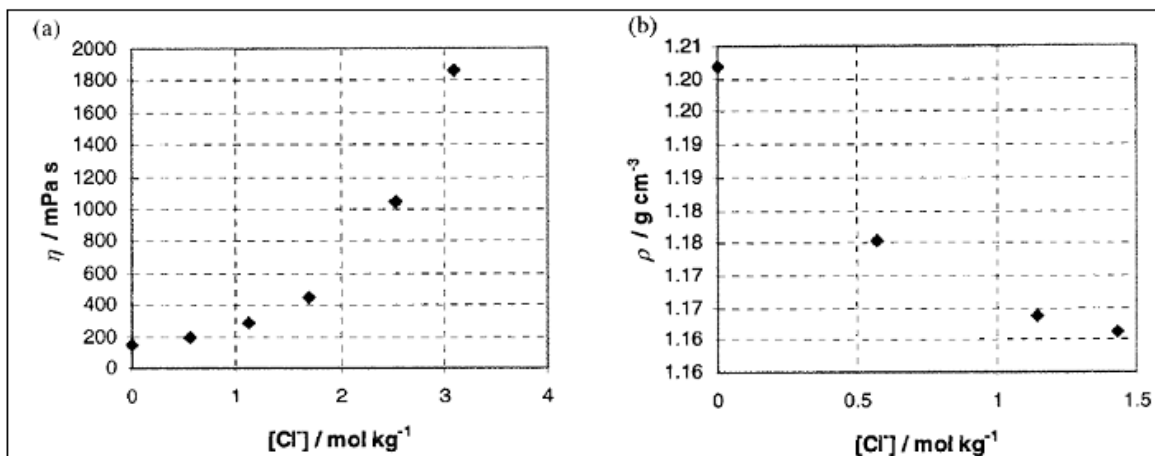


Grafico 2.3 Viscosità (η , grafico a) a 20 °C e densità (ρ , grafico b) a 30 °C di [BMIm][BF₄] vs. la concentrazione molale di ioni cloruro, aggiunti come [BMIm][Cl].

In generale, i liquidi ionici sono miscibili con solventi la cui costante dielettrica (ϵ) ha un valore medio o elevato mentre sono immiscibili con solventi dalla bassa costante dielettrica; ad esempio il [BMIm][BF₄] è completamente miscibile in metanolo ($\epsilon=32,66$) e diclorometano ($\epsilon=8,93$) mentre è miscibile solo parzialmente, fino a 50 moli %, in toluene ($\epsilon=2,38$). Seddon et al.²⁶ hanno dimostrato che acqua e altri solventi (etano nitrile, trimetiletanitrile, 2-propen-nitrile, 1-metilimidazolo, toluene, 1,4-dimetilbenzene e 1,2-dimetossietano) provocano una diminuzione della viscosità dei liquidi ionici all'aumentare della frazione molare di cosolvente stesso (Grafico 2.4). La diminuzione della viscosità è spiegabile con la riduzione della forza di attrazione elettrostatica tra gli ioni a causa della presenza delle molecole di cosolvente o di acqua.

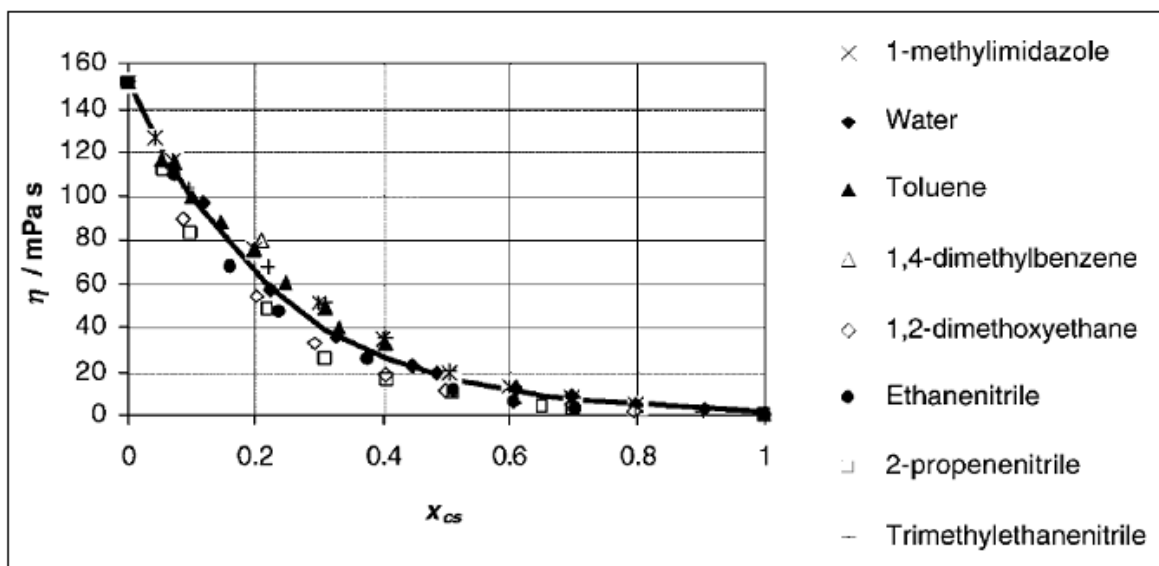


Grafico 2.4 Viscosità (η) a 20 °C di una miscela [BMIm][BF₄]-cosolvente vs. la frazione molare di cosolvente; la linea continua rappresenta il fit teorico dei dati ottenuti.

2.4 APPLICAZIONI DEI LIQUIDI IONICI

Numerose e in costante crescita sono le applicazioni²⁹ dei liquidi ionici (Figura 2.6); in molti ambiti si è sperimentata la possibilità di utilizzare questi solventi per creare dei prodotti che possano trovare spazio nei mercati anche se al momento le principali applicazioni sono limitate al campo della ricerca. Tra le possibili applicazioni dei liquidi ionici, quelle riguardanti l'elettrochimica, la biocatalisi e l'ambito biomedico sono quelle che stanno attirando maggiore interesse da parte del mercato e non solo dei ricercatori grazie alle proprietà di questi solventi che li rendono adatti a sostituire i tradizionali materiali per scopi di vario genere.

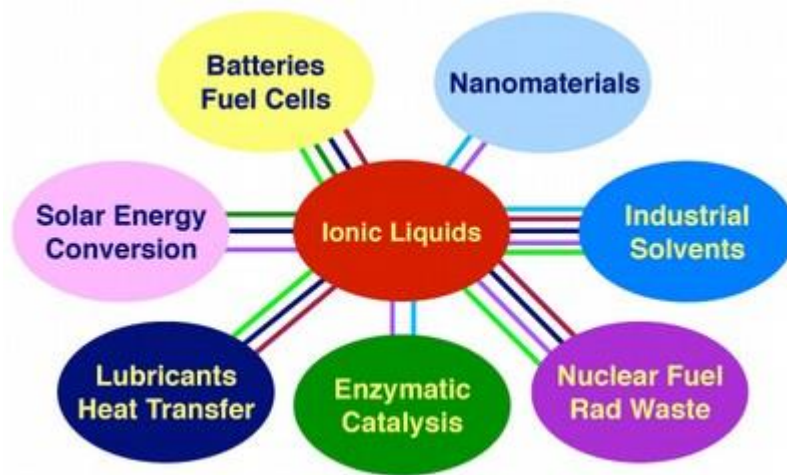


Figura 2.6 Possibili applicazioni dei liquidi ionici in campo industriale e della ricerca.

2.4.1 Biocatalisi

Con il termine biocatalisi si fa riferimento ad un processo in cui il materiale di partenza viene convertito nel prodotto desiderato utilizzando enzimi purificati o cellule intere.³⁴ La natura ha ottimizzato gli enzimi così che questi possano agire al meglio in ambiente acquoso, a pH neutro, a temperatura inferiore ai 40 °C e a bassa pressione osmotica. Queste condizioni, però, sono spesso in contrasto con la necessità di ottimizzare le reazioni organiche dal punto di vista del tempo e della resa. Vi è poi generalmente la necessità di utilizzare solventi diversi dall'acqua per migliorare la solubilità del substrato e /o del prodotto.

In generale esistono tre modi per usare i solventi organici o i liquidi ionici in un processo di biocatalisi:

- Come solventi puri
- Come co-solventi in un sistema acquoso
- Come co-solventi in un sistema bifasico.

In ognuno dei casi sopra elencati, comunque, il contenuto di acqua è di fondamentale importanza poiché generalmente una minima quantità di acqua è necessaria per mantenere l'attività dell'enzima. A questo proposito, è importante sottolineare che in generale gli enzimi non sono attivi nei solventi organici o nei liquidi ionici. Non vi è però

una regola generale per determinare se un solvente è “enzyme friendly”; spesso si utilizza il concetto di logP (logaritmo del coefficiente di partizione di un solvente in una miscela ottanolo/acqua³³). Sperimentalmente si è osservato⁴⁰, infatti, che solventi con valori di logP > 3 (esano) sono meno disattivanti di quelli con logP < 3 (etanolo). Per i liquidi ionici questa osservazione non è valida con la stessa frequenza dei solventi organici: molti liquidi (come il [BMIm][PF₆]) che hanno un logP < 3 non inattivano gli enzimi, al contrario, in alcuni casi ne aumentano la selettività e l’attività. Le interazioni tra un liquido ionico e uno specifico enzima, quindi, devono essere necessariamente verificate e studiate sperimentalmente poiché la loro predizione non è possibile con sufficiente certezza.

Quando si utilizzano i liquidi ionici per reazioni di biocatalisi, occorre considerare i seguenti aspetti³⁴:

- Le impurezze presenti nei liquidi ionici e gli ioni costituenti il liquido stesso possono portare ad un significativo cambiamento del pH e quindi all’inattivazione dell’enzima;
- Le reazioni enzimatiche sono spesso condotte in sistemi acquosi; l’aggiunta di quantità crescenti di liquido ionico può portare alla precipitazione di materiale dalla composizione non nota;
- Per mantenere l’attività enzimatica è spesso necessaria la presenza di una certa quantità di acqua che può provocare l’idrolisi del substrato;
- Gli ioni metallici richiesti da alcuni enzimi per la loro attività possono essere sequestrati dal liquido ionico stesso provocando così l’inattivazione dell’enzima;
- Gli ioni del liquido ionico e le impurezze presenti possono agire da inibitori degli enzimi;
- I liquidi ionici possono interferire con le tecniche (esempio HPLC) di valutazione dell’attività enzimatica;
- A differenza dei solventi organici, molti gruppi di ricercatori preparano loro stessi i liquidi ionici e quindi, a seconda della qualità del solvente preparato, si ottengono risultati diversi nello stesso liquido ionico (gruppi differenti di ricercatori hanno ottenuto risultati opposti per la stessa reazione condotta in liquidi ionici identici a livello nominale³⁵);

- Spesso gli enzimi liberi hanno problemi di solubilità, attività e stabilità nella maggior parte dei liquidi ionici, soprattutto se il liquido ionico è usato come solvente puro.

I fattori sopra elencati costituiscono le principali limitazioni all'utilizzo dei liquidi ionici in biocatalisi, soprattutto l'aspetto legato all'attività dell'enzima nei liquidi ionici stessi. Per migliorare l'attività enzimatica sono state rese disponibili diverse soluzioni^{38,42}; le principali e più utilizzate sono le seguenti:

- Utilizzare per quanto possibile liquidi ionici che non solubilizzano gli enzimi; si è notato, infatti, che molti enzimi liberi nei liquidi ionici idrofilici (come quelli basati su anioni acetato e cloruro) perdono la loro attività (totalmente o parzialmente) poiché vengono denaturati dal liquido ionico stesso con cui formano deboli legami idrogeno. Al contrario, molti liquidi ionici idrofobici non interagiscono con le proteine, proteggendone la struttura nativa e di conseguenza l'attività catalitica (enzimi sospesi nei liquidi ionici, infatti, mantengono la loro attività mentre quelli disciolti in esso la perdono). L'interazione tra liquido ionico ed enzima non deve quindi essere troppo forte al fine di evitare la denaturazione della proteina⁴¹;
- Aggiungere una piccola quantità di acqua per mantenere l'attività dell'enzima. L'enzima disciolto in acqua, però, mostra spesso un'attività catalitica inferiore perché subisce modificazioni conformazionali a causa della presenza del liquido ionico nell'ambiente di reazione;
- Immobilizzare enzimi su materiali di supporto offre numerosi vantaggi quali :
 - ❖ utilizzare gli enzimi in condizioni drastiche
 - ❖ riutilizzare gli enzimi in vari cicli
 - ❖ separare facilmente il prodotto
 - ❖ stabilizzare l'enzima dal punto di vista termico e operativo nell'ambiente di reazione.
- Liofilizzare gli enzimi con agenti stabilizzanti (generalmente sali inorganici, sorbitolo e glicole polietilenico/PEG) può influenzare drasticamente il livello di idratazione dell'enzima, la sua abilità di dispersione e quindi la sua stabilità nel liquido ionico;
- Creare aggregati di enzimi cross-linkati costituiti dalla proteina e da una piccola quantità di agenti leganti permette di stabilizzare notevolmente l'enzima;
- Pretrattare l'enzima con solventi organici polari;

- Creare microemulsioni di acqua/liquido ionico⁴⁴ (piccole gocce di acqua in liquidi ionici stabilizzate dalla presenza di uno strato di surfattanti);
- Utilizzare solventi organici come co-solventi per diminuire la viscosità del liquido ionico utilizzato come ambiente di reazione e per aumentare la solubilità del substrato organico che deve essere trasformato dall'enzima;
- Utilizzare i liquidi ionici come agenti immobilizzanti per gli enzimi favorisce le reazioni di biocatalisi in ambienti non acquosi (Figura 2.7).

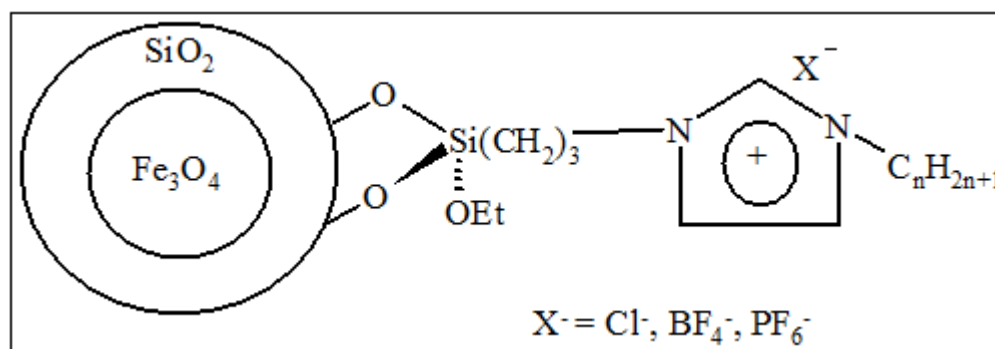


Figura 2.7 Liquido ionico funzionalizzato usato per l'immobilizzazione degli enzimi.

Gli enzimi che fino ad oggi sono stati usati nei liquidi ionici sono poco numerosi^{27,43} (Grafico 2.5) e le principali informazioni presenti in letteratura sono relative alle lipasi. Queste ultime sono infatti gli enzimi maggiormente utilizzati nei liquidi ionici grazie a :

- Capacità di catalizzare un gran numero di reazioni (transesterificazioni, esterificazioni, idrolisi...)
- Possibilità di operare anche alle alte temperature senza perdita di attività
- Stabilità in questi solventi
- Alla presenza in commercio di numerosi preparati e varianti
- Costo relativamente basso di questi enzimi

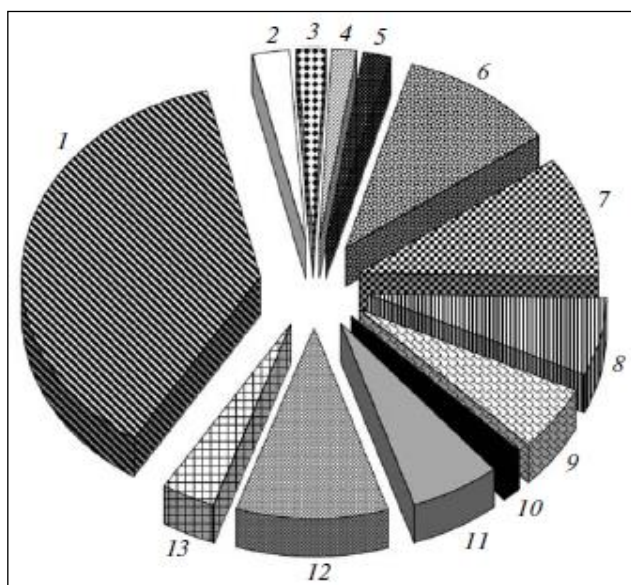


Grafico 2.5 Dati statistici sull'uso dei liquidi ionici in vari sistemi biocatalitici: (1) lipasi, (2) glicosidasi, (3) esterasi, (4) fosfatasi, (5) altre idrolasi, (6) citocromo c-ossidasi, (7) perossidasi, (8) deidrogenasi, (9) glucosio ossidasi, (10) laccasi, (11) altre ossido riduttasi, (12) proteine emetiche e (13) lieviti.

Molte delle reazioni che vengono condotte in liquidi ionici presentano alcuni vantaggi rispetto a quelle effettuate nei solventi organici o nei sistemi acquosi:

- Sono possibili rese superiori rispetto alle stesse reazioni effettuate in solventi organici.^{43,50}
- Gli enzimi possono mostrare migliore stabilità e una più elevata selettività nei confronti del substrato (enantioselettività nelle risoluzioni cinetiche e regioselettività) oltre che essere riutilizzati senza perdita di attività catalitica.
- La presenza di liquidi ionici può permettere l'eliminazione o la drastica riduzione di reazioni indesiderate, per lo più legate alla presenza di acqua nel sistema di reazione tradizionale (i liquidi ionici possono, infatti, sostituire totalmente o parzialmente la fase acquosa di una reazione ed evitare, di conseguenza, la formazione di prodotti secondari).³³
- Si ha la possibilità di operare a temperature più elevate.

- I liquidi ionici, infine, date le loro particolari caratteristiche, possono aumentare la solubilità di alcuni substrati (come ad esempio la cellulosa) che sono solo parzialmente o per nulla solubili nei tradizionali solventi organici.

Un esempio di quanto affermato è rappresentato dalle reazioni riportate in Tabella 2.1; da essa è possibile notare che tutti i sistemi di reazione considerati utilizzano come enzima le Lipasi, preferibilmente quelle supportate come la CALB e che la maggior parte di tali sistemi sono molto semplici. Ad oggi, infatti, sono state studiate nei liquidi ionici molte delle reazioni più semplici che vengono tradizionalmente condotte nei solventi organici al fine di verificare la possibilità di utilizzare questi particolari solventi come sostituti dei solventi volatili. I sistemi più complessi, invece, devono ancora essere studiati approfonditamente: in modo particolare, per essi, occorre verificare se vi sono vantaggi, derivanti dall'utilizzo dei liquidi ionici, tali da giustificare un costo (attualmente) superiore rispetto a quello che si sostiene per condurre la stessa reazione nei tradizionali solventi organici. I principali vantaggi, derivanti dall'utilizzo dei liquidi ionici in biocatalisi, che potrebbero giustificare l'introduzione a pieno regime di questi nuovi solventi, sono: una resa maggiore rispetto a quella ottenibile nei sistemi tradizionali (grazie al fatto che è possibile lavorare a temperature più elevate e che molti liquidi ionici non inattivano gli enzimi come fanno, invece, la maggior parte dei solventi organici), la possibilità di riutilizzare più volte l'enzima all'interno del liquido ionico senza perdita di attività da parte dell'enzima stesso (questo è valido per lo più per gli enzimi supportati) e una migliore conversione del substrato (molti enzimi nei liquidi ionici mostrano, infatti, una selettività per il substrato superiore rispetto a quella che può essere misurata nei solventi organici o nei tamponi).

Essendo i potenziali vantaggi di notevole importanza, sono in corso molti studi volti a valutare la possibilità di utilizzare i liquidi ionici anche in sistemi più complessi.³⁹

2.4.2 Applicazioni biomedicali

A) Biosensori

I liquidi ionici possono essere usati per la realizzazione di biosensori ottici ed elettrochimici grazie all'elevata conduttività elettrica e alla stabilità termica. Questi particolari solventi vengono utilizzati per modificare gli elettrodi del sensore al fine di facilitare il trasferimento degli elettroni tra l'enzima (depositato sul sensore) e l'elettrodo metallico. Sono stati realizzati^{27,48}, ad esempio, dispositivi per la misurazione dell'H₂O₂ basati su un elettrodo ricoperto da [BMIm][BF₄] o [BMIm][PF₆], sensori amperometrici basati su [BMIm][PF₆] per la determinazione del glucosio e sensori amperometrici per la rilevazione di D-amminoacidi utilizzando [BMIm][BF₄]: in questi dispositivi il liquido ionico depositato sull'elettrodo permette di avere conducibilità e biocompatibilità più elevate rispetto agli elettrodi tradizionali, grazie alle proprietà dei liquidi ionici stessi che vengono utilizzati.

E' inoltre importante sottolineare che anche la risposta del dispositivo migliora poiché vengono offerti un range lineare molto ampio, elevate sensibilità e riproducibilità della misura

B) Attuatori elettromeccanici

Gli attuatori elettromeccanici⁴⁵ sono dispositivi che generano una deformazione reversibile se sottoposti ad uno stimolo elettrico (Figura 2.8). Gli attuatori più comuni sono quelli caratterizzati da una copertura metallica (oro o argento, per esempio) e contenenti un polimero conduttivo (dotato di carica) che permette a questi dispositivi di fungere da muscoli artificiali quando viene applicato uno stimolo elettrico che ne provoca la "contrazione".

La presenza di liquido ionico da usare in associazione con i polimeri conduttivi permette di:

Aumentare la capacità contrattile del bioattuatore che è così in grado di generare uno sforzo pari o addirittura superiore a quello generabile dal muscolo umano

- Ridurre l'assorbimento di acqua da parte del dispositivo quando questo viene impiantato
- Aumentare il numero di cicli a cui il muscolo può essere sottoposto.

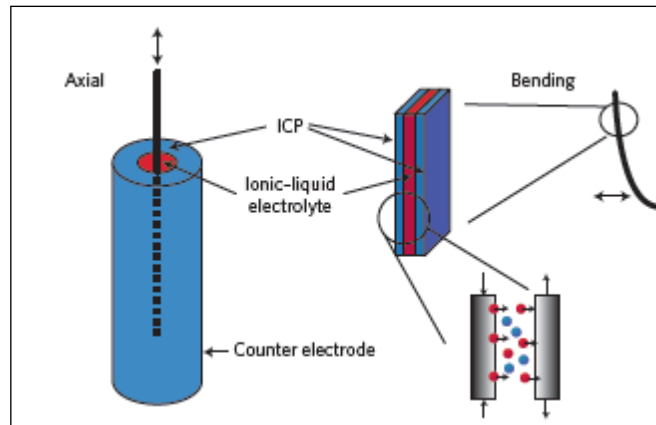


Figura 2.8 Schema di un attuatore elettromeccanico.

C) Elettrodeposizione

I liquidi ionici possono anche essere utilizzati per effettuare l'elettrodeposizione di metalli e semiconduttori su superfici di vario genere, sfruttando la loro elevata stabilità e la loro ampia finestra elettrochimica (fino a 6 V). Ad esempio superfici di protesi realizzate in NiTi possono essere ricoperte di Tantalio al fine di:

- Migliorare la biocompatibilità
- Ridurre l'ossidazione e la corrosione della lega NiTi (che può portare all'insorgenza di allergie nel soggetto che ha subito l'impianto della protesi)
- Migliorare la resistenza del dispositivo
- Funzionalizzarlo (ad esempio depositando uno strato di sostanze che possono favorire la produzione di idrossiapatite e quindi aumentare la forza del legame tra la protesi e la sede dell'impianto)^{46,47}.

D) Gene delivery vector

La terapia genica fa uso di vettori per l'inserimento, nelle cellule, di geni sani che sostituiscano quelli non corretti. I vettori utilizzabili a tal scopo possono essere virali o non virali (possono quindi essere tossici o pericolosi) e sono usati in associazione con agenti (generalmente fosfolipidi) che ne facilitano l'ingresso nella cellula. Zhang et al.⁴⁹ hanno sintetizzato un vettore costituito da un polimero contenente il catione imidazolico del 3-butil-1-vinylimidazolo bromuro e un residuo di prolina (che è stata introdotta al fine di ridurre la citotossicità e aumentare la biocompatibilità). Il polimero così ottenuto, grazie alla sua superficie carica positivamente, ha un'elevata capacità di legarsi alla molecola di DNA e di proteggerla dalla degradazione enzimatica all'interno della cellula in cui viene introdotta, senza l'ausilio di agenti estranei, a differenza dei normali vettori.

2.4.3 Altre applicazioni

I liquidi ionici sono importanti anche nel campo dell'energia: grazie alla loro non infiammabilità è possibile aumentare la sicurezza di batterie e altri dispositivi di accumulazione fino ad oggi realizzati con il litio. Sostituendo, infatti, i liquidi all'interno delle batterie con soluzioni contenenti ioni conduttori provenienti da liquidi ionici è possibile ottenere energia (anche per questa applicazione, quindi, si sfruttano la conduttività e la capacità dei liquidi ionici di generare alti voltaggi) in sicurezza. I risultati in questo campo sono molto differenti soprattutto a causa delle grande varietà di liquidi ionici esistenti⁴⁵ ma promettenti: aziende come Philips, BP e Chevron stanno studiando come costruire dispositivi di questo genere²⁷.

Si è anche sperimentato l'utilizzo dei liquidi ionici per la produzione di biodiesel a partire da biomasse: Young et al.⁵¹ hanno realizzato sistemi costituiti da liquido ionico (1-etil-3-metilimidazolo metilsolfato) e metanolo per ricavare esteri di acidi grassi attraverso una reazione di transesterificazione di biomasse (es. Duniella microalgae). Le rese di queste

reazioni sono molto più elevate (≥ 10 volte) nel sistema contenente il liquido ionico rispetto a quello costituito da solo solvente organico.

2.5 VANTAGGI E SVANTAGGI CONNESSI ALL'USO DEI LIQUIDI IONICI

L'utilizzo dei liquidi ionici come potenziali sostituti dei tradizionali solventi organici è stato giustificato, all'inizio della loro diffusione, con il fatto che la loro tensione di vapore fosse nulla o comunque molto bassa.

Questa proprietà ha permesso che essi fossero classificati come "green solvents" e che si iniziasse a cercarne potenziali applicazioni.

La loro immagine di solventi rispettosi dell'ambiente, però, non è sufficiente a giustificarne l'utilizzo.

Accanto a questo aspetto, esistono, infatti, numerosi elementi positivi³⁸ che li rendono dei candidati a sostituire i solventi organici, soprattutto in biocatalisi:

- Soppressione di reazioni indesiderate soprattutto quelle dipendenti dalla presenza di acqua;
- Capacità di sciogliere sostanze (ad esempio la cellulosa) che sono scarsamente solubili nei tradizionali solventi organici;
- Possibilità di creare liquidi ionici adatti ad ogni specifica applicazione, variando i cationi a gli anioni che compongono li compongono;
- Miglioramento, in molti casi, della stabilità e della selettività degli enzimi;
- Recupero degli enzimi per filtrazione o per centrifugazione e loro riutilizzo in numerosi cicli senza perdita di attività.

E' però importante sottolineare che esistono numerose limitazioni che frenano la diffusione dei liquidi ionici. In primo luogo, occorre precisare che la loro immagine di "green solvents" non è del tutto corretta: tutti i liquidi ionici hanno, infatti, tensione di vapore nulla solo a temperature simili a quella ambiente mentre a temperature più elevate ($\geq 150^{\circ}\text{C}$), alcuni di essi evaporano.

Affermare, quindi, che tutti liquidi ionici a qualsiasi temperatura hanno tensione di vapore nulla non è corretto: a seconda degli ioni che li compongono si avranno, infatti, comportamenti diversi, esattamente come per le altre proprietà chimico-fisiche di questi solventi.

Ad esempio, liquidi ionici contenenti l'anione NTf_2^- distillano abbastanza velocemente (circa 4 ore) senza decomporsi. Altri liquidi ionici, costituiti da anioni come il PF_6^- , invece, evaporano solo in minima parte, in tempi molto più lunghi (in 4 ore solo 1% del volume iniziale viene distillato) e senza decomposizione.^{52,57}

Altri fattori che non permettono di affermare in modo generale che i liquidi ionici sono solventi "green" sono i seguenti:

- Alcuni di essi possono decomporsi⁵³, sia a temperatura ambiente che a temperature più elevate, in sostanze dannose (ad esempio gli anioni PF_6^- e BF_4^- liberano HF quando vengono a contatto con acqua⁵⁶ o con l'umidità dell'aria e i cationi BMIm possono produrre carbeni);
- Non sono biodegradabili⁵⁴ se non in minima parte;
- Sono tossici sia per le cellule umane⁵⁵ che per altri organismi⁵⁴ (Kumar et al. hanno testato l'azione citotossica di 28 liquidi ionici su cellule di linea di cancro umano concludendo che molti di essi sono tossici anche a basse concentrazioni; hanno inoltre osservato che la tossicità è minima per il catione imidazolico BMIm ma aumenta all'aumentare della lunghezza della catena alchilica in posizione 1; Wells et al. hanno invece studiato l'ecotossicità di alcuni comuni liquidi ionici, concludendo che sono meno tossici dei solventi organici tradizionali anche se la loro tossicità varia molto a seconda degli ioni costituenti);
- Non sono presenti studi approfonditi, o comunque paragonabili a quelli inerenti i solventi organici, sulla loro tossicità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente.

Accanto a questi fattori riguardanti la possibilità di utilizzare i liquidi ionici come solventi "benigni", occorre considerare anche altri limiti:

- Molti liquidi ionici hanno una viscosità così elevata da provocare una diminuzione della mobilità dei componenti della reazione
- L'estrazione del prodotto può essere difficoltosa, soprattutto se il prodotto è non volatile o non ha caratteristiche molto differenti dal liquido ionico in cui è disciolto (è

possibile usare filtri³³ che isolano il prodotto o il liquido ionico dal resto della miscela di reazione oppure utilizzare la CO₂ supercritica o, se possibile, i solventi organici)

- Il costo dei liquidi ionici è molto più elevato rispetto a quello dei solventi organici data la loro scarsa diffusione.

E' evidente che molto deve essere ancora fatto per permettere ai liquidi ionici di essere usati con la stessa diffusione dei solventi organici, soprattutto a riguardo della loro sintesi: trovare vie sintetiche che siano rispettose dell'ambiente e che portino alla produzione di liquidi ionici totalmente "green" è il primo passo da effettuare.

Capitolo 3: MATERIALI E METODI

3.1 INTRODUZIONE

Per questo lavoro si è affiancata un'intensa attività di ricerca bibliografica, necessaria per comprendere le potenzialità dei liquidi ionici nella biocatalisi, le proprietà e le applicazioni dei fosfolipidi (Capitoli 1 e 2), ad una cospicua attività di laboratorio (Capitoli 3 e 4).

Gli strumenti utilizzati per la ricerca bibliografica sono stati PubMed e Scifinder Scholar attraverso i quali è stata privilegiata la ricerca di reviews che offrissero una sistematizzazione della letteratura, soprattutto a proposito della biocatalisi nei liquidi ionici, data la notevole quantità di materiale esistente. Per le proprietà dei liquidi ionici, soprattutto la loro miscibilità con i solventi organici, è stato necessario consultare diversi database, tra i quali Ionic Liquids Database (ILThermo) raggiungibile all'indirizzo <http://ilthermo.boulder.nist.gov/ILThermo/> e The UFT/Merck Ionic Liquids Biological Effects Database raggiungibile all'indirizzo http://www.il-eco.uft.uni-bremen.de/index.php?page=home&chent_id=&view=intro&lang=en.

Per l'attività sperimentale, le analisi qualitative e quantitative delle miscele di reazioni sono state effettuate tramite cromatografia su strato sottile e per HPLC prelevando aliquote della fase organica contenente la miscela di fosfolipidi di interesse. La caratterizzazione dei prodotti finali è avvenuta tramite $^1\text{H-NMR}$ e spettrometria di massa.

La parte sperimentale è stata eseguita presso i laboratori del Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica "Giulio Natta" del Politecnico di Milano.

3.2 RIFERIMENTI DEI PRODOTTI CHIMICI

Di seguito vengono elencati i riferimenti utilizzati durante questa tesi specialistica e le relative analisi eseguite.

3.2.1 PC

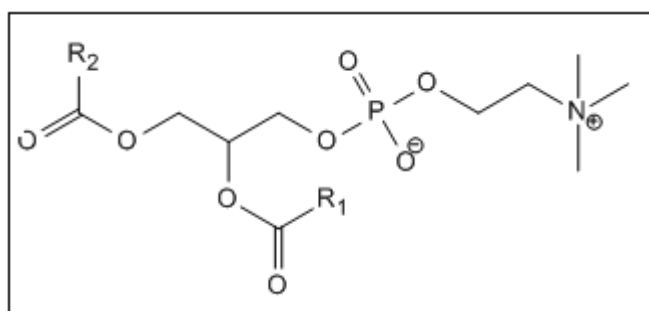


Figura 3.1 Fosfatidilcolina (PC).

Il prodotto Ep200 è stato acquistato da “Lucas Meyer Germany” ed è la fosfatidilcolina proveniente dai semi di soia.

Lo spettro di massa della PC è riportato a pagina 115.

L’analisi HPLC della PC è riportato a pagina 86.

3.2.2 PG

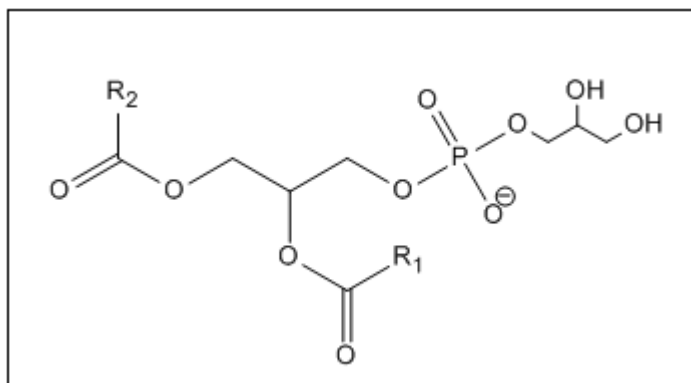


Figura 3.2 Fosfatidilglicerolo (PG).

Lo spettro di massa della PG è riportato a pagina 116.

L'analisi HPLC della PG è riportato a pagina 87.

3.2.3 PA

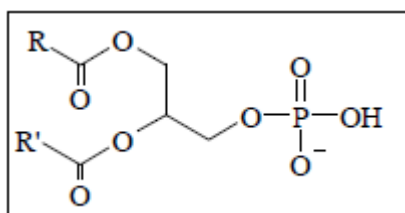


Figura 3.3 Acido fosfatidico (PA).

L'analisi HPLC della PA è riportato a pagina 89.

E' presente inoltre una analisi HPLC della miscela dei tre composti di riferimento precedenti, riportata a pagina 90.

3.3 ENZIMI

La fosfolipasi D (14P0365 – attività 2784 U/g) è stata gentilmente fornita dal Dr Lorenzo de Ferra della “Chemi S.p.A”.

Sono state impiegate due lipasi, il Novozym 435 prodotto da “Novozymes A/S” (L537322) e la lipasi estratta dalla *Candida Rugosa* prodotta da “Sigma Aldrich” (L1754).

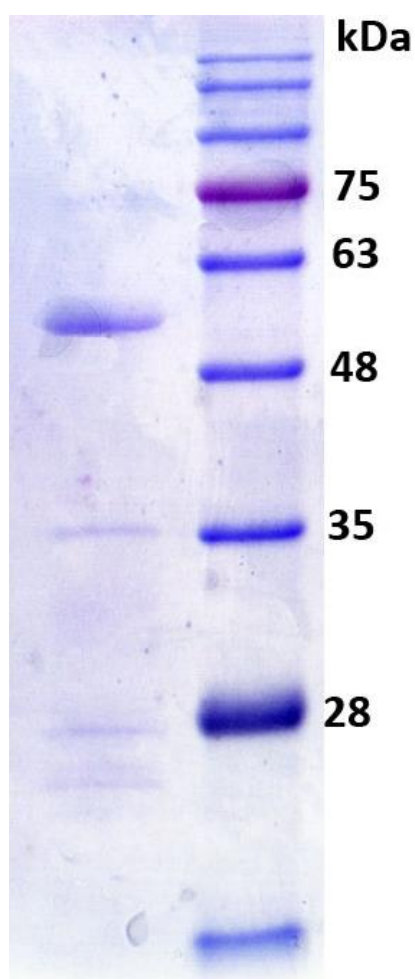


Figura 3.4 Analisi di SDS-PAGE del preparato enzimatico grezzo fornito dalla CHEMI S.p.A; la banda relativa alla fosfolipasi D è quella a M=54 kDa.

3.4 LIQUIDI IONICI

Sono stati impiegati due liquidi ionici entrambi acquistati da "Iolitec":

A) [BMIm][PF₆] (IL-0011):

Massa molare = 284.18 g/mol.

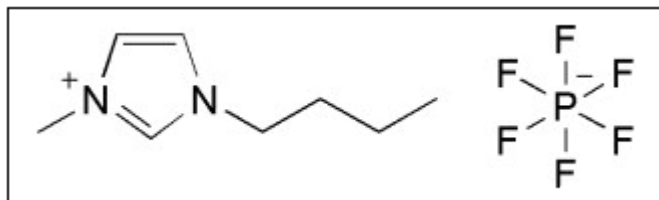


Figura 3.5 [BMIm][PF₆].

B) EMIM Acetato (IL-0189):

Massa molare = 170.21 g/mol.

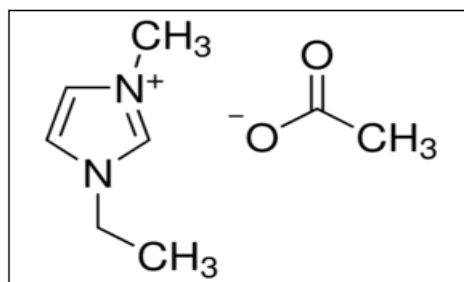


Figura 3.6 [EMIm][AcO].

3.5 APPARECCHIATURE

HPLC

Le analisi HPLC sono state eseguite con uno strumento Agilent 1100 Series accoppiato ad un rivelatore ELSD Sedex impostato alla temperatura di 55 °C e alla pressione di 3.5 bar. E' stata utilizzata una colonna Lichrospher diol 100, 250-4, 5µm-Merck termostata a 55 °C. I fosfolipidi sono stati eluiti in gradiente con una fase mobile composta da: Eluente A: esano/2-propanolo/acido acetico/TEA (815/170/15/0,8), Eluente B: 2-propanolo/acqua/acido acetico/TEA (837/140/15/0,8) con un gradiente così realizzato :

TEMPO [min]	ELUENTE A [%]	ELUENTE B [%]	FLUSSO [mL/min]
0	95	5	1
6	80	20	1
10	60	40	1
18	0	100	1
20	0	100	1
21	95	5	1
21.6	95	5	1
22	95	5	2
27	95	5	2
29	95	5	1

Tabella 3.1 Gradiente HPLC.

I picchi cromatografici dei composti sintetizzati sono stati confrontati con riferimenti noti consultabili nella sezione HPLC di questo lavoro.

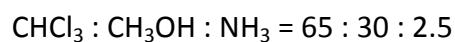
TLC

L'analisi a livello qualitativo dei prodotti e dell'andamento delle reazioni può essere effettuata mediante cromatografia di adsorbimento su strato sottile, o TLC. Vengono utilizzati diversi tipi di lastre con gel di silice come fase stazionaria.

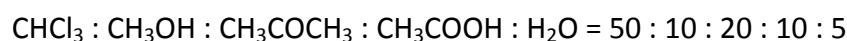
- fogli in plastica (Merck DC-Plastikfolien 60 F₂₅₄Art 5735);
- fogli in alluminio al gel di silice (Merck DC-Plastikfolien 60 F₂₅₄Art 5583) 20 cm × 20 cm con zona di concentrazione 2.5 cm × 20 cm;
- lastre in vetro con zona di concentrazione (Merck DC Fertigplatten 60 F₂₅₄ Art 11846).

Come fasi mobili si adoperano delle miscele eluenti a base di cloroformio e metanolo addizionate con ammoniaca o acido acetico. Le due miscele utilizzate sono le seguenti:

- miscela a 3 componenti:



- miscela a 5 componenti:



Come rivelatori sono stati impiegati lo iodio ed il reattivo di Pancaldi.

La preparazione del reattivo di Pancaldi è la seguente:

sciogliere 25 g di acido fosfomolibdico e 10 g di solfato di cerio in 600 mL di acqua; aggiungere acido solforico concentrato al 96% (60 mL) sotto agitazione, raffreddando se necessario, e portare la soluzione così ottenuta a 1 litro con acqua.

Capitolo 4: MODIFICAZIONI DELLE TESTE POLARI DI FOSFOLIPIDI

4.1 INTRODUZIONE

Il processo al quale ci siamo interessati in questo lavoro di tesi è la transesterificazione (o transfosfatidilazione) della testa polare di un fosfolipide naturale, catalizzata dalla PLD, in presenza di un nucleofilo.

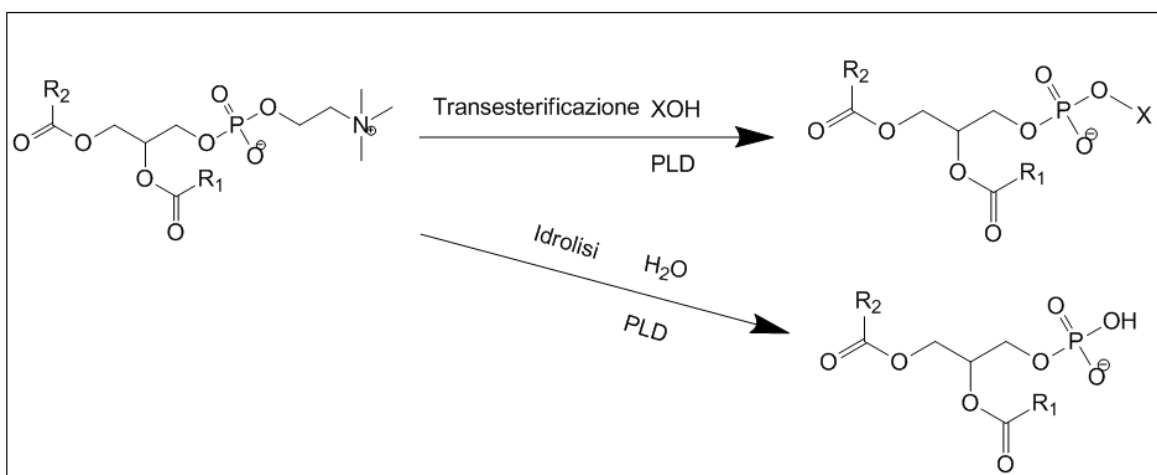


Figura 4.0 Reazione di transesterificazione della PC

Il processo di sintesi classico messo a punto nel nostro laboratorio prevede la reazione (vedi Figura 4.0) in ambiente bifasico solvente organico-tampone, dove nel solvente organico viene sciolta la fosfatidilcolina (sistema di partenza) e nella fase acquosa vengono posti, a pH 5.6 mantenuto costante per la presenza di un tampone acetato di sodio 0.1 M, il nucleofilo desiderato (XOH), l'enzima ed il CaCl₂ 0.1 M.

La reazione avviene sotto agitazione a 37 °C.

L'andamento della reazione viene seguito mediante dei prelievi nel tempo della fase organica, che viene analizzata tramite TLC ed HPLC.

La presenza di acqua nella miscela di reazione provoca la formazione dell'acido fosfatidico mediante la reazione di idrolisi competitiva con quella di transesterificazione. L'introduzione del liquido ionico nella miscela di reazione è stata pianificata e viene effettuata per diminuire la quantità di acqua presente e cercare di deprimere la reazione di idrolisi, che risulta essere una reazione collaterale non desiderata e che obbliga l'operatore ad una purificazione ulteriore del prodotto desiderato.

Il liquido ionico scelto è il [BMIm][PF₆] che essendo idrofobo forma un sistema trifasico toluene-liquido ionico-tampone.

Altri tre liquidi ionici idrofili [BMIm][BF₄], [EMIm][AcO] e [EMIm][DEP] erano stati testati in un lavoro precedente ma hanno dato esito negativo in quanto provocano l'inibizione della attività catalitica della PLD.

4.2 SINTESI DI FOSFATIDILGLICEROLO (PG)

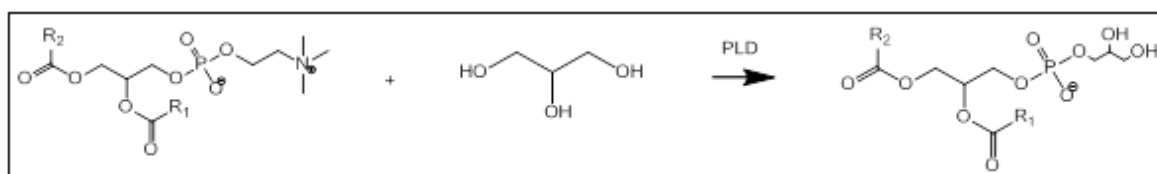


Figura 4.1 Reazione di sintesi di Fosfatidilglicerolo (PG)

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, in un sistema bifasico costituito dal fosfolipide sciolto in toluene (fase organica) e dal tampone sodio acetato (NaAc) 0.1 M a pH 5.6, ioni Ca⁺⁺ sotto forma di CaCl₂ 0.1 M e la PLD (fase acquosa).

Successivamente si è studiata la medesima reazione in presenza di percentuali crescenti di liquido ionico [BMIm][PF₆].

Le percentuali alle quali si fa riferimento nei grafici seguenti sono calcolate sul volume totale (400 μL) della miscela liquido ionico-tampone.

4.2.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostato alla temperatura di 37.5 °C e posto in agitazione per 24 h.

CR021 100% v/v tampone – 0% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.8 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	400 µL	400 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.7 mg
Glicerolo 3M	110.4 mg	115 mg

Tabella 4.1 Reazione CR021.

CR025 70% v/v tampone – 30% v/v IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	21.1 g
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	280 µL	280 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glicerolo 3M	110.4 mg	116.3 mg
[BMIm][PF ₆]	165.6 mg	167.3 mg

Tabella 4.2 Reazione CR025.

CR023 50% v/v tampone - 50% v/v IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	22 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	200 µL	200 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glicerolo 3M	110.4 mg	150 mg
[BMIm][PF ₆]	276 mg	278 mg

Tabella 4.3 Reazione CR023.

CR026 30% v/v tampone – 70% v/v IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.9 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	120 µL	120 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.8 mg
Glicerolo 3M	110.4 mg	121.8 mg
[BMIm][PF ₆]	386.4 mg	389.7 mg

Tabella 4.4 Reazione CR026.

CR024 10% v/v tampone – 90% v/v IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.2 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	40 µL	40 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	1 mg
Glicerolo 3M	110.4 mg	114 mg
[BMIm][PF ₆]	497 mg	494 mg

Tabella 4.5 : Reazione CR024.

Al termine, le fasi vengono lasciate separare, viene recuperata la fase superiore e il solvente viene allontanato a pressione ridotta mediante l'uso di un rotavapor.

Il residuo giallo risultante viene sciolto in esano : isopropanolo (1:1) e ne viene prelevato un campione per l'analisi HPLC.

Dai cromatogrammi ottenuti (riportati da pag 91 a pag 95) ed utilizzando come riferimenti i cromatogrammi dei composti puri PA, PG e PC si ricava la composizione della miscela di reazione e si riportano i dati ottenuti in grafici opportuni.

4.2.2 Risultati

CAMPIONE	% IL	AREA PC	AREA PA	AREA PG	SELETTIVITA'	RAPPORTO PG/PA	CONVERSIONE PC	% PA
CR021	0	1510	2653	8497	0.6711	3.202	0.8807	0.2096
CR025	30	53.31	1885	12623	0.8669	6.696	0.9963	0.1295
CR023	50	0	43.92	511.6	0.9209	11.65	1	0.0791
CR026	70	0	821.6	10062	0.9245	12.25	1	0.0755
CR024	90	0	71.71	1890	0.9634	26.36	1	0.0366

Tabella 4.6 : Risultati integrazione spettri HPLC

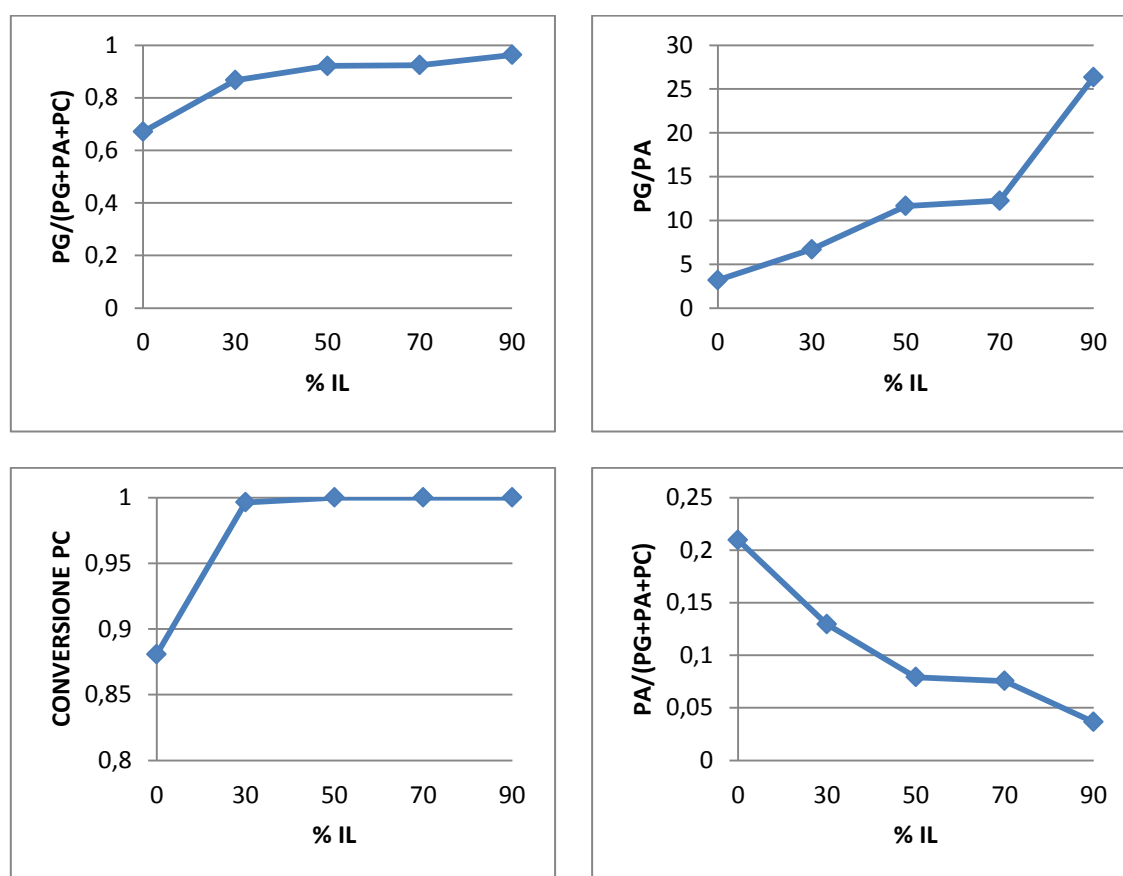


Grafico 4.1 Risultati elaborazione Excel (% IL indica la percentuale di liquido ionico nella miscela tampone-liquido ionico).

Come è possibile osservare dai grafici, l'aggiunta di percentuali crescenti di liquido ionico, migliora significativamente tutti i parametri presi in considerazione. Si nota una contemporanea diminuzione dell'acido formico e della PC non reagita permettendo una conversione in Fosfatidilglicerolo praticamente completa.

4.3 SINTESI DI FOSFATIDILETANOLAMMINA (PEA)

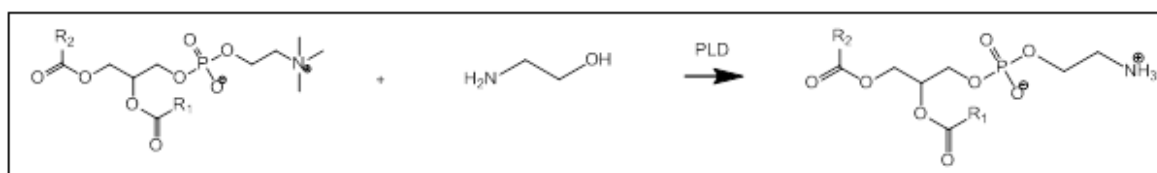


Figura 4.2 Reazione di sintesi di Fosfatidiletanolamina (PEA).

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, in un sistema bifasico costituito dal fosfolipide sciolto in toluene (fase organica) e dal tampone sodio acetato (NaAc) 0.1 M a pH 5.6, ioni Ca⁺⁺ sotto forma di CaCl₂ 0.1 M e la PLD (fase acquosa).

Successivamente si è studiata la medesima reazione in presenza di percentuali crescenti di liquido ionico [BMIm][PF₆].

Le percentuali alle quali si fa riferimento nei grafici seguenti sono calcolate sul volume totale (400 μL) della miscela liquido ionico-tampone.

4.3.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 37.5 °C e posto in agitazione per 24 h.

La soluzione tampone-etanolamina è stata preparata in questo modo: sono stati prelevati 3.5 mL di tampone a cui è stato aggiunto il volume necessario per raggiungere la molarità di 1 M in etanolamina dopodiché il pH della soluzione si è alzato ed è stato riportato a pH 5.6 usando acido acetico glaciale. Si è portato il volume complessivo a 7 mL aggiungendo il tampone; la soluzione finale presenta 0.418 mL di etanolamina in

circa 7 mL di soluzione totale dalla quale si preleva la quantità stechiometrica richiesta in ogni reazione.

CR022Z 100% v/v tampone – 0% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	22.3 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂ + Etanolamina 1 M	400 µL	400 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg

Tabella 4.7 Reazione CR022Z.

CR042 70% v/v tampone – 30% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	22.9 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂ + Etanolamina 1 M	360 µL	360 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
[BMIm][PF ₆]	55.2 mg	57.6 mg

Tabella 4.8 Reazione CR042.

CR035 50% v/v tampone - 50% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.3 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂ + Etanolamina 1 M	200 µL	200 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.8 mg
[BMIm][PF ₆]	276 mg	281 mg

Tabella 4.9 Reazione CR035.

CR038 10% v/v tampone - 90% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	18.7 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂ + Etanolammina 1 M	40 µL	40 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.8 mg
[BMIm][PF ₆]	496.8 mg	480 mg

Tabella 4.10 Reazione CR038.

CR061 70%IL 30% tampone

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	19.2 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂ + Etanolammina 1 M	120 µL	120 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
[BMIm][PF ₆]	386 mg	391 mg

Tabella 4.11 Reazione CR061.

Al termine, le fasi vengono lasciate separare, viene recuperata la fase superiore e il solvente viene allontanato a pressione ridotta mediante l'uso di un rotavapor.

Il residuo giallo risultante viene sciolto in esano : isopropanolo (1:1) e ne viene prelevato un campione per l'analisi HPLC.

Dai cromatogrammi ottenuti (riportati da pag 96 a pag 100) ed utilizzando come riferimenti i cromatogrammi dei composti puri PA, PEA e PC si ricava la composizione della miscela di reazione e si riportano i dati ottenuti in grafici opportuni.

4.3.2 Risultati

CAMPIONE	% IL	AREA PC	AREA PA	AREA PEA	SELETTIVITA'	RAPPORTO PEA/PA	CONVERSIONE PC	% PA
CR022Z	0	6.796	0.58	92.62	0.9262	159.7	0.932	0.006
CR042	30	4.59	0.712	86.32	0.9421	121.2	0.9499	0.008
CR035	50	3.688	0.812	89.19	0.9520	109.8	0.9606	0.009
CR061	70	1227	612.3	26041	0.9340	42.5	0.956	0.022
CR038	90	5.338	3.32	86.58	0.9091	26.1	0.9439	0.035

Tabella 4.12 Risultati integrazione spettri HPLC.

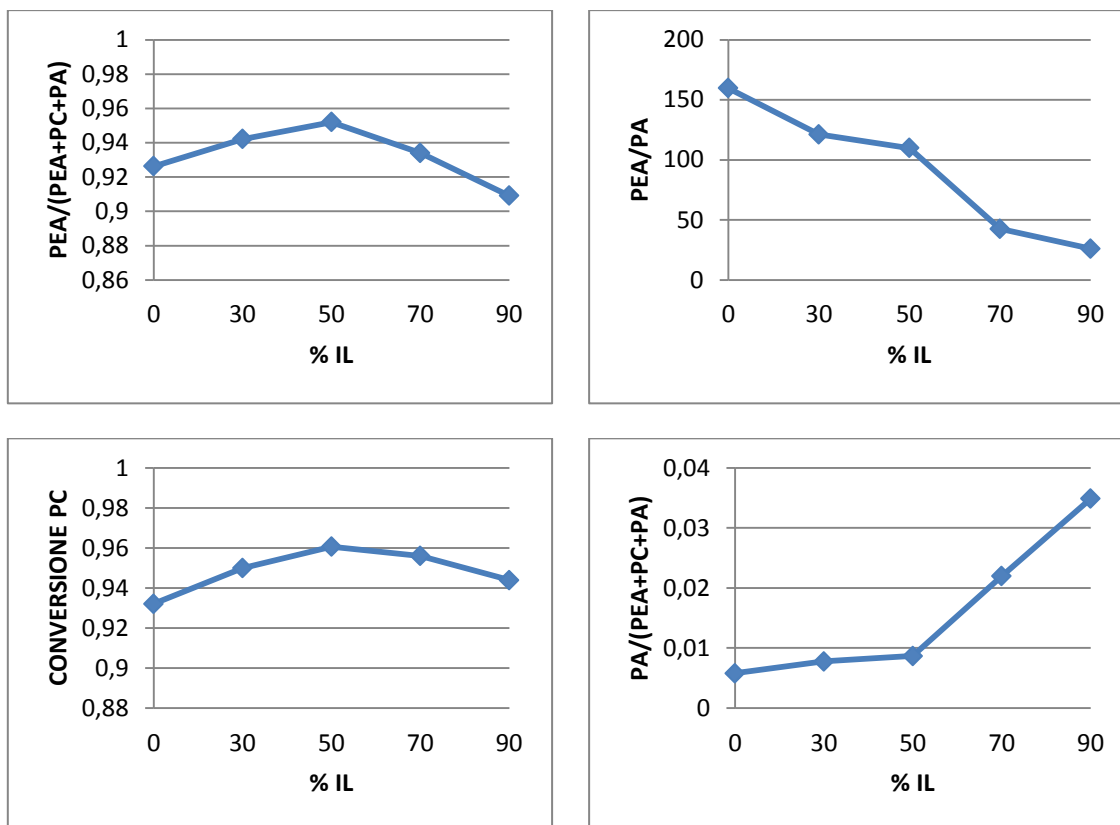


Grafico 4.2 : Risultati elaborazione Excel (% IL indica la percentuale di liquido ionico nella miscela tampone-liquido ionico).

Come è possibile osservare dai grafici, la conversione della PC e la formazione di PEA raggiungono un massimo per il 50% di liquido ionico. In queste condizioni, la percentuale di acido formatosi è comunque accettabile.

L'etanolamina è un composto la cui aggiunta in quantità rilevanti aumenta il pH della soluzione rendendolo troppo basico e disattivando così l'enzima; per questa ragione dobbiamo limitare la quantità di etanolamina nel campione; di conseguenza presupponiamo che la quantità di reagente non sia sufficiente.

4.4 SINTESI DI FOSFATIDILISOPROPANOLO (PIP)

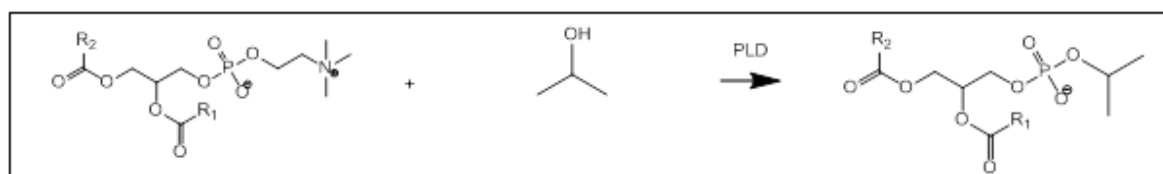


Figura 4.3 Reazione di sintesi di Fosfatidilisopropanolo (PIP).

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, in un sistema bifasico costituito dal fosfolipide sciolto in toluene (fase organica) e dal tampone sodio acetato (NaAc) 0.1 M a pH 5.6, ioni Ca^{++} sotto forma di CaCl_2 0.1 M e la PLD (fase acquosa).

Successivamente si è studiata la medesima reazione in presenza di percentuali crescenti di liquido ionico [BMIm][PF₆].

Le percentuali alle quali si fa riferimento nei grafici seguenti sono calcolate sul volume totale (400 μL) della miscela liquido ionico-tampone.

4.4.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 37.5 °C e posto in agitazione per 24 h.

CR055 100% v/v tampone - 0% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.5 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	400 µL	400 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.7mg
Isopropanolo 3M	72 mg	69.6 mg

Tabella 4.13 Reazione CR055.

CR056 70% v/v tampone - 30% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.4 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	280 µL	280 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6mg
Isopropanolo 3M	72 mg	72 mg
[BMIm][PF ₆]	165.6 mg	175.8 mg

Tabella 4.14 Reazione CR056.

CR057 50% v/v tampone - 50% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.5 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	200 µL	200 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6mg
Isopropanolo 3M	72 mg	70 mg
[BMIm][PF ₆]	276 mg	285 mg

Tabella 4.15 Reazione CR057.

CR059 30% v/v tampone – 70 % IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.4 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	120 µL	120 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6mg
Isopropanolo 3M	72 mg	75.4 mg
[BMIm][PF ₆]	386.4 mg	386.3 mg

Tabella 4.16 Reazione CR059.

CR058 10% v/v tampone – 90% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.4 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	40 µL	40 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Isopropanolo 3M	72 mg	79.5 mg
[BMIm][PF ₆]	496.8 mg	500 mg

Tabella 4.17 Reazione CR058.

Al termine, le fasi vengono lasciate separare, viene recuperata la fase superiore e il solvente viene allontanato a pressione ridotta mediante l'uso di un rotavapor.

Il residuo giallo risultante viene sciolto in esano : isopropanolo (1:1) e ne viene prelevato un campione per l'analisi HPLC.

Dai cromatogrammi ottenuti (riportati da pag 101 a pag 105) ed utilizzando come riferimenti i cromatogrammi dei composti puri PA, PIP e PC si ricava la composizione della miscela di reazione e si riportano i dati ottenuti in grafici opportuni.

4.4.2 Risultati

CAMPIONE	% IL	AREA PC	AREA PA	AREA PIP	SELETTIVITA'	RAPPORTO PIP/PA	CONVERSIONE PC	% PA
CR055	0	4.974	19.4	72.07	0.75	3.7	0.95	0.2
CR056	30	23.2	15.06	61.74	0.62	4.1	0.77	0.15
CR057	50	31.25	9.02	59.73	0.60	6.6	0.69	0.09
CR059	70	74.11	3.36	22.53	0.23	6.7	0.26	0.03
CR058	90	72.61	3.49	23.9	0.24	6.9	0.27	0.03

Tabella 4.18 Risultati integrazione spettri HPLC.

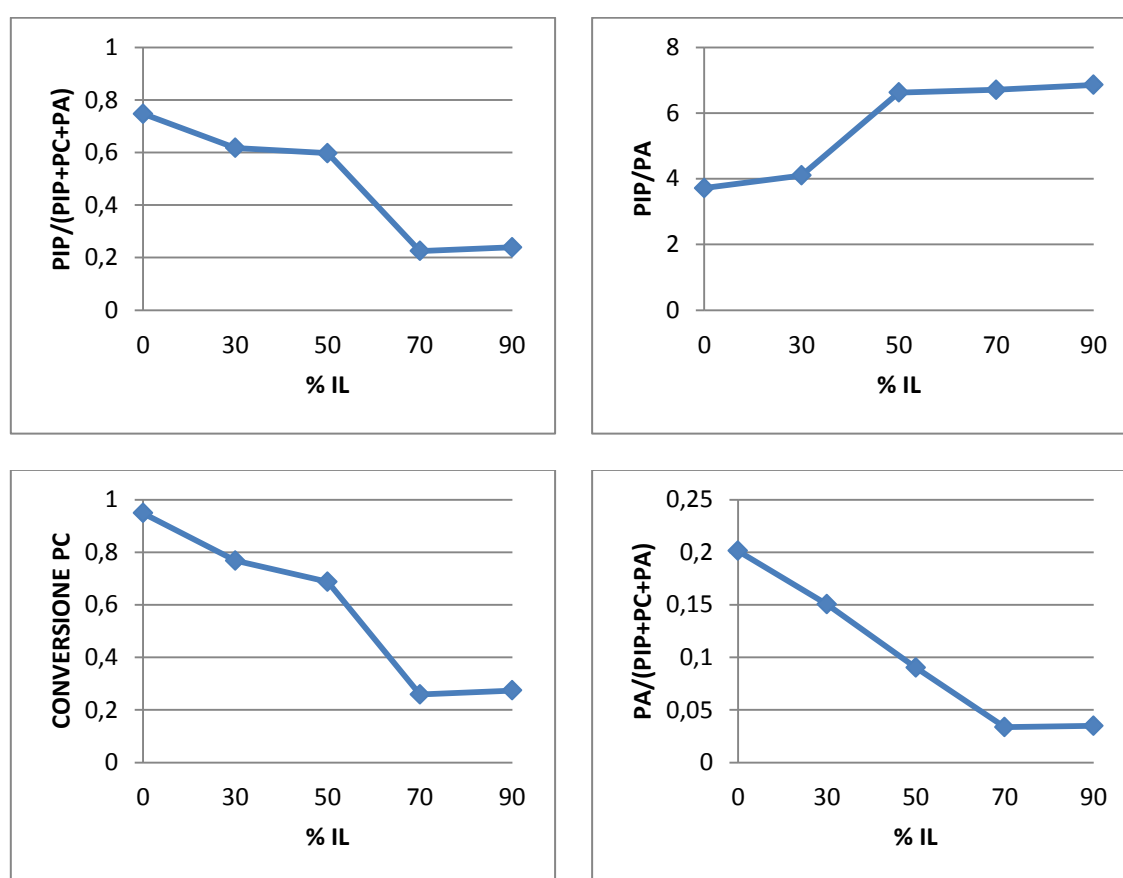


Grafico 4.3 Risultati elaborazione Excel (% IL indica la percentuale di liquido ionico nella miscela tampone-liquido ionico).

In questa reazione l'uso del liquido ionico non apporta sostanziali miglioramenti: cala sia la formazione di PIP che la conversione della PC, nonostante una diminuzione del PA formato. In percentuale l'inibizione della formazione dell'acido è maggiore rispetto alla diminuzione della conversione a PIP.

4.5 SINTESI DI FOSFATIDILALLILE (PAI)

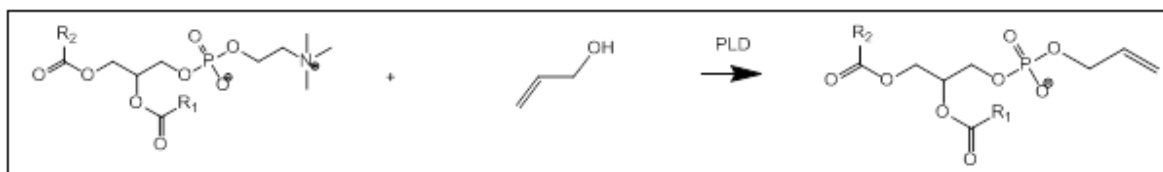


Figura 4.4 Reazione di sintesi di Fosfatidilallile (PAI)

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, in un sistema bifasico costituito dal fosfolipide sciolto in toluene (fase organica) e dal tampone sodio acetato (NaAc) 0.1 M a pH 5.6, ioni Ca^{++} sotto forma di CaCl_2 0.1 M e la PLD (fase acquosa).

Successivamente si è studiata la medesima reazione in presenza di percentuali crescenti di liquido ionico [BMIm][PF₆].

Le percentuali alle quali si fa riferimento nei grafici seguenti sono calcolate sul volume totale (400 μL) della miscela liquido ionico-tampone.

4.5.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 37.5 °C e posto in agitazione per 24 h.

CR050 100% v/v tampone – 0% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	22 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	400 µL	400 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Alcool Allilico	23.2 mg	25.5 mg

Tabella 4.19 Reazione CR050.

CR051 70% v/v tampone – 30% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	19.3 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	280 µL	280 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Alcool Allilico	23.2 mg	26 mg
[BMIm][PF ₆]	165.6 mg	164.7 mg

Tabella 4.20 Reazione CR051.

CR046 50% v/v tampone – 50% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	19.2 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	200 µL	200 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Alcool Allilico	23.2 mg	24.6 mg
[BMIm][PF ₆]	276 mg	278 mg

Tabella 4.21 Reazione CR046.

CR052 30% v/v tampone – 70% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	23 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	120 µL	120 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Alcool Allilico	23.2 mg	24 mg
[BMIm][PF ₆]	386.4 mg	384.6 mg

Tabella 4.22 Reazione CR052.

CR053 10% v/v tampone – 90% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	21 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	40 µL	40 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Alcool Allilico	23.2 mg	26 mg
[BMIm][PF ₆]	496.8 mg	497.2 mg

Tabella 4.23 Reazione CR053.

Al termine, le fasi vengono lasciate separare, viene recuperata la fase superiore e il solvente viene allontanato a pressione ridotta mediante l'uso di un rotavapor.

Il residuo giallo risultante viene sciolto in esano : isopropanolo (1:1) e ne viene prelevato un campione per l'analisi HPLC.

Dai cromatogrammi ottenuti (riportati da pag 106 a pag 110) ed utilizzando come riferimenti i cromatogrammi dei composti puri PA, PAI e PC si ricava la composizione della miscela di reazione e si riportano i dati ottenuti in grafici opportuni.

4.5.2 Risultati

CAMPIONE	% IL	AREA PC	AREA PA	AREA PaI	SELETTIVITA'	RAPPORTO PAI/PA	CONVERSIONE PC	% PA
CR050	0	1.9	4.5	93.5	0.93	20.6	0.98	0.045
CR051	30	1.5	4.2	94.3	0.94	22.4	0.985	0.042
CR046	50	1.4	3.9	94.7	0.95	24.1	0.986	0.039
CR052	70	0.3	3.8	95.8	0.96	25.1	0.997	0.038
CR053	90	0	3.4	96.6	0.97	28.1	1	0.034

Tabella 4.24 Risultati integrazione spettri HPLC.

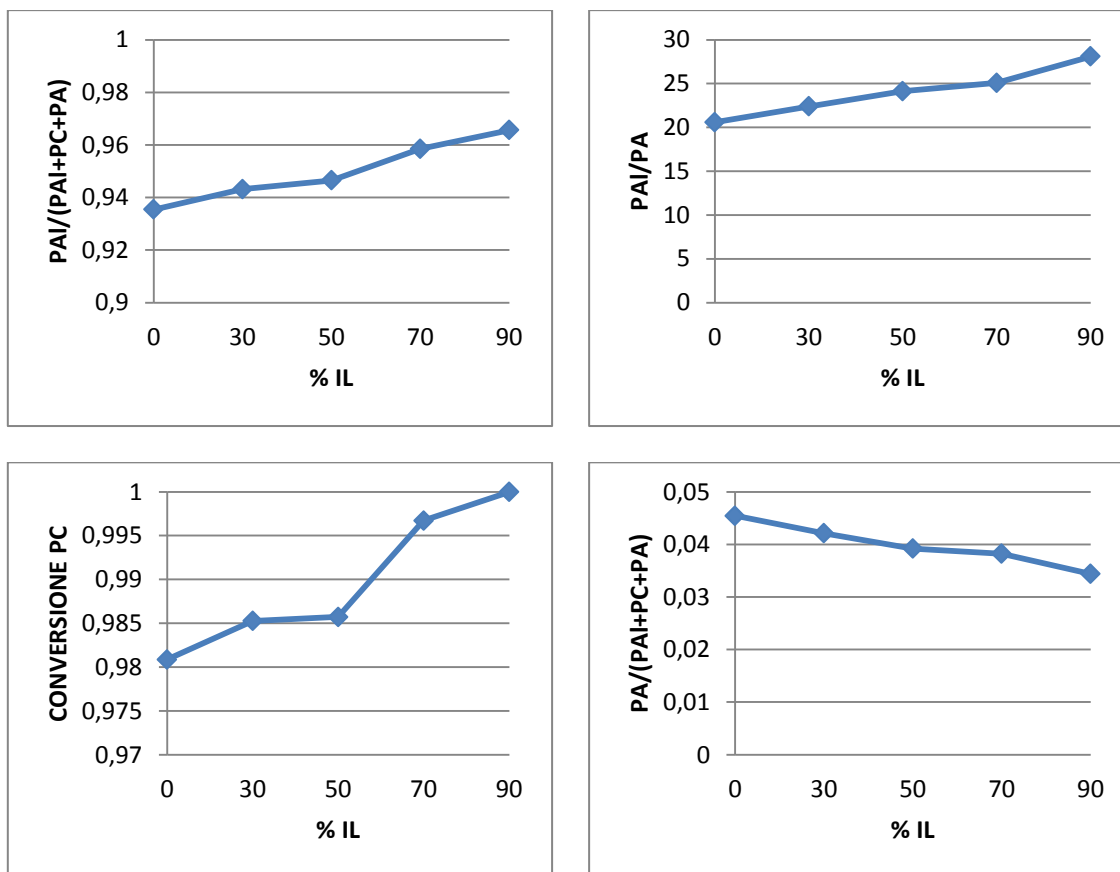


Grafico 4.4 Risultati elaborazione Excel (% IL indica la percentuale di liquido ionico nella miscela tampone-liquido ionico).

Come è possibile osservare dai grafici, l'aggiunta di percentuali crescenti di liquido ionico, migliora significativamente tutti i parametri presi in considerazione. Si nota una contemporanea diminuzione dell'acido formato e della PC non reagita permettendo una conversione in fosfatidilallile praticamente completa.

4.6 SINTESI DI FOSFATIDILGLUCOSIO (PGI)

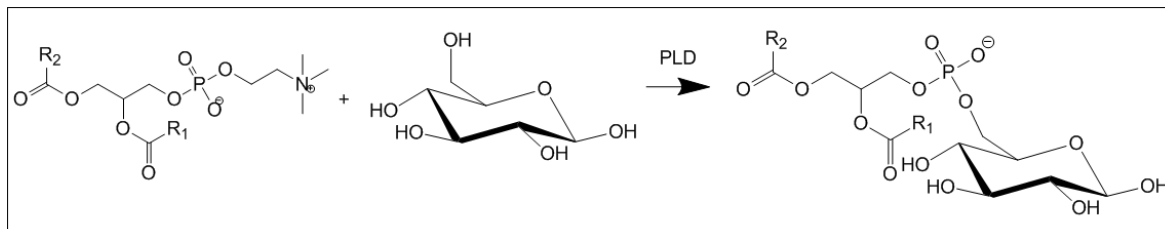


Figura 4.5 Sintesi del Fosfatidilglucosio.

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, in un sistema bifasico costituito dal fosfolipide sciolto in toluene (fase organica) e dal tampone sodio acetato (NaAc) 0.1 M a pH 5.6, ioni Ca^{++} sotto forma di CaCl_2 0.1 M e la PLD (fase acquosa).

Successivamente si è studiata la medesima reazione in presenza di percentuali crescenti di liquido ionico [BMIm][PF₆].

Le percentuali alle quali si fa riferimento nei grafici seguenti sono calcolate sul volume totale (400 μL) della miscela liquido ionico-tampone.

4.6.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 37.5 °C e posto in agitazione per 24 h.

CR064 100% v/v tampone – 0% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	19.5 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	400 µL	400 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glucosio 3M	216 mg	211.6 mg

Tabella 4.25 Reazione CR064.

CR065 70% v/v tampone – 30% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.6 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	280 µL	280 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glucosio 3M	216 mg	218 mg
[BMIm][PF ₆]	165.6 mg	161 mg

Tabella 4.26 Reazione CR065.

CR066 50% v/v tampone – 50% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	21.5 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	200 µL	200 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glucosio 2.5M	181.8 mg	187 mg
[BMIm][PF ₆]	276 mg	284 mg

Tabella 4.27 Reazione CR066.

CR067 30% v/v tampone – 70% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	23.7 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	120 µL	120 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glucosio 1.5M	109 mg	110 mg
[BMIm][PF ₆]	386.4 mg	383 mg

Tabella 4.28 Reazione CR067.

CR068 10% v/v tampone – 90% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.7 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	40 µL	40 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
Glucosio 0.5M	36 mg	35 mg
[BMIm][PF ₆]	496.8 mg	502 mg

Tabella 4.29 Reazione CR068.

Al termine, le fasi vengono lasciate separare, viene recuperata la fase superiore e il solvente viene allontanato a pressione ridotta mediante l'uso di un rotavapor.

Il residuo giallo risultante viene sciolto in esano : isopropanolo (1:1) e ne viene prelevato un campione per l'analisi HPLC.

Dai cromatogrammi ottenuti (riportato a pag 111) ed utilizzando come riferimenti i cromatogrammi dei composti puri PA, PGI e PC si ricava la composizione della miscela di reazione e si riportano i dati ottenuti in grafici opportuni.

4.6.2 Risultati

Al contrario delle altre reazioni, i cromatogrammi non ci permettono di identificare un picco ben definito, bensì è nascosto sotto al picco della PC. Ciò ci impedisce di calcolarne un'area precisa e quindi di diagrammare le influenze del liquido ionico.

Siamo però certi di aver ottenuto il fosfatidilglucosio grazie agli spettri di massa eseguiti per tutte le reazioni, consultabili a pagina 119.

4.7 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Le prove effettuate hanno mostrato che:

1- la reazione di idrolisi, studiata in lavori precedenti⁶⁰, condotta senza la presenza dell'alcool al fine di sintetizzare il PA, viene totalmente eliminata in presenza di solo liquido ionico e fortemente depressa in presenza di una fase acquosa composta da liquido ionico/tampone (per la proporzione 90:10, si produce solo il 3% di PA);

2- per i vari composti utilizzati nelle reazioni di transesterificazione (glicerolo, alcool allililico, etanolamina, isopropanolo, glucosio) sono state valutate diverse proporzioni di [BMIm][PF₆]:tampone e per ognuna di esse è stato calcolato il rapporto PX/PA, indice dell'affinità relativa dei due nucleofili, acqua e alcool, in competizione per il complesso enzima-substrato. La prima osservazione che è stata fatta è che è necessaria una certa quantità di acqua (~10%) per attivare la PLD che altrimenti non mostra alcuna attività in presenza di solo liquido ionico.

Per quanto riguarda gli alcoli primari la resa della reazione e il valore del rapporto PX/PA sembrano essere fortemente dipendenti dalle caratteristiche di polarità e solubilità dell'alcool nel liquido ionico. I migliori risultati rispetto ai tradizionali sistemi bifasici sono stati ottenuti per la transesterificazione che porta al fosfatidilglicerolo (PG): con una proporzione [BMIm][PF₆]:tampone = 90:10, il rapporto PG/PA è pari a 26 cioè circa 12 volte il valore ottenuto in un sistema bifasico.

Anche per gli alcoli secondari si sono osservati comportamenti differenti, a seconda della struttura dell'alcool stesso difficilmente prevedibili a priori. E' stato, quindi, possibile concludere che la presenza del liquido ionico consente di diminuire significativamente la quantità di PA che viene prodotto dall'idrolisi della PC (i rapporti PX/PA calcolati per % di liquido ionico crescenti sono infatti maggiori di quelli ottenuti in un sistema bifasico grazie al fatto che la selettività della PLD nel [BMIm][PF₆] è maggiore che nel tampone) ma provoca una diminuzione della resa di reazione.

Capitolo 5: DERIVATI DEL PG – PRODOTTI AD ALTO VALORE AGGIUNTO

5.1 INTRODUZIONE

L'applicazione di tutti gli esperimenti precedenti ci ha permesso di ottenere prodotti ad alto valore aggiunto utilizzando reagenti abbastanza economici al fine di massimizzare il guadagno.

Ci siamo concentrati sulla sintesi della Cardiolipina⁵⁸, un importante componente della membrana mitocondriale interna (dove garantisce il funzionamento ottimale di alcuni enzimi legati al metabolismo).

La cardiolipina è presente anche nel cuore di diversi animali (la prima volta è stata isolata nel cuore del manzo, da cui il nome "cardiolipina") in quantità molto ridotte; ne consegue una complessità di lavorazione tale da renderne alto il prezzo: infatti 10 mg di prodotto costano 62.70 euro (più iva) sul catalogo Sigma-Aldrich (Figura 5.1).

C0563 SIGMA

Cardiolipin sodium salt from bovine heart

≥98% (TLC), lyophilized powder
Synonym: **Diphosphatidylglycerol**

Prezzo e disponibilità

SKU-Confezionamento	Disponibilità	Prezzi (EUR)	Quantita'
C0563-10MG	✔ Disponibile per la spedizione il 25.06.2014 - DA	62.70	<input type="text" value="0"/> ★ i
C0563-25MG	✔ Disponibile per la spedizione il 25.06.2014 - DA	105.50	<input type="text" value="0"/> ★ i
C0563-100MG	✔ Disponibile per la spedizione il 25.06.2014 - DA	281.50	<input type="text" value="0"/> ★ i
C0563-500MG	✔ Disponibile per la spedizione il 25.06.2014 - DA	1,210.00	<input type="text" value="0"/> ★ i

Figura 5.1 Costi commerciali della Cardiolipina (estratto dal catalogo Sigma-Aldrich).

5.2 SINTESI DELLA CARDIOLIPINA (DIFOSFATIDILGLICEROLO, CLP)

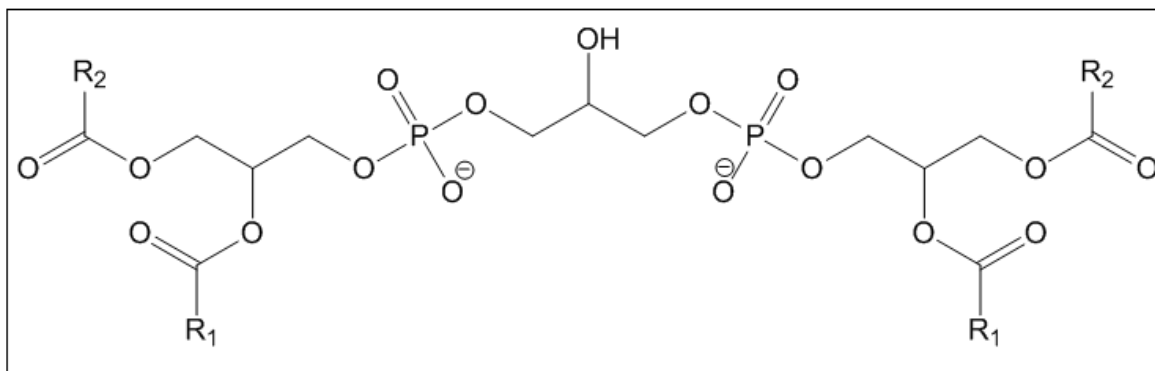


Figura 5.2 Struttura della Cardiolipina (CLP).

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, in un sistema bifasico costituito dal fosfolipide sciolto in toluene (fase organica) e dal tampone sodio acetato (NaAc) 0.1 M a pH 5.6, ioni Ca^{++} sotto forma di CaCl_2 0.1 M e la PLD (fase acquosa).

Successivamente si è studiata la medesima reazione in presenza di percentuali crescenti di liquido ionico [BMIm][PF₆].

Il prodotto finale ottenuto viene dimetilato con diazometano per agevolare la sua caratterizzazione come dimetilestere fosforico. Nell'operazione di metilazione, si modificano anche i composti non reagiti, per cui abbiamo creato dei riferimenti per i reagenti metilati, che si trovano a pagina 88.

5.2.1 Protocollo operativo

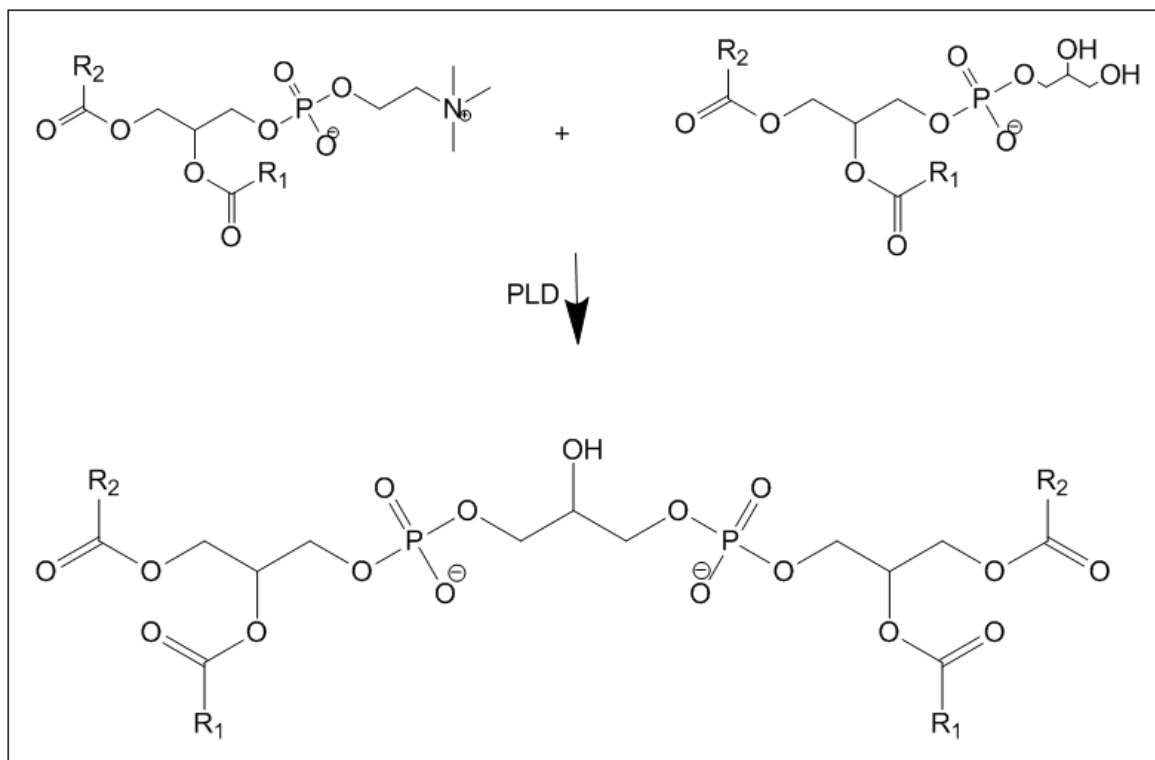


Figura 5.3 Schema di sintesi della Cardiolipina (CLP).

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di aggiungere l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche alla massima potenza. Il tutto è termostatato alla temperatura di 30 °C e lasciata in agitazione per 5 gg, effettuando la sostituzione della fase acquosa e dell'enzima dopo 24 h.

Successivamente, si è proceduto alla metilazione dei gruppi fosfato, la fase toluenica di ciascuna reazione è evaporata, sciolta in 1 mL di soluzione tricomponente (CHCl₃/MeOH/H₂O, 2:1:0.2) e successivamente lavata con HCl 0.1 M (0.2 mL) in modo che i gruppi fosfato si possano protonare; si ottiene dopo blanda agitazione la

separazione fra due fasi, di cui quella sottostante organica contiene il prodotto. A questo punto si effettua un secondo lavaggio con una nuova soluzione tricomponente ((CHCl₃/MeOH/H₂O, 0.1:1:1), si agita e si rimuove la fase acquosa soprastante.

La fase organica rimanente viene allontanata a pressione ridotta con l'uso di un rotavapor, dopodiché si scioglie il residuo in acetato di etile e si gocciola del diazometano (il diazometano è sciolto in etere e si presenta come un liquido giallo; gocciolando il diazometano la soluzione di acetato di etile non assume colore poichè il composto sta reagendo. Quando si comincia a notare un ingiallimento della soluzione significa che il diazometano è in eccesso e bisogna interrompere la procedura).

Il diazometano in eccesso e l'acetato di etile vengono evaporati con flusso di azoto, il residuo viene quindi sciolto in esano-isopropanolo (1:1).

CR049 10% v/v tampone - 90% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	20.2 mg
PG	20 mg	21.0 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	40 µL	40 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
[BMIm][PF ₆]	386.4 mg	393.4 mg

Tabella 5.1 Reazione CR048.

CR048 50% v/v tampone - 50% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	20 mg	19.6 mg
PG	20 mg	19.8 mg
Toluene	400 µL	400 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	200 µL	200 µL
Enzima (PLD)	0.6 mg	0.6 mg
[BMIm][PF ₆]	276 mg	280.4 mg

Tabella 5.2 Reazione CR049.

CR074 100% v/v tampone – 0% IL

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
PC	60 mg	59 mg
PG	60 mg	60.3 mg
Toluene	1200 µL	1200 µL
Tampone NaAc + CaCl ₂	1200 µL	1200 µL
Enzima (PLD)	1.8 mg	1.8 mg

Tabella 5.3 Reazione CR074.

Al termine, le fasi vengono lasciate separare, viene recuperata la fase superiore e il solvente viene allontanato a pressione ridotta mediante l'uso di un rotavapor.

Il residuo giallo risultante viene sciolto in esano : isopropanolo (1:1) e ne viene prelevato un campione per l'analisi HPLC.

Dai cromatogrammi ottenuti (riportati da pag 112 a pag 114) ed utilizzando come riferimenti i cromatogrammi dei composti puri PA, PG, PG metilato e PC si ricava la composizione della miscela di reazione e si riportano i dati ottenuti in grafici opportuni.

5.2.2 Risultati

CAMPIONE	% IL	AREA CLP	AREA PA	AREA PG	AREA PC	AREA PG METILATO	SELETTIVITA'	% NON REAGITI
CR074	0	19595	0	4241	9350	9025	0.464	0.536
CR048	50	7970	0	856	1016	3673	0.59	0.41
CR049	90	21340	0	3483	606	3141	0.747	0.253

Tabella 5.4 Risultati integrazione spettri HPLC.

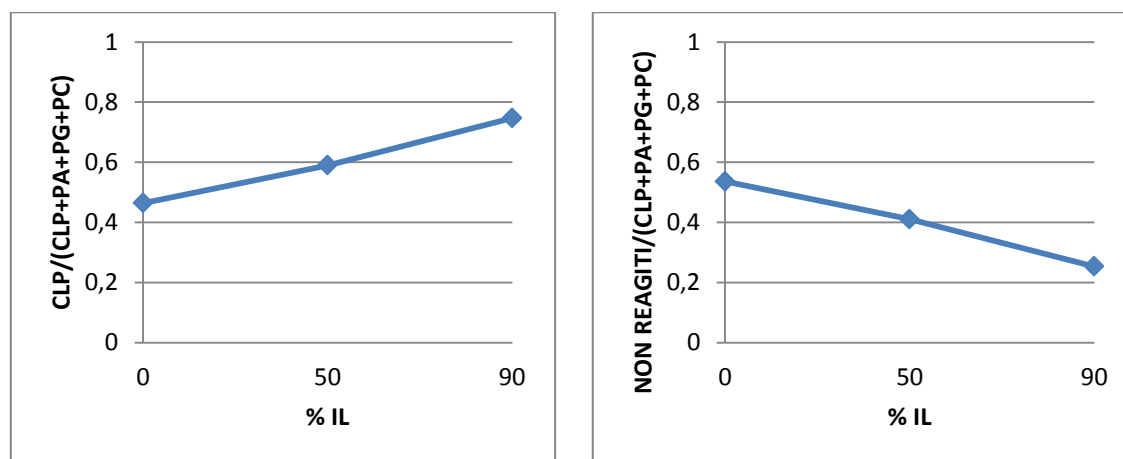


Grafico 5.1 Risultati elaborazione Excel (% IL indica la percentuale di liquido ionico nella miscela tampone-liquido ionico).

Dall'analisi degli spettri di massa (riportati a pagina 121) abbiamo la conferma della presenza della Cardiolipina.

Dall'osservazione dei cromatogrammi, si nota un picco che non può essere assegnato a nessuno dei riferimenti (né puri né metilati); si suppone quindi che questo picco sia associabile alla Cardiolipina.

Si può osservare che all'aumentare della quantità di liquido ionico, la percentuale di Cardiolipina prodotta aumenta a scapito della diminuzione dei non reagenti.

Capitolo 6: ACILAZIONE SELETTIVA DELLA GLICEROFOSFORILCOLINA

6.1 INTRODUZIONE

Dati i risultati ottenuti nelle reazioni di transesterificazione della PC in presenza di liquido ionico, si è pensato di utilizzare questi particolari solventi per mettere a punto una sintesi della LPC senza l'utilizzo della stagno.

L'idea era nata dalla possibilità di effettuare la sintesi totalmente enzimatica di lisofosfolipidi diversi utilizzando un liquido ionico come solvente e 2 enzimi in successione: una lipasi per esterificare la posizione *sn*-1 della GPC e la PLD per transesterificare la testa polare per avere un processo completamente enzimatico di sintesi di un lisofosfolipide modificato ad alto valore aggiunto.

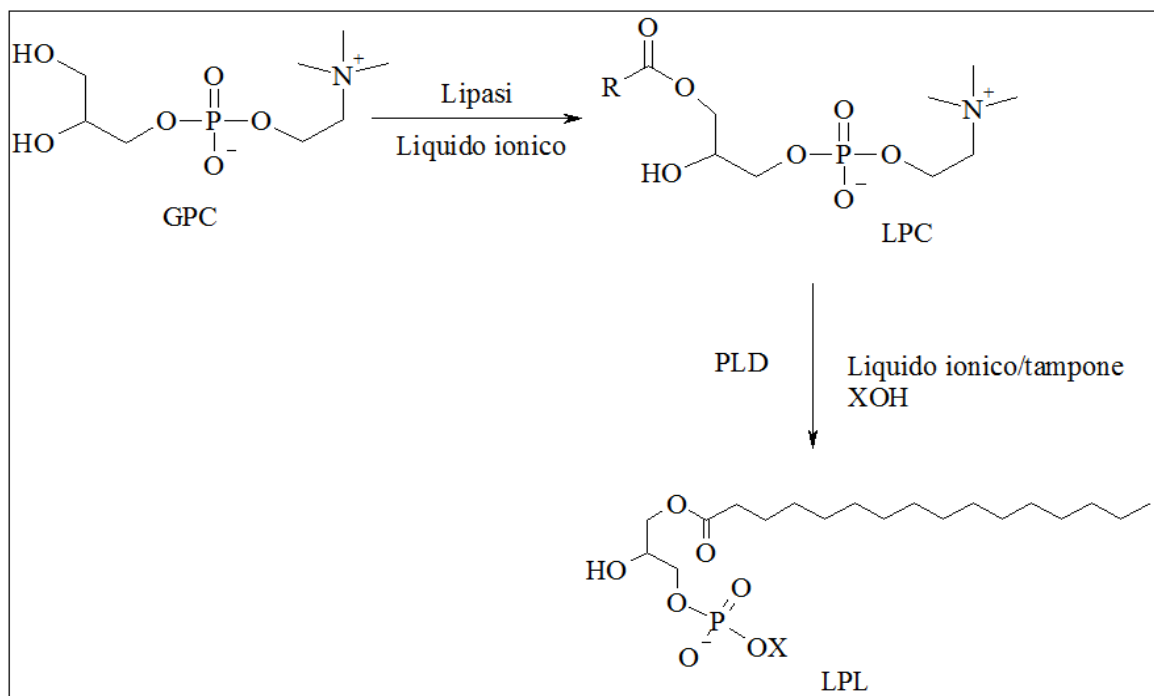


Figura 6.1A Schema della sintesi totalmente enzimatica di fosfolipidi.

I nostri esperimenti invece prevedono l'impiego di liquidi ionici con due obiettivi : sostituire lo stagno e migliorare la procedura con il tert-butanolo.

Il meccanismo di reazione con il dibutilstagno ossido prevede la condensazione del DBTO o dei rispettivi organo stagno derivati con i due gruppi alcolici di un generico diolo a formare l'intermedio ciclico stannilen acetale. Questo, trattato con un generico cloruro acilico, in presenza di una base, fornisce l'intermedio in cui il clorostannossano sull'alcol secondario viene immediatamente staccato per idrolisi a dare il monoacil derivato. Dai dati presenti in letteratura su generici 1,2 dioli si ottiene quasi esclusivamente il prodotto monoacilato.

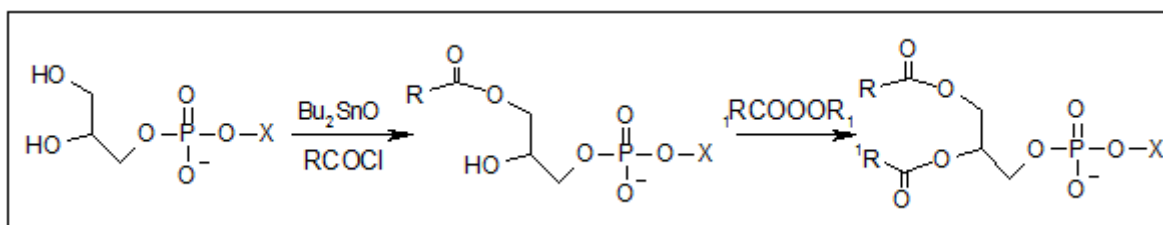


Figura 6.1B Acilazione della GPC mediante dibutilstagno ossido (X=colina).

Si è scelto inoltre l'uso di due enzimi, una lipasi supportata (Novozym 435) e la lipasi ottenuta da *Candida Rugosa* che invece non lo è.

Nelle prove seguenti si riscontrerà l'uso anche di acilanti e liquidi ionici differenti.

6.2 SINTESI DELL'1-LAUROIL-2-LISOPC

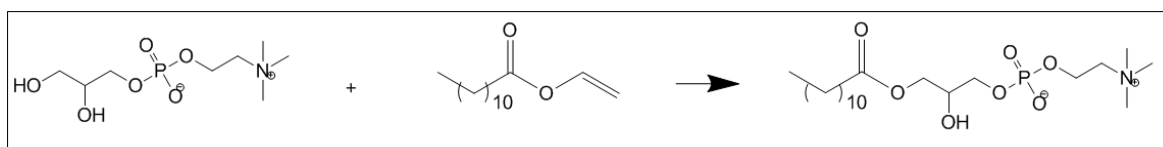


Figura 6.1C 1-Lauroil-2-lisofosfatidilcolina.

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, formata da GPC, enzima, agente acilante, tert-butanolo ed acqua.

Successivamente si è studiata la medesima reazione sostituendo il tert-butanolo con un liquido ionico.

6.2.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 45 °C e posto in agitazione per 24 h.

RC001 Enzima Novozym 435

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	11 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (Novozym 435)	7.78 mg	7.9 mg
Tert-Butanolo	0.15	0.2 mL

Tabella 6.1 Reazione CR001.

RC002 Lipasi da *Candida rugosa*

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10.5 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (da <i>Candida rugosa</i>)	7.78 mg	8.1 mg
Tert-Butanolo	0.15 mL	0.2 mL

Tabella 6.2 Reazione CR002.

CR003 Enzima Novozym 435

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10.3 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (Novozym 435)	7.78 mg	8.2 mg
[EMIm][AcO]	0.15 mL	0.15 mL

Tabella 6.3 Reazione CR003.

CR004 Lipasi da *Candida rugosa*

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10.6 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (da <i>Candida rugosa</i>)	7.78 mg	8.1 mg
[EMIm][AcO]	0.15 mL	0.15 mL

Tabella 6.4 Reazione CR004.

CR005 Enzima Novozym 435

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	11.8 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (Novozym 435)	7.8 mg	7.5 mg
[BMIm][PF ₆]	0.15 mL	0.15 mL

Tabella 6.5 Reazione CR005.

CRO06 Enzima *Candida Rugosa*

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10.01 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (da <i>Candida rugosa</i>)	7.8 mg	8.4 mg
[BMIm][PF ₆]	0.15 mL	0.15 mL

Tabella 6.6 Reazione CR006.

CRO09 Enzima Novozym 435

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (Novozym 435)	7.8 mg	7.7 mg

Tabella 6.7 Reazione CR009.

CRO10 Enzima *Candida Rugosa*

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10.2 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (da <i>Candida rugosa</i>)	7.8 mg	8.6 mg

Tabella 6.8 Reazione CR010.

6.2.2 Risultati

La massa del prodotto desiderato si riscontra solo nelle reazioni in tert-butanolo, mentre in quelle con liquido ionico non se ne verifica la presenza; l'acilazione enzimatica della GPC in liquido ionico non è quindi risultata positiva.

Gli spettri delle masse sono consultabili da pagina 122 a pagina 124.

6.3 SINTESI DELL'1-ACETIL-2-LISOPC

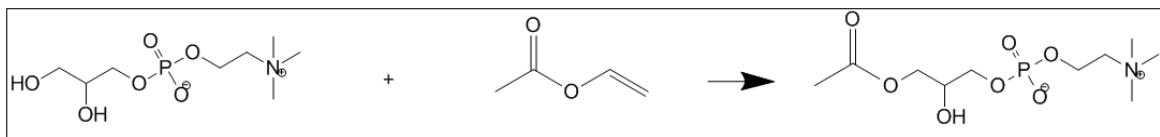


Figura 6.2 1-Acetil-2-lisofosfatidilcolina.

E' stata condotta una reazione pilota in assenza di liquido ionico, formata da GPC, enzima, agente acilante, tert-butanolo ed acqua.

Successivamente si è studiata medesima reazione sostituendo il tert-butanolo con un liquido ionico.

6.3.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 45 °C e posto in agitazione per 24 h.

CR007 Enzima Candida Rugosa

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	11 mg
Vinil acetato	0.14 mL	0.14 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (Novozym 435)	7.8 mg	8.5 mg
Tert-Butanolo	0.15 mL	0.15 mL

Tabella 6.9 Reazione CR007.

CR008 Enzima Novozym 435

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	11 mg
Vinil-Laurato	0.14 mL	0.14 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (da <i>Candida rugosa</i>)	7.8 mg	8.5 mg
Tert-Butanolo	0.2 mL	0.2 mL

Tabella 6.10 Reazione CR008.

6.3.2 Risultati

La massa del prodotto desiderato si riscontra nelle reazioni in tert-butanolo, mentre quelle con il liquido ionico non sono state eseguite.

Gli spettri delle masse sono consultabili a pagina 125.

6.4 SINTESI DEL 1-LAUROIL-2-PALMITOILPC

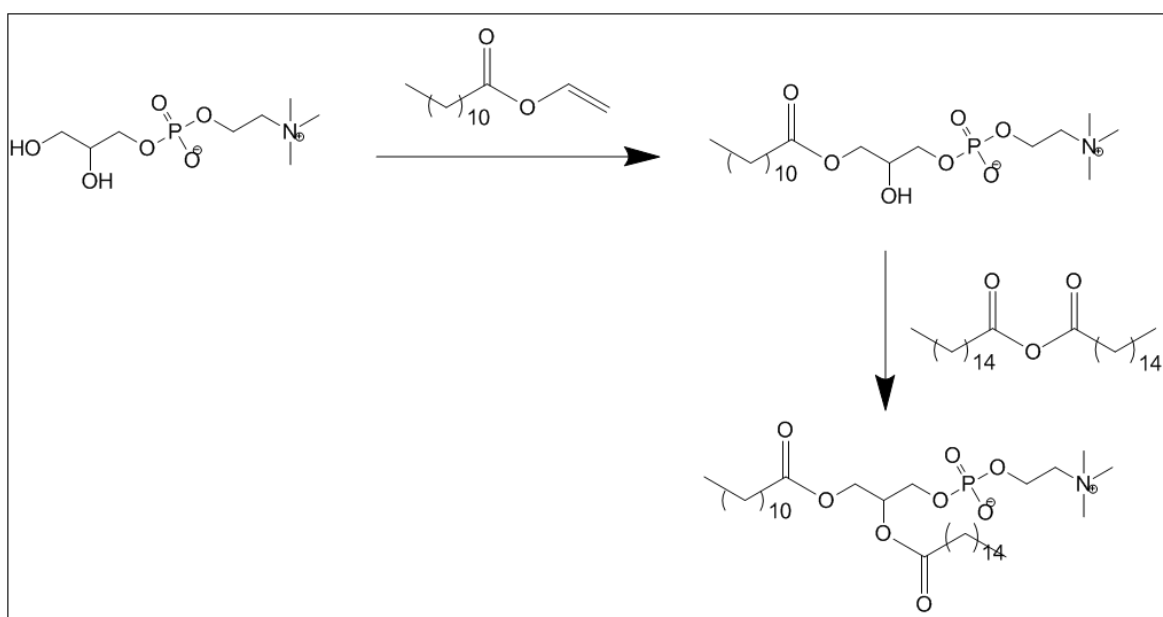


Figura 6.3 1-Lauroil-2-palmitoilfosfatidilcolina.

Si è pensato di diacilare la GPC usando prima il vinil laurato e successivamente l'anidride palmitica per riuscire ad estrarre il prodotto finale diacilato dal liquido ionico più agevolmente rispetto al composto monoacilato.

6.4.1 Protocollo operativo

Si prepara una provetta a fondo piatto e si inseriscono prima le sostanze solide e successivamente quelle liquide, avendo cura di inserire l'enzima per ultimo. L'agitazione di queste prove è fondamentale: verranno usate 3 ancorette magnetiche all'interno della stessa provetta alla massima potenza (1000 rpm). Il tutto è termostatato alla temperatura di 45 °C e posto in agitazione per 24 h.

Viene quindi aggiunta l'anidride palmitica per poter completare la reazione.

Il tutto viene estratto usando etere etilico.

CRO11 – Enzima Novozym 435

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	11.8 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (Novozym 435)	7.8 mg	7.5 mg
[BMIm][PF ₆]	0.15 mL	0.15 mL

Tabella 6.11 Reazione CR011.

CRO12 – Enzima Candida Rugosa

COMPOSTO	PESO TEORICO	PESO REALE
GPC	10 mg	10.01 mg
Vinil laurato	0.4 mL	0.4 mL
H ₂ O	2.8 µL	2.8 µL
Lipasi (da <i>Candida rugosa</i>)	7.8 mg	8.4 mg
[BMIm][PF ₆]	0.15 mL	0.15 mL*

Tabella 6.12 Reazione CR012.

*vengono usate due aggiunte di IL per poter essere certi di solubilizzare tutta la GPC

6.4.2 Risultati

La massa del prodotto (sia mono che diacilato) non si riscontra con l'analisi di massa.

Gli spettri delle masse sono riportati a pagina 126.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha riguardato il possibile utilizzo di liquidi ionici nelle trasformazioni enzimatiche di fosfolipidi naturali.

Nella prima parte utilizzando la GPC come composto di partenza e nell'ottica di evitare l'utilizzo dello Sn, per l'acilazione selettiva abbiamo tentato di acilare selettivamente le due posizioni *sn-1* e *sn-2* con una catalisi unicamente enzimatica ed impiegando un liquido ionico come solvente. Purtroppo gli enzimi testati non hanno dato rese sufficientemente apprezzabili del prodotto desiderato (1-lauroil-2-lisoPC, 1-acetil-2-lisoPC e 1-lauroil-2-palmitoilPC).

Viceversa nella seconda parte, l'utilizzo dei liquidi ionici nelle transfosfatidilazioni enzimatiche della testa polare dei fosfolipidi naturali con vari alcoli ha permesso di ottenere in alcuni casi dei risultati molto soddisfacenti in termini di selettività e conversione: la presenza del [BMIm][PF₆] ha infatti diminuito la formazione dell'acido fosfatidico permettendo l'isolamento del prodotto transesterificato in ottime rese.

Questo lavoro ha quindi dimostrato come la fosfolipasi D da *Streptomyces PMF* è molto stabile e mantiene la sua attività catalitica in presenza di [BMIm][PF₆] con una selettività molto elevata. In particolare abbiamo ottenuto il fosfatidilglicerolo, il fosfatidilallile, il fosfatidilglucosio e la cardiolipina .

È tutt'ora in corso uno studio più approfondito sulla transesterificazione con altri alcoli e sulle motivazioni teorico/pratiche che portano ad avere rese e selettività molto diverse a seconda della natura del nucleofilo utilizzato.

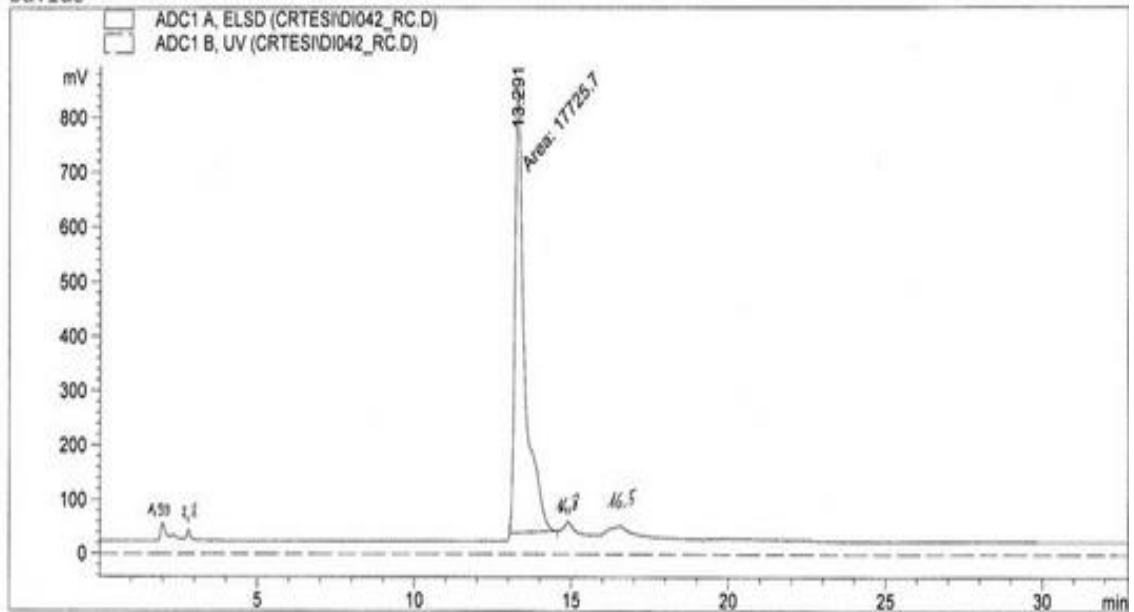
ANALISI HPLC

PC , usando nuovo gradiente . super diluito
per confermare i picchi

UV: 210 nm ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
termostata a 55°C
Colonna Diol 250*4.6mm

```
=====
Injection Date : 01/04/2014 13.16.21
Sample Name    : PC rif                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed  : 01/04/2014 9.26.25 by CARLO
                (modified after loading)
=====
```

Davide



```
=====
Area Percent Report
=====
```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	13.291	MM	0.3604	1.77257e4	819.82544	100.0000
2	14.232	Rsho	0.0000	0.00000	12.85112	0.0000

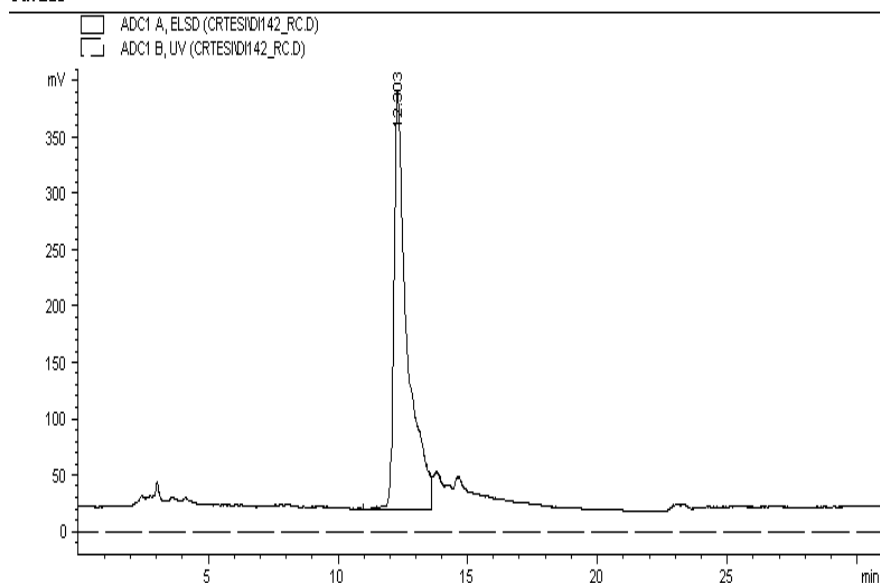
Allegato 1 : analisi HPLC della PC di riferimento

PG rif in esano/isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 11/06/2014 10.02.45
Sample Name    : PG rif                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 11/06/2014 8.35.12 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 26/06/2014 9.52.07 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSL

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	12.303	VV	0.5083	1.33357e4	371.97437	100.0000

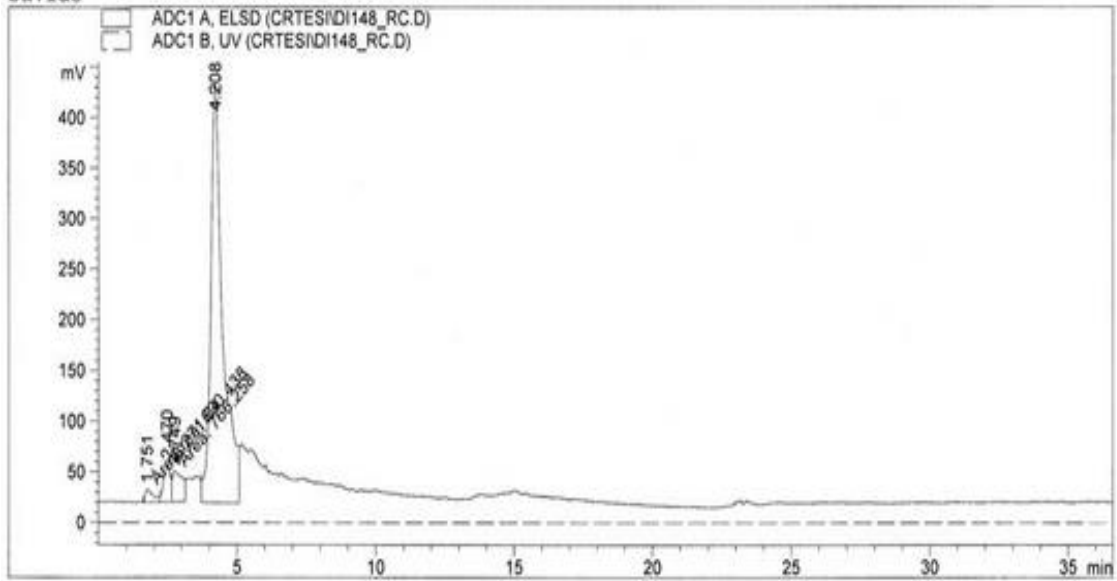
Allegato 2 : analisi HPLC della PG di riferimento

PG met in esano/isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostatata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 12/06/2014 12.25.57
Sample Name    : PG met                               Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 12/06/2014 11.01.14 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 12/06/2014 13.02.50 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	1.751	MF	0.3339	271.03995	13.52957	1.9272
2	2.470	FM	0.2811	630.43811	37.37500	4.4827
3	2.749	FM	0.4151	766.25818	30.76727	5.4485
4	4.208	VV	0.4200	1.23960e4	413.20981	88.1416

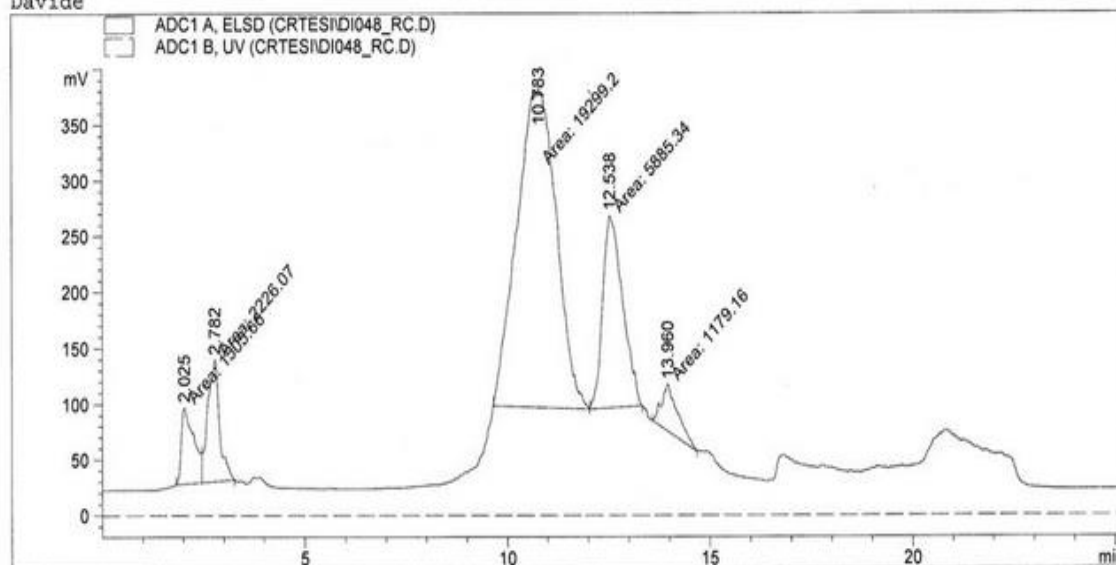
Allegato 3 : analisi HPLC della PG metilata di riferimento

PA di riferimento , usando nuovo gradiente

UV: 210 nm ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
termostata a 55°C
Colonna Diol 250*4.6mm

```
=====
Injection Date   : 01/04/2014 16.15.39
Sample Name      : PA rif
Acq. Operator    : CARLO
Acq. Instrument  : hp1100
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed     : 01/04/2014 9.26.25 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed     : 01/04/2014 16.39.31 by CARLO
                  (modified after loading)
=====
```

Davide



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ELSD

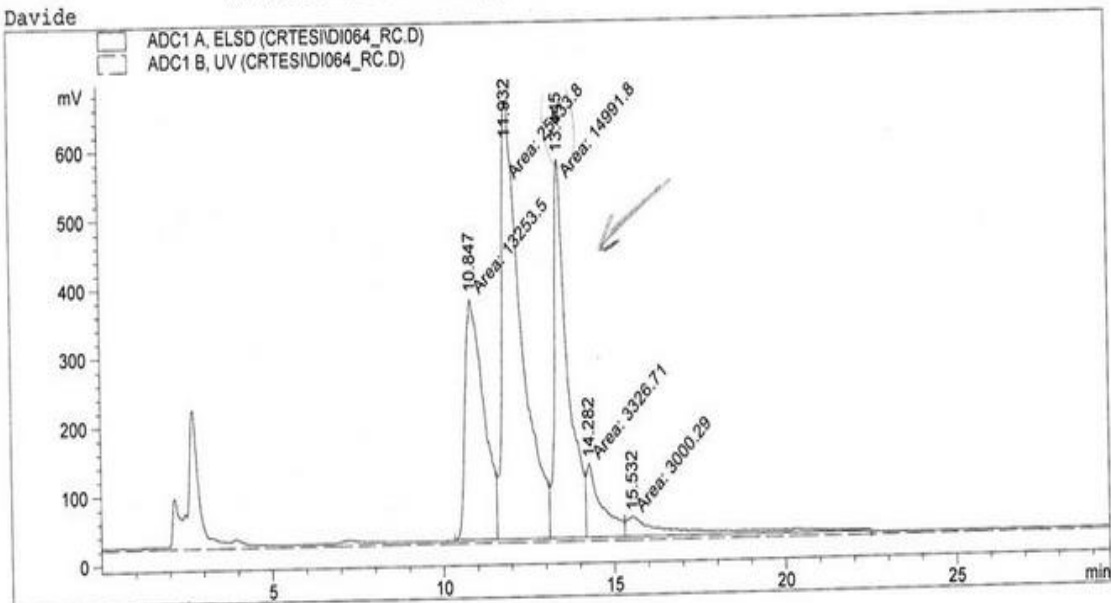
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	2.025	MF	0.3637	1505.65845	68.99636	5.0029
2	2.782	FM	0.3394	2226.06982	109.30408	7.3967
3	10.783	MM	1.1361	1.92992e4	283.11874	64.1267
4	12.538	MM	0.5726	5885.33984	171.30095	19.5556
5	13.960	MM	0.4693	1179.15515	41.88066	3.9181

Allegato 4 : analisi HPLC del PA di riferimento

PG+PA+PC rif (campione equimolare), usando nuovo gradiente
 nte
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

=====
 Injection Date : 04/04/2014 13.44.06
 Sample Name : PG+PA+PC Location : -
 Acq. Operator : CARLO
 Acq. Instrument : hp1100
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
 Last changed : 04/04/2014 11.30.31 by CARLO
 (modified after loading)

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	10.847	MF	0.6274	1.32535e4	352.09610	22.0869
2	11.932	MF	0.6585	2.54338e4	643.68591	42.3854
3	13.445	MF	0.4519	1.49918e4	552.87885	24.9838
4	14.282	MF	0.5131	3326.71191	108.06223	5.5440
5	15.532	FM	1.7058	3000.29224	29.31483	5.0000

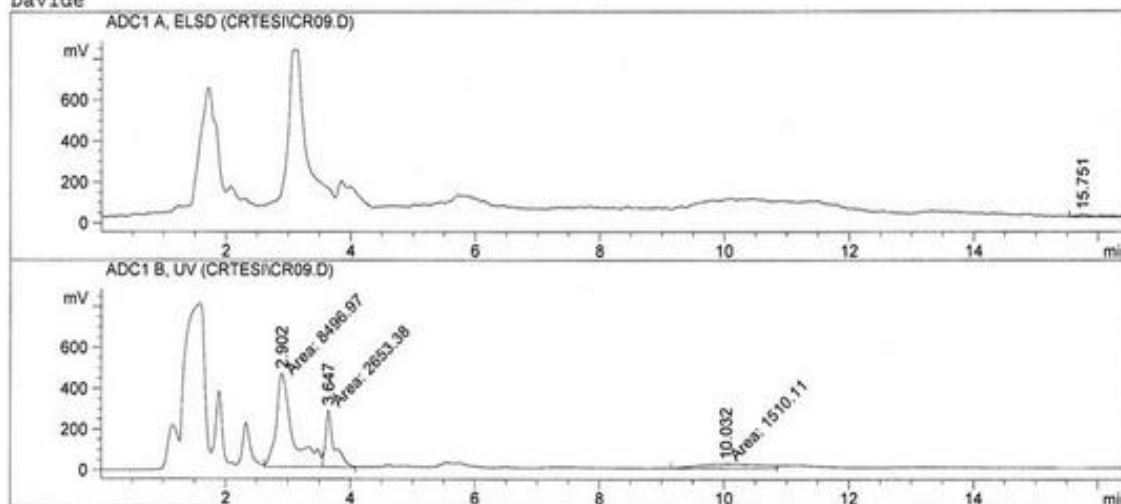
Allegato 5 : analisi HPLC del mix PC+PG+PA di riferimento

Mix reazione CR021 in diclorometano (minor diluizione)
 UV: 210 nm
 ELSD: 52°C, 3.1 bar
 eluente: esano isopropanolo tampone (NaAc pH 4.2) 8:8:1

```

=====
Injection Date : 10/03/2014 13.10.26
Sample Name    : CR021H conc                Location   : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 10/03/2014 13.03.43 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 17/04/2014 13.45.20 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	15.751	VBA	0.3594	302.15970	11.77610	100.0000

Totals : 302.15970 11.77610

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: ADC1 B, UV

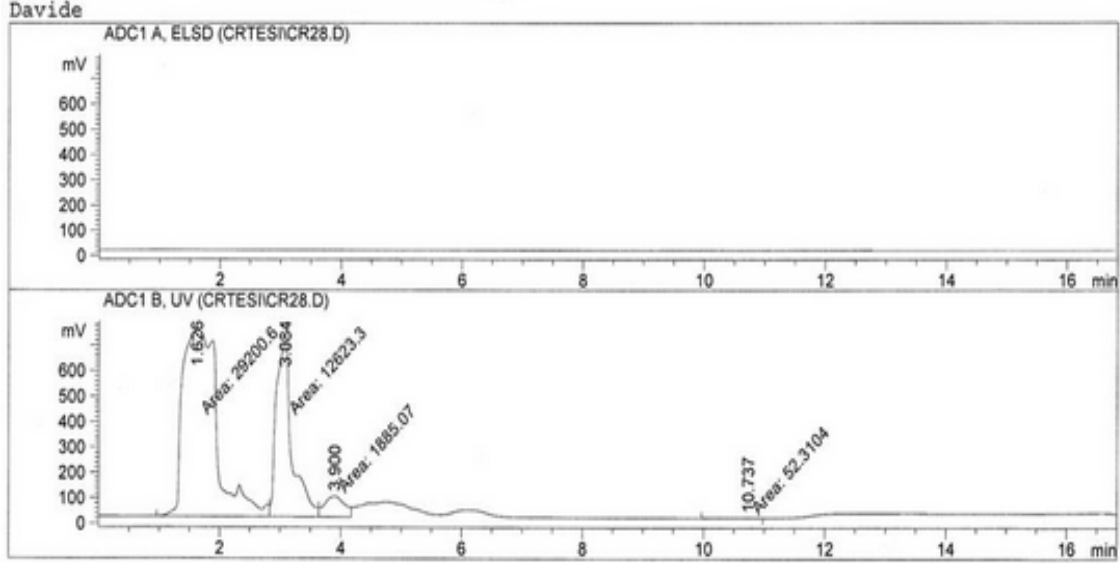
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	2.902	MF	0.3089	8496.96777	458.52475	67.1142
2	3.647	MF	0.1580	2653.37524	279.85632	20.9580
3	10.032	MF	1.2213	1510.11133	20.60730	11.9278

Allegato 6 : analisi HPLC della reazione CR021

CR025H in diclorometano (estratto dopo 24h di reazione e passaggio in rotavapor)
 UV: 210 nm
 ELSD: 52°C, 3.1 bar
 eluente: esano isopropanolo tampone (NaAc pH 4.2) 8:8:1

```

=====
Injection Date   : 14/03/2014 9.18.31
Sample Name     : CR025H
Acq. Operator   : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 14/03/2014 9.06.14 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 17/04/2014 11.38.26 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Signal 2: ADC1 B, UV

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	1.626	MF	0.6635	2.92006e4	733.49689	66.7271
2	3.084	MF	0.3000	1.26233e4	701.30756	28.8457
3	3.447	Rsho	0.0000	0.00000	92.06627	0.0000
4	3.900	MF	0.3850	1885.07446	81.61416	4.3076
5	10.737	MM	0.6517	52.31036	1.33775	0.1195

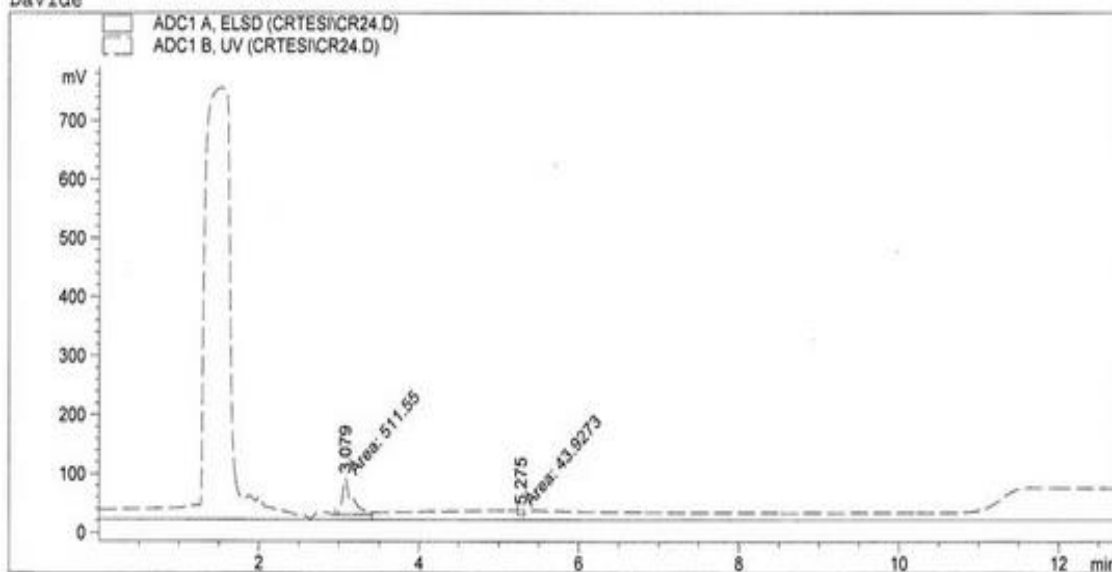
Allegato 7 : analisi HPLC della reazione CR025

CR023A in diclorometano (estratto dopo 24h di reazione
 e passaggio in rotavapor)
 UV: 210 nm
 ELSD: 52°C, 3.1 bar
 eluente: esano isopropanolo tampone (NaAc pH 4.2) 8:8:1

```

=====
Injection Date   : 13/03/2014 12.04.01
Sample Name      : CR023H                      Location   : -
Acq. Operator    : CARLO
Acq. Instrument  : hp1100
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed     : 13/03/2014 11.39.09 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed     : 17/04/2014 13.47.29 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Signal 2: ADC1 B, UV

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	3.079	MM	0.1400	511.54953	60.91731	92.0920
2	5.275	MM	0.0863	43.92726	8.48193	7.9080

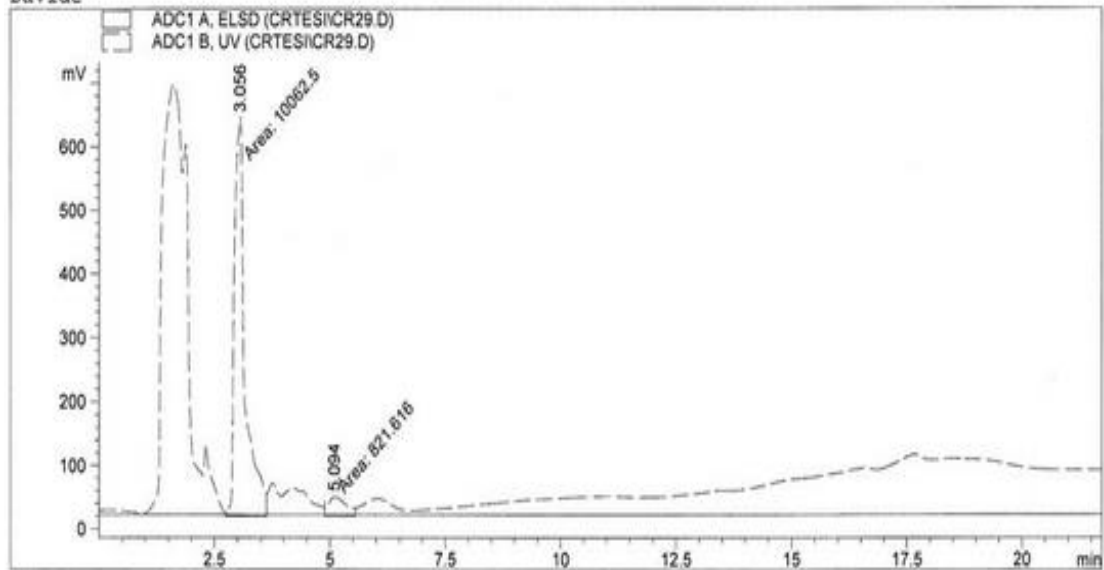
Allegato 8 : analisi HPLC della reazione CR023

CR026 in diclorometano (estratto dopo 24h di reazione e
 passaggio in rotavapor)
 UV: 210 nm
 ELSD: 52°C, 3.1 bar
 eluente: esano isopropanolo tampone (NaAc pH 4.2) 8:8:1

```

=====
Injection Date : 14/03/2014 9.37.32
Sample Name    : CR026H                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 14/03/2014 9.06.14 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 17/04/2014 13.47.29 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Signal 2: ADC1 B, UV

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	3.056	MF	0.2680	1.00625e4	625.85742	92.4513
2	5.094	MF	0.4564	821.61597	30.00140	7.5487

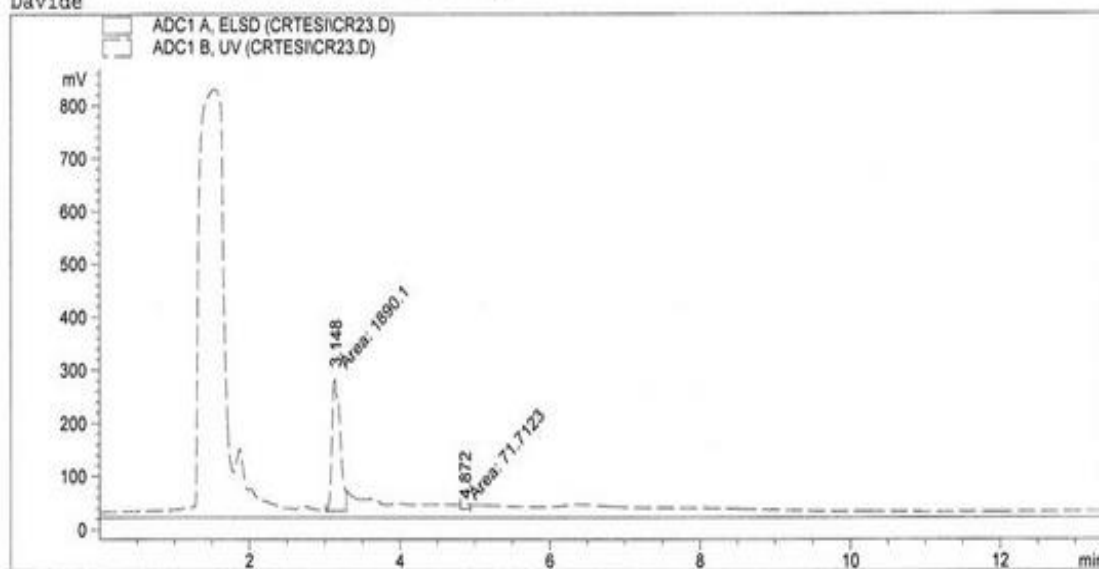
Allegato 9 : analisi HPLC della reazione CR026

CR024A in diclorometano (estratto dopo 24h di reazione
 e passaggio in rotavapor)
 UV: 210 nm
 ELSD: 52°C, 3.1 bar
 eluente: esano isopropanolo tampone (NaAc pH 4.2) 8:8:1

```

=====
Injection Date   : 13/03/2014 11.48.57
Sample Name     : CR024H                               Location : -
Acq. Operator   : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 13/03/2014 11.39.09 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 17/04/2014 13.47.29 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Signal 2: ADC1 B, UV

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	3.148	MF	0.1211	1890.09717	260.05942	96.3446
2	4.872	MF	0.1267	71.71233	9.42999	3.6554

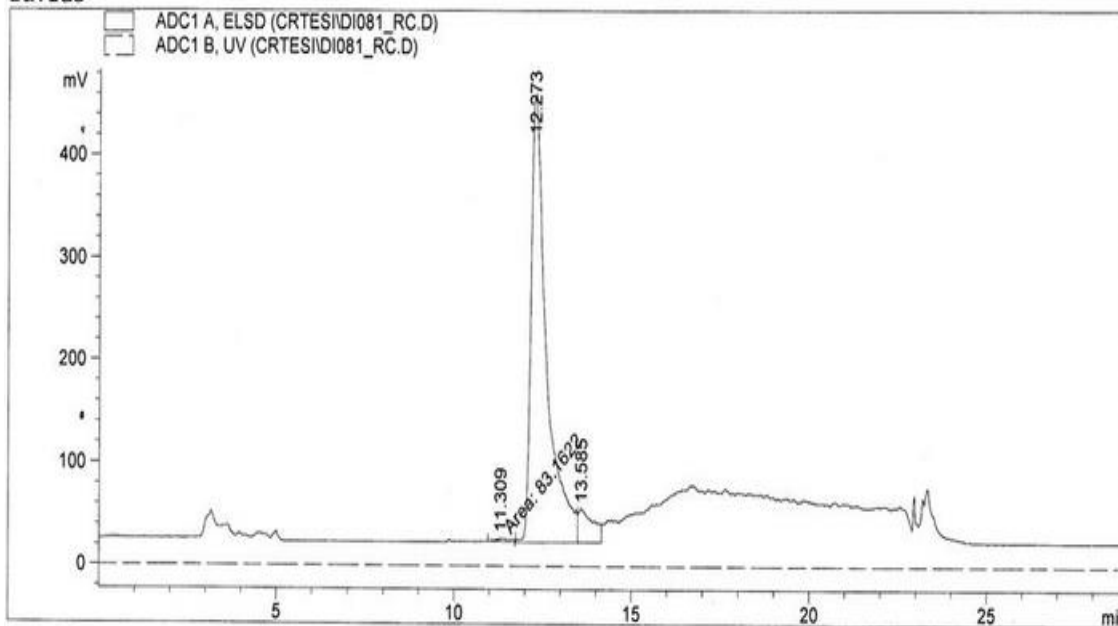
Allegato 10 : analisi HPLC della reazione CR024

CR022Z in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 10/04/2014 11.56.43
Sample Name    : CR022Z                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 10/04/2014 11.52.57 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	11.309	MM	0.5154	83.16216	2.68946	0.5798
2	12.273	VV	0.4442	1.32842e4	437.61478	92.6238
3	13.585	VV	0.3928	974.74823	33.16961	6.7964

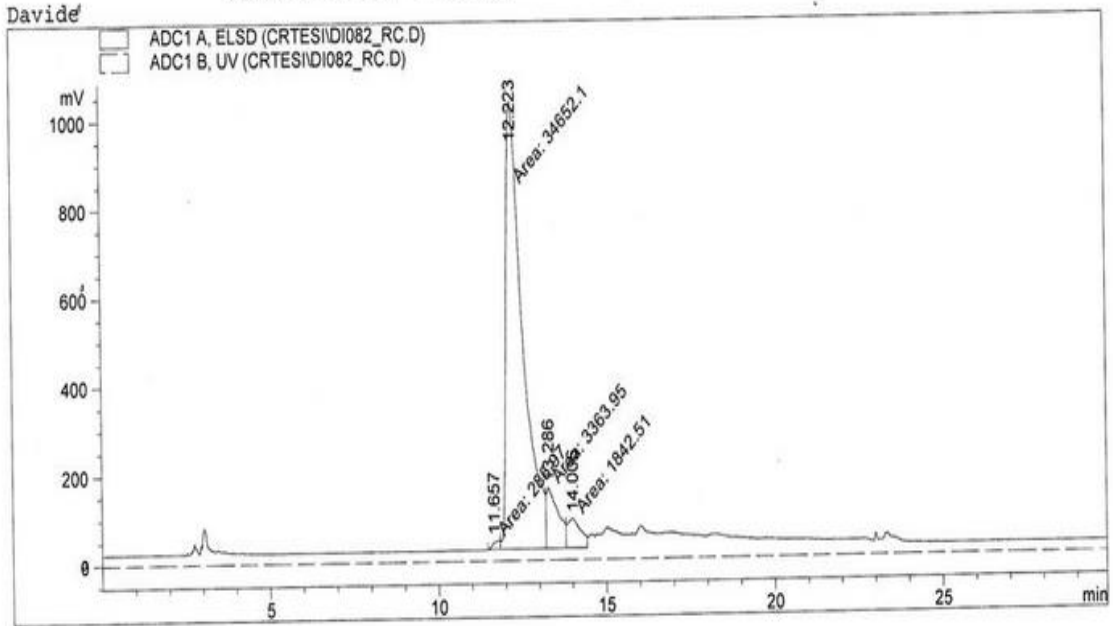
tot/area 100,75

Allegato 11 : analisi HPLC della reazione CR022Z

CR042H in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 10/04/2014 12.30.02
Sample Name    : CR042H                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 10/04/2014 11.52.57 by CARLO
                (modified after loading)
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	11.657	MF	0.2321	285.97009	20.53287	0.7124
2	12.223	MF	0.5727	3.46521e4	1008.47729	86.3184
3	13.286	FM	0.4100	3363.95410	136.74942	8.3796
4	14.006	FM	0.4548	1842.50562	67.52723	4.5897

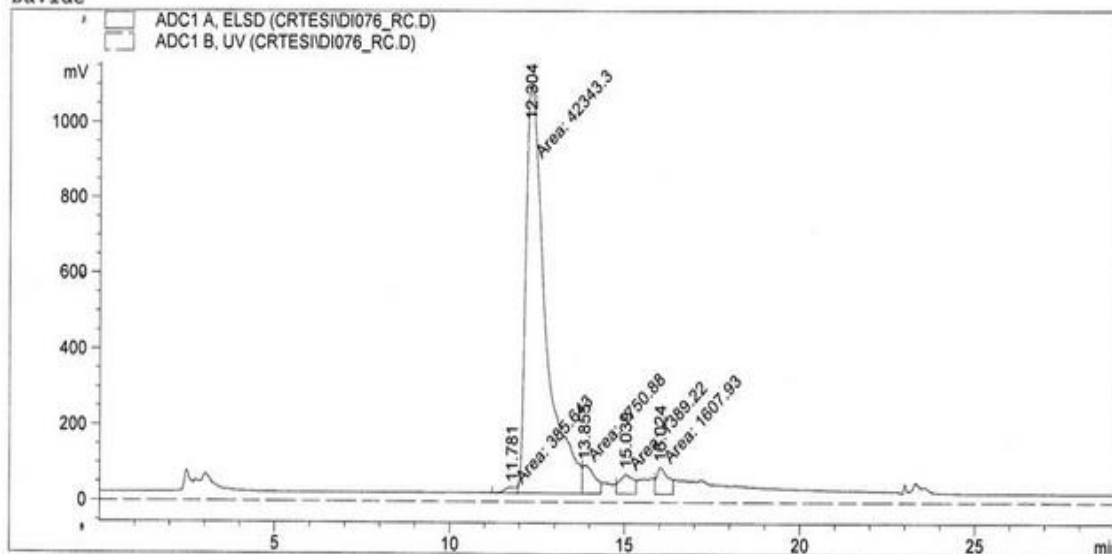
Allegato 12 : analisi HPLC della reazione CR042

CR035 (fase toluenica soprastante) in esano\isopropanol
 O
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date   : 09/04/2014 10.54.00
Sample Name     : CR035tol                      Location : -
Acq. Operator   : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 09/04/2014 10.55.01 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 10/04/2014 11.52.57 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By           : Signal
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	11.781	MF	0.4200	385.64252	15.30214	0.8123
2	12.304	FM	0.6564	4.23432e4	1075.19543	89.1870
3	12.836	Rsho	0.0000	0.00000	308.39749	0.0000
4	13.855	MF	0.3945	1750.88354	73.96891	3.6879
5	15.039	MF	0.4481	1389.22205	51.67573	2.9261
6	16.024	FM	0.3804	1607.92969	70.45564	3.3868

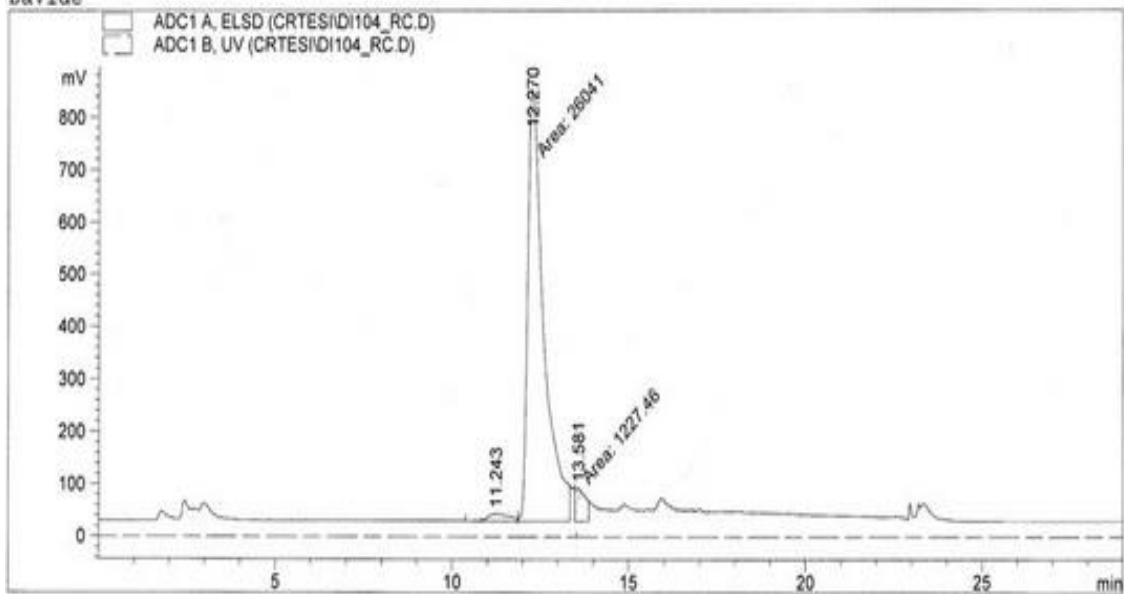
Allegato 13 : analisi HPLC della reazione CR035

CR061 in esano isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 18/04/2014 11.41.43
Sample Name    : CR061                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 18/04/2014 11.17.30 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 09/05/2014 8.40.16 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	11.243	VV	0.5980	612.33533	14.06272	2.1963
2	12.270	MF	0.5298	2.60410e4	819.19025	93.4012
3	13.581	MM	0.3173	1227.45984	64.48427	4.4025

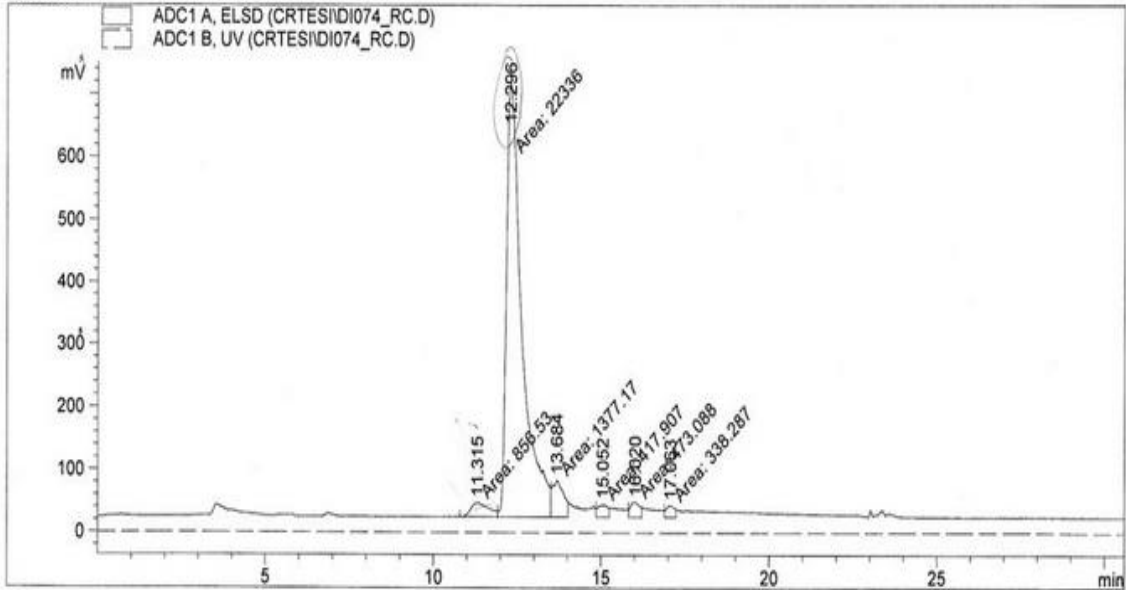
Allegato 14 : analisi HPLC della reazione CR061

CR038 in esano\isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 08/04/2014 13.06.36
Sample Name    : CR038                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 08/04/2014 13.04.19 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	11.315	MF	0.6345	856.53009	22.49812	3.3200
2	12.296	MF	0.5404	2.23360e4	688.92572	86.5771
3	13.684	MF	0.3883	1377.16650	59.11578	5.3381
4	15.052	MF	0.3389	417.90726	20.55373	1.6199
5	16.020	MF	0.3263	473.08832	24.16072	1.8337
6	17.063	MF	0.2980	338.28683	18.91966	1.3112

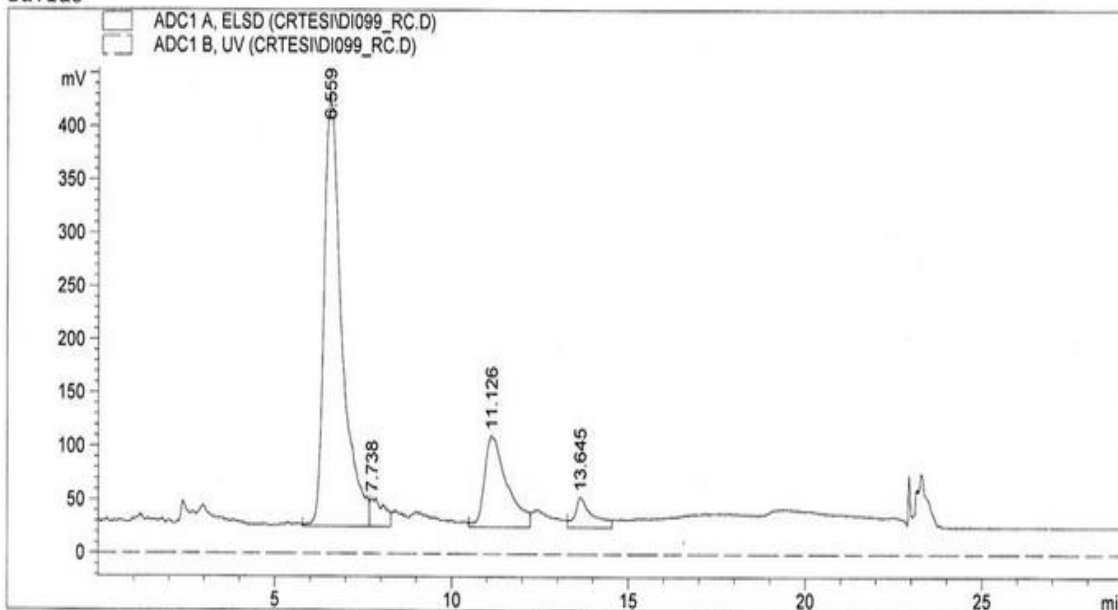
Allegato 15 : analisi HPLC della reazione CR038

CR55 parte sopra in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 16/04/2014 11.01.38
Sample Name    : CR055                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 10.45.28 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	6.559	VV	0.5247	1.40204e4	404.16803	72.0665
2	7.738	VV	0.3264	691.41809	26.32754	3.5540
3	11.126	VV	0.6380	3775.24219	85.02894	19.4051
4	13.645	VV	0.4725	967.77197	28.04868	4.9744

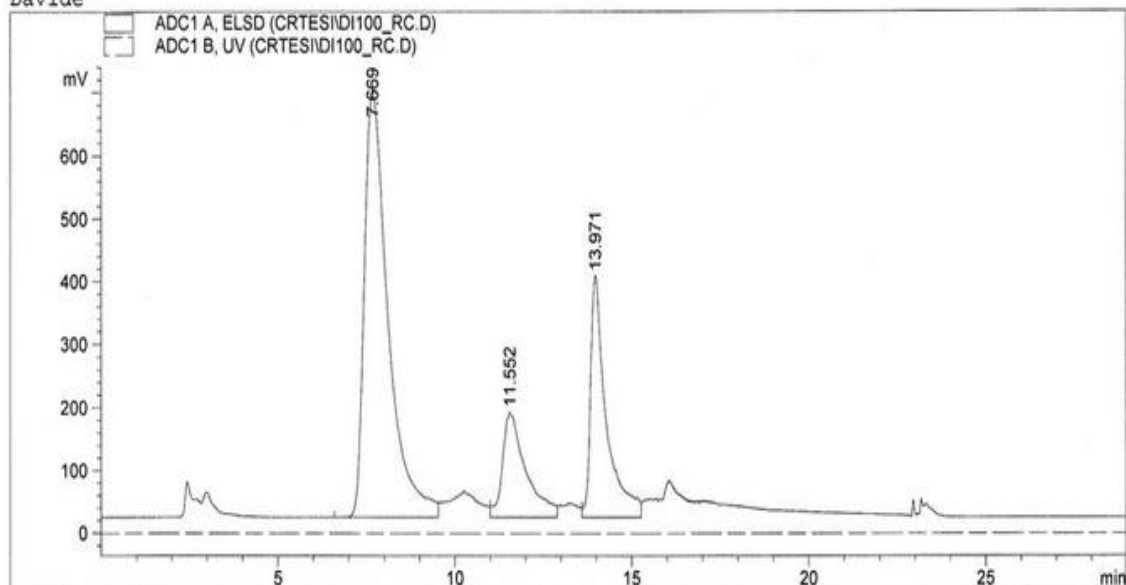
Allegato 16 : analisi HPLC della reazione CR055

CR56 in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 16/04/2014 11.32.00
Sample Name    : CR056                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 10.45.28 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 12.00.47 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	7.669	VV	0.6838	3.15538e4	676.99756	61.7418
2	11.552	VV	0.6479	7694.25439	166.88676	15.0555
3	13.971	VV	0.4311	1.18580e4	383.07999	23.2028

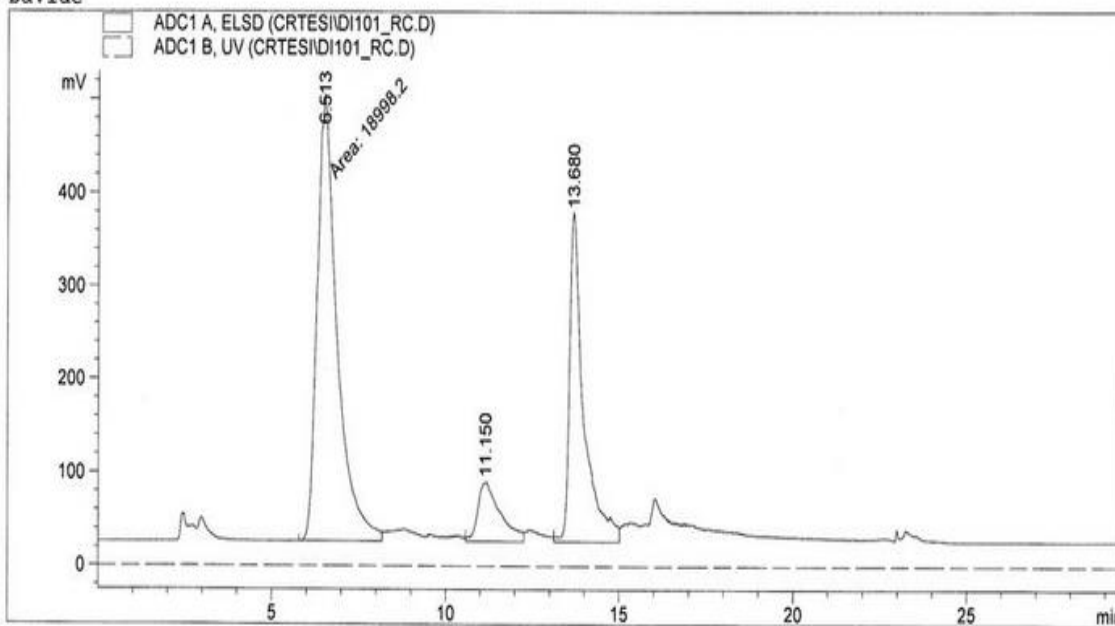
Allegato 17 : analisi HPLC della reazione CR056

CR57 in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 16/04/2014 13.35.29
Sample Name    : CR057
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 13.25.19 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	6.513	MM	0.6665	1.89982e4	475.09125	59.7271
2	11.150	VV	0.6089	2869.01904	63.28465	9.0197
3	13.680	VV	0.3994	9941.14941	352.08496	31.2532

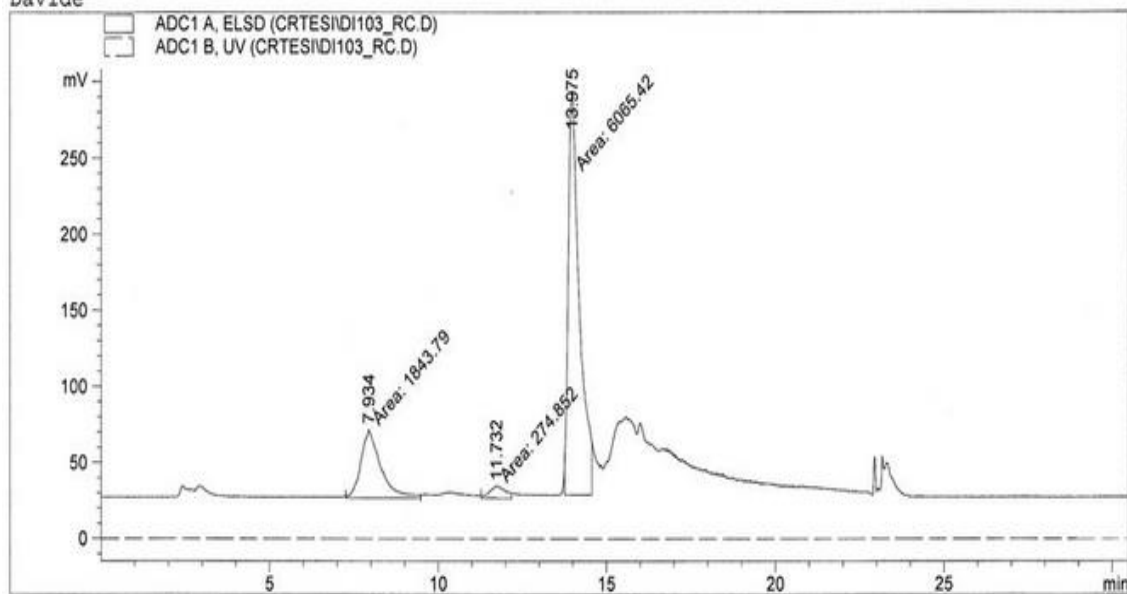
Allegato 18 : analisi HPLC della reazione CR057

CR59 in esano isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date   : 17/04/2014 11.14.32
Sample Name      : CR059
Acq. Operator    : CARLO
Acq. Instrument  : hp1100
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed     : 17/04/2014 11.38.26 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed     : 17/04/2014 11.46.04 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELS

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	7.934	MF	0.6812	1843.78772	45.10990	22.5290
2	11.732	MF	0.5758	274.85175	7.95634	3.3584
3	13.975	FM	0.3825	6065.42041	264.27209	74.1126

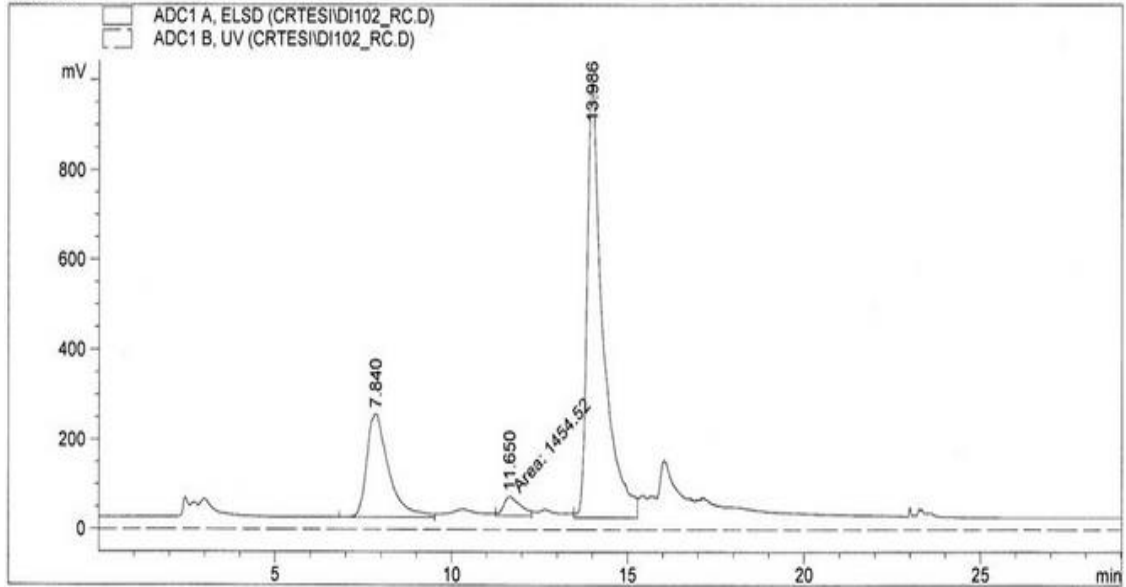
Allegato 19 : analisi HPLC della reazione CR059

CR58 in esano isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostatata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 16/04/2014 14.06.29
Sample Name    : CR058                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 13.25.19 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 14.35.14 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	7.840	VV	0.6027	9973.08984	231.45123	23.9004
2	11.650	MM	0.5655	1454.52026	42.86703	3.4857
3	13.986	VV	0.4461	3.03000e4	965.63086	72.6138

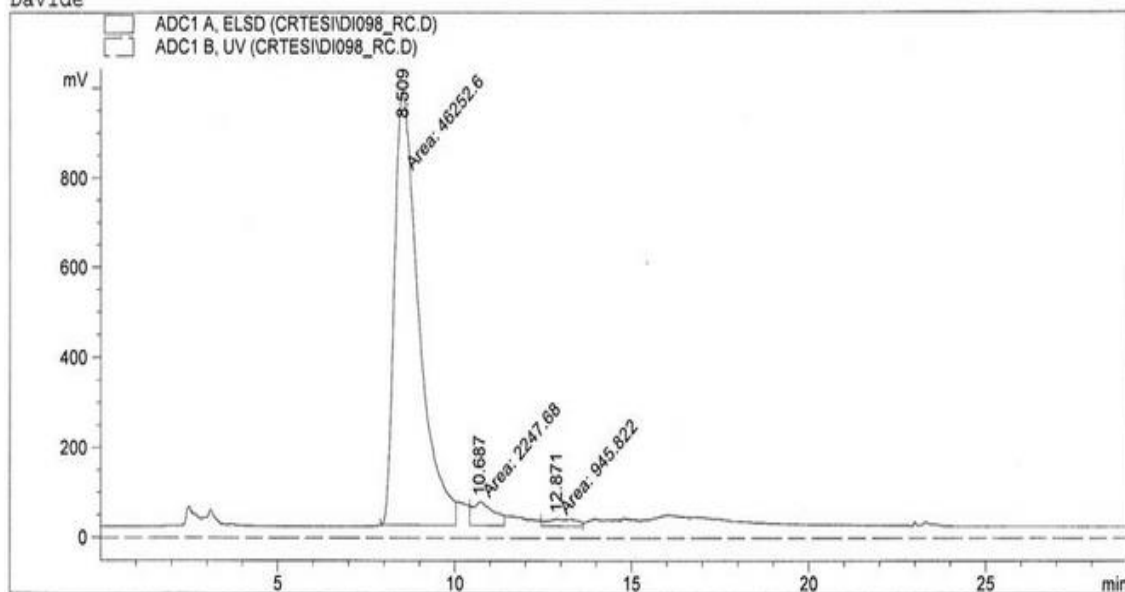
Allegato 20 : analisi HPLC della reazione CR058

CR50 (più diluito) in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 15/04/2014 15.16.50
Sample Name    : CR050
Location      : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 15/04/2014 14.44.26 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 14.35.14 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	8.509	MF	0.7972	4.62526e4	967.03027	93.5415
2	10.687	FM	0.7082	2247.67676	52.89565	4.5457
3	12.871	MF	0.8100	945.82227	17.12142	1.9128

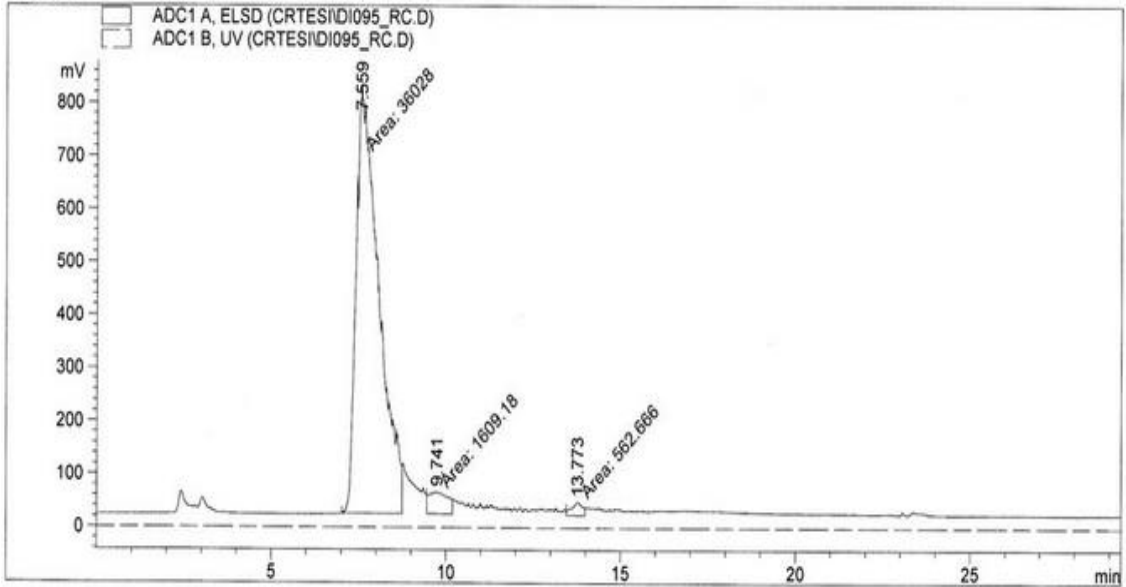
Allegato 21 : analisi HPLC della reazione CR050

CR51 in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 15/04/2014 13.43.52
Sample Name    : CR051                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 15/04/2014 13.00.14 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 14.35.14 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	7.559	MF	0.7370	3.60280e4	814.77765	94.3145
2	9.741	MF	0.6361	1609.18005	42.15951	4.2125
3	13.773	FM	0.3711	562.66602	25.26718	1.4730

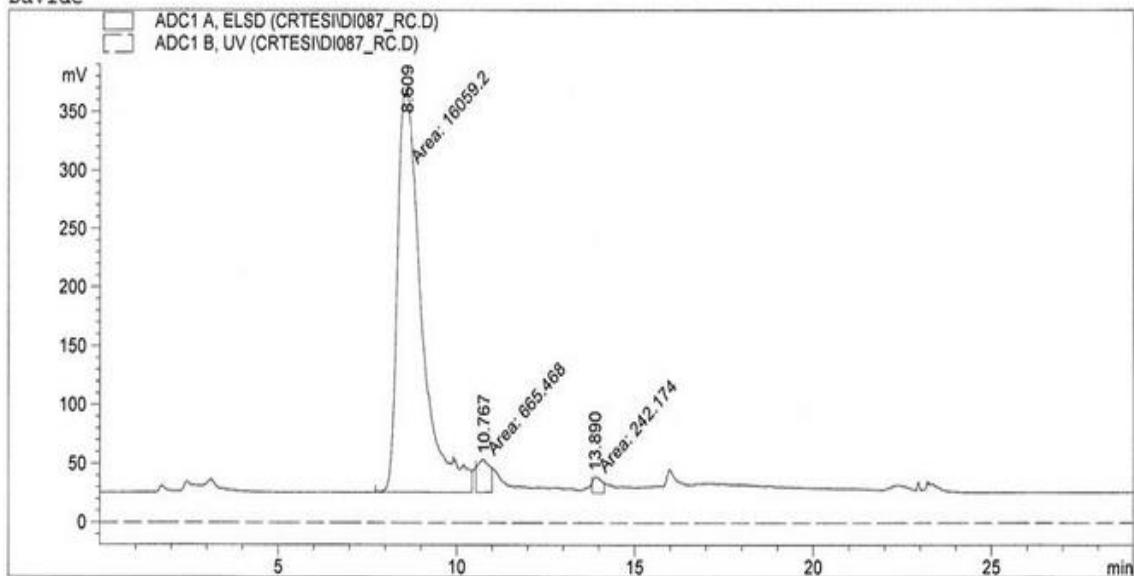
Allegato 22 : analisi HPLC della reazione CR051

CR046 in diclorometano
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date   : 11/04/2014 10.24.29
Sample Name     : CR046
Acq. Operator   : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 11/04/2014 9.47.19 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 16/04/2014 14.35.14 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	8.609	MF	0.7752	1.60592e4	345.25037	94.6505
2	9.248	Rsho	0.0000	0.00000	74.19002	0.0000
3	10.767	MF	0.3951	665.46771	28.07410	3.9222
4	13.890	FM	0.2882	242.17406	14.00569	1.4273

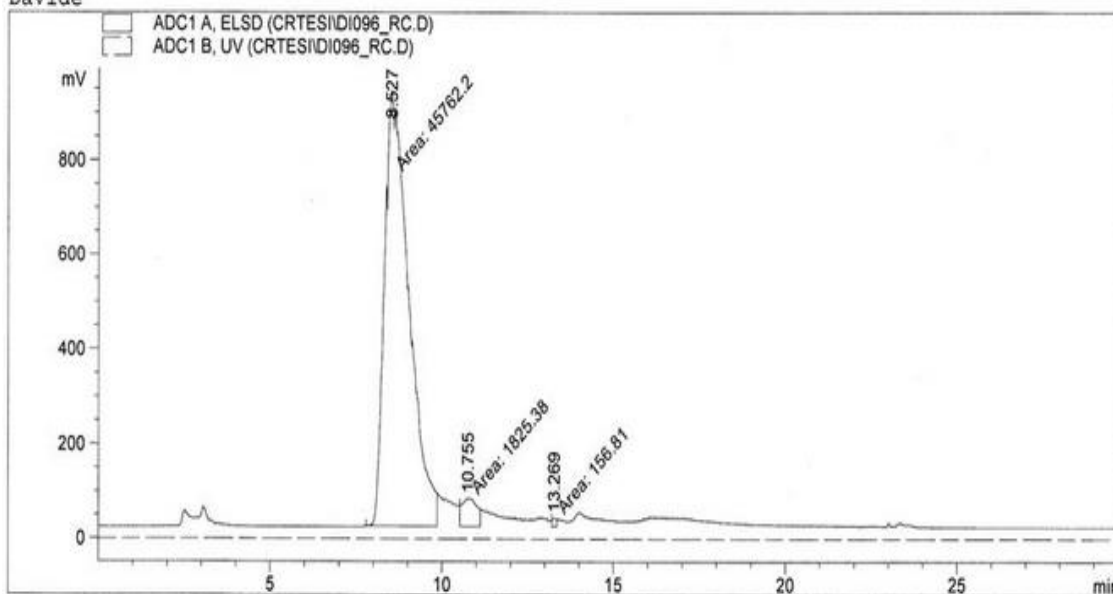
Allegato 23 : analisi HPLC della reazione CR046

CR52 in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostatata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 15/04/2014 14.14.32
Sample Name    : CR052
Location      : -
Acq. Operator : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed  : 15/04/2014 13.00.14 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed  : 16/04/2014 14.35.14 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	8.527	MF	0.8271	4.57622e4	922.10175	95.8483
2	10.755	MF	0.5105	1825.38440	59.59486	3.8232
3	13.269	FM	0.1381	156.81033	18.91813	0.3284

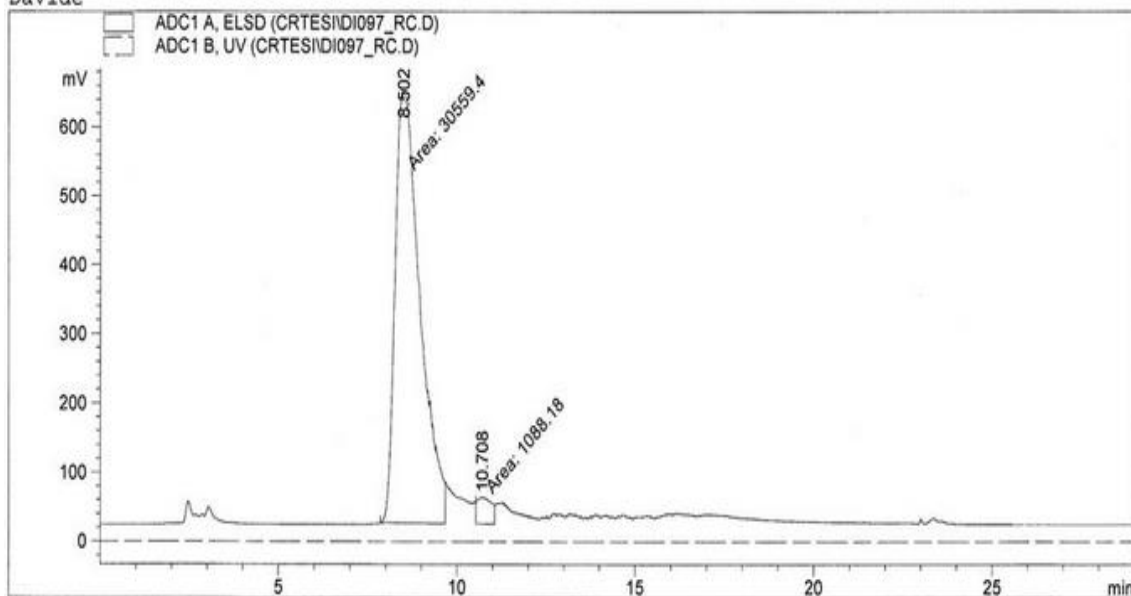
Allegato 24 : analisi HPLC della reazione CR052

CR53 in esano isopropanolo
 ELSD: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 15/04/2014 14.46.05
Sample Name    : CR053
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 15/04/2014 14.44.26 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 16/04/2014 14.35.14 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	8.502	MF	0.8136	3.05594e4	625.98041	96.5616
2	10.708	FM	0.4745	1088.17615	38.22509	3.4384

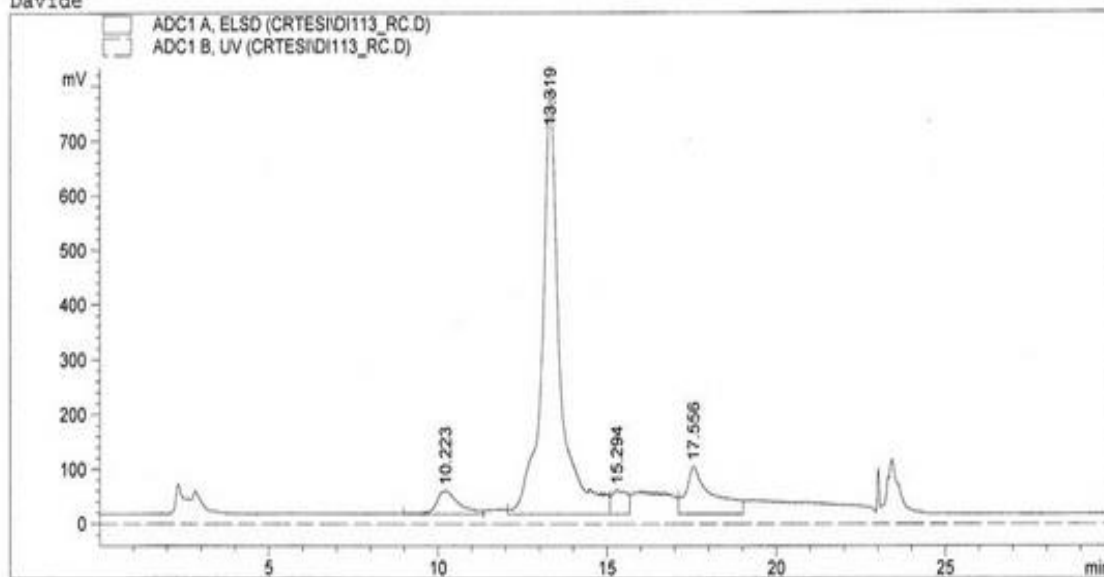
Allegato 25 : analisi HPLC della reazione CR053

CR064H in esano isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 06/05/2014 9.58.12
Sample Name    : CR064 H                      Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument: hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 06/05/2014 9.52.22 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 09/05/2014 8.24.54 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	10.223	VV	0.6697	1996.57751	42.37847	5.4546
2	13.319	VV	0.5306	2.84770e4	771.55145	77.7987
3	15.294	VV	0.4161	1374.76807	43.81373	3.7558
4	17.556	VV	0.7073	4755.10498	87.05231	12.9909

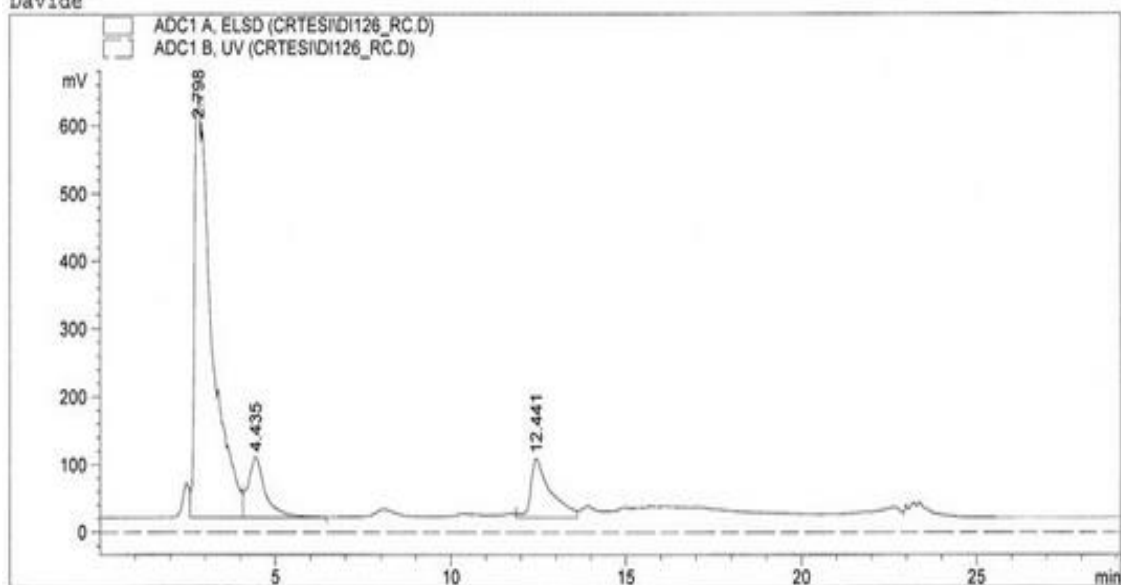
Allegato 26 : analisi HPLC della reazione CR064

CR049H in esano isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date   : 07/05/2014 13.52.26
Sample Name     : CR049 H                      Location   : -
Acq. Operator   : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 07/05/2014 12.43.00 by CARLO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed    : 25/06/2014 8.49.11 by CARLO
                  (modified after loading)
  
```

Davide



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELS

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	2.798	VV	0.4510	2.13397e4	620.86066	76.3096
2	4.435	VV	0.4887	3141.23389	89.67268	11.2329
3	12.441	VV	0.5434	3483.70142	87.69899	12.4575

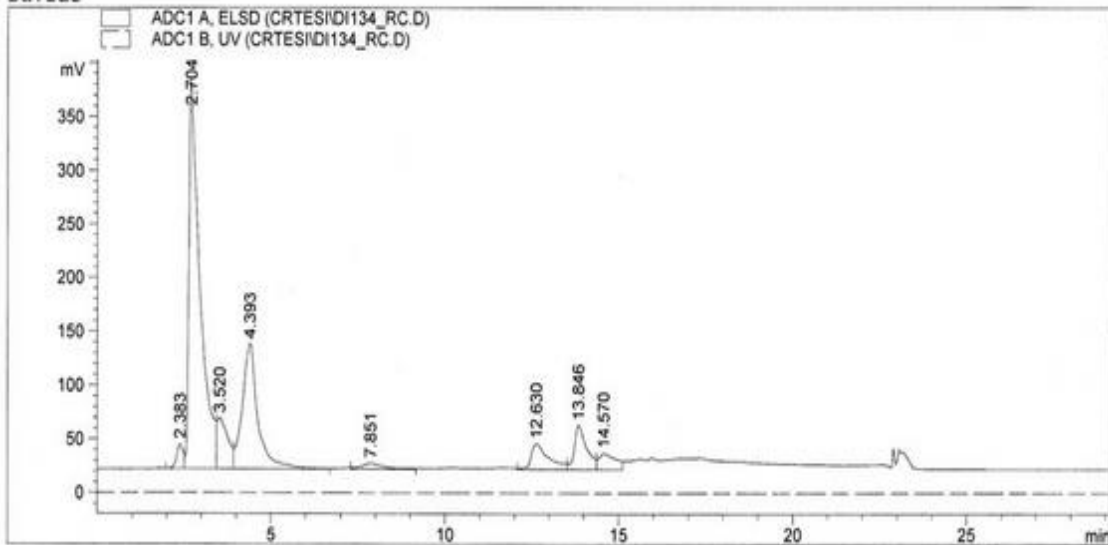
Allegato 27 : analisi HPLC della reazione CR049

CR048 H in esano/isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date   : 15/05/2014 11.41.22
Sample Name     : CR048 H                      Location   : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 15/05/2014 10.37.46 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 15/05/2014 12.10.12 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSD

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	2.383	VV	0.1993	294.19116	22.99232	1.8828
2	2.704	VV	0.3077	7970.74561	347.40070	51.0132
3	3.520	VV	0.3376	1039.91943	47.08909	6.6555
4	4.393	VV	0.4487	3672.92798	116.22215	23.5070
5	7.851	VV	0.6545	257.08698	5.61144	1.6454
6	12.630	VV	0.5080	856.32129	23.90120	5.4805
7	13.846	VV	0.3574	1016.65192	41.26815	6.5066
8	14.570	VV	0.4362	517.01019	15.22272	3.3089

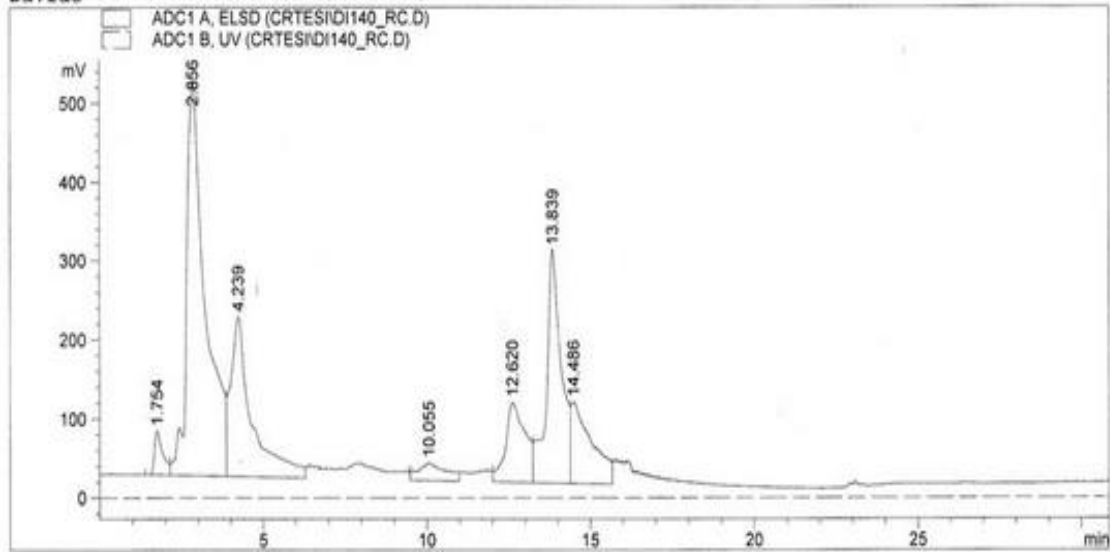
Allegato 28 : analisi HPLC della reazione CR048

CR074h met concentrata in esano/isopropanolo
 ELSL: 50°C 3,2 bar gain: 2
 eluente: Solvente A+B (gradiente KNAUER)
 termostata a 55°C
 Colonna Diol 250*4.6mm

```

=====
Injection Date : 10/06/2014 15.17.13
Sample Name    : CR74H met conc           Location : -
Acq. Operator  : CARLO
Acq. Instrument : hp1100
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 10/06/2014 13.00.02 by CARLO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DAVIDE.M
Last changed   : 10/06/2014 15.48.46 by CARLO
                (modified after loading)
  
```

Davide



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: ADC1 A, ELSL

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	1.754	VV	0.2602	1006.51477	55.86817	2.0501
2	2.856	VV	0.5572	1.95951e4	499.99020	39.9123
3	4.239	VV	0.5908	9025.16602	202.16766	18.3830
4	10.055	VV	0.7576	1343.76013	22.47156	2.7370
5	12.620	VV	0.5784	4241.45166	101.31541	8.6392
6	13.839	VV	0.4309	9350.55664	294.08841	19.0457
7	14.486	VV	0.5620	4532.76904	103.28187	9.2326

Allegato 29 : analisi HPLC della reazione CR074

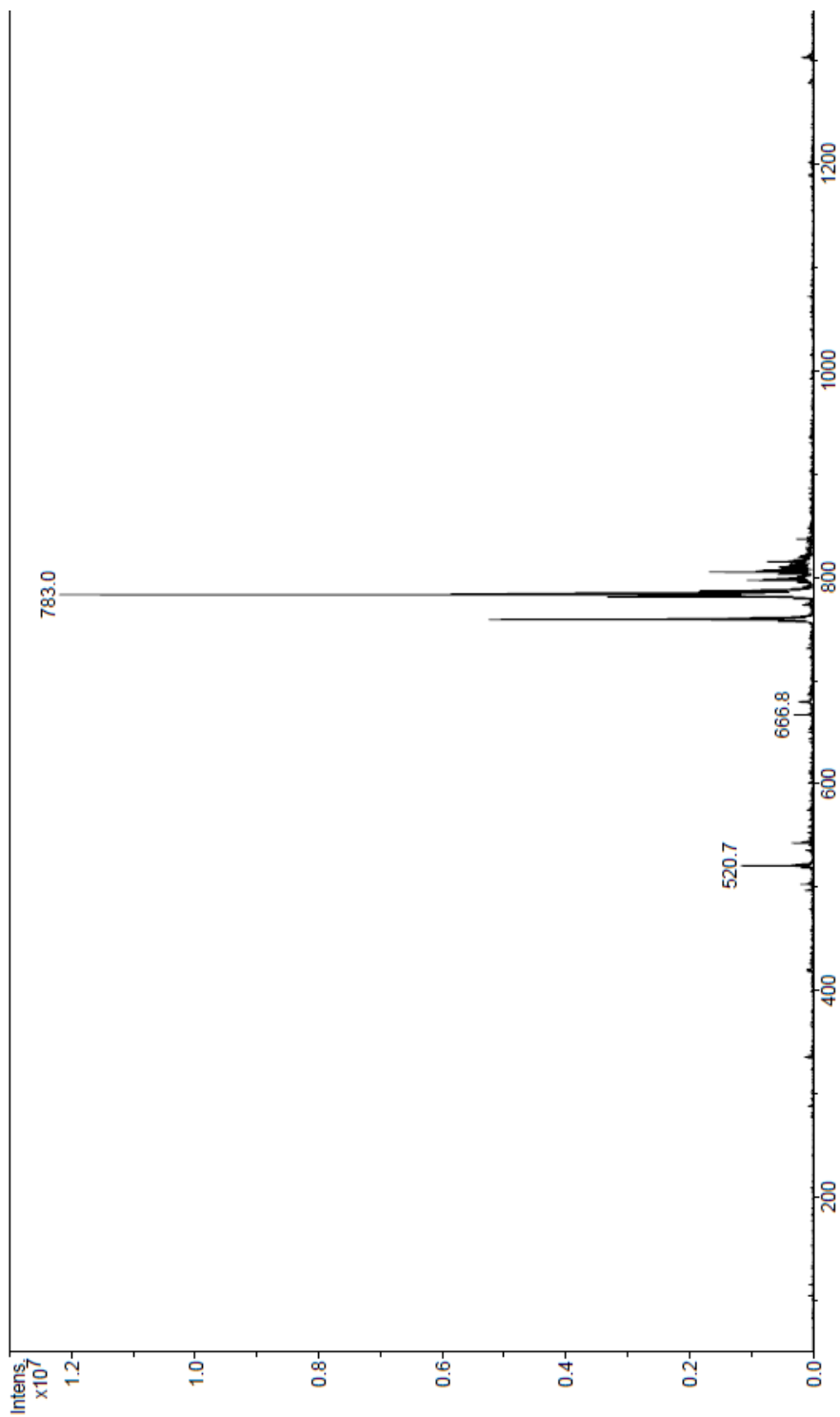
SPETTRI DI MASSA

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s_pc2_3_700_d
Sample Name
Comment 1 mg/ml dil 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Richiedente: Manzoni

Acquisition Date 03/31/14 10:44:58
Method Copy of _giovanni_1620
Instrument 5713.MS

Operator

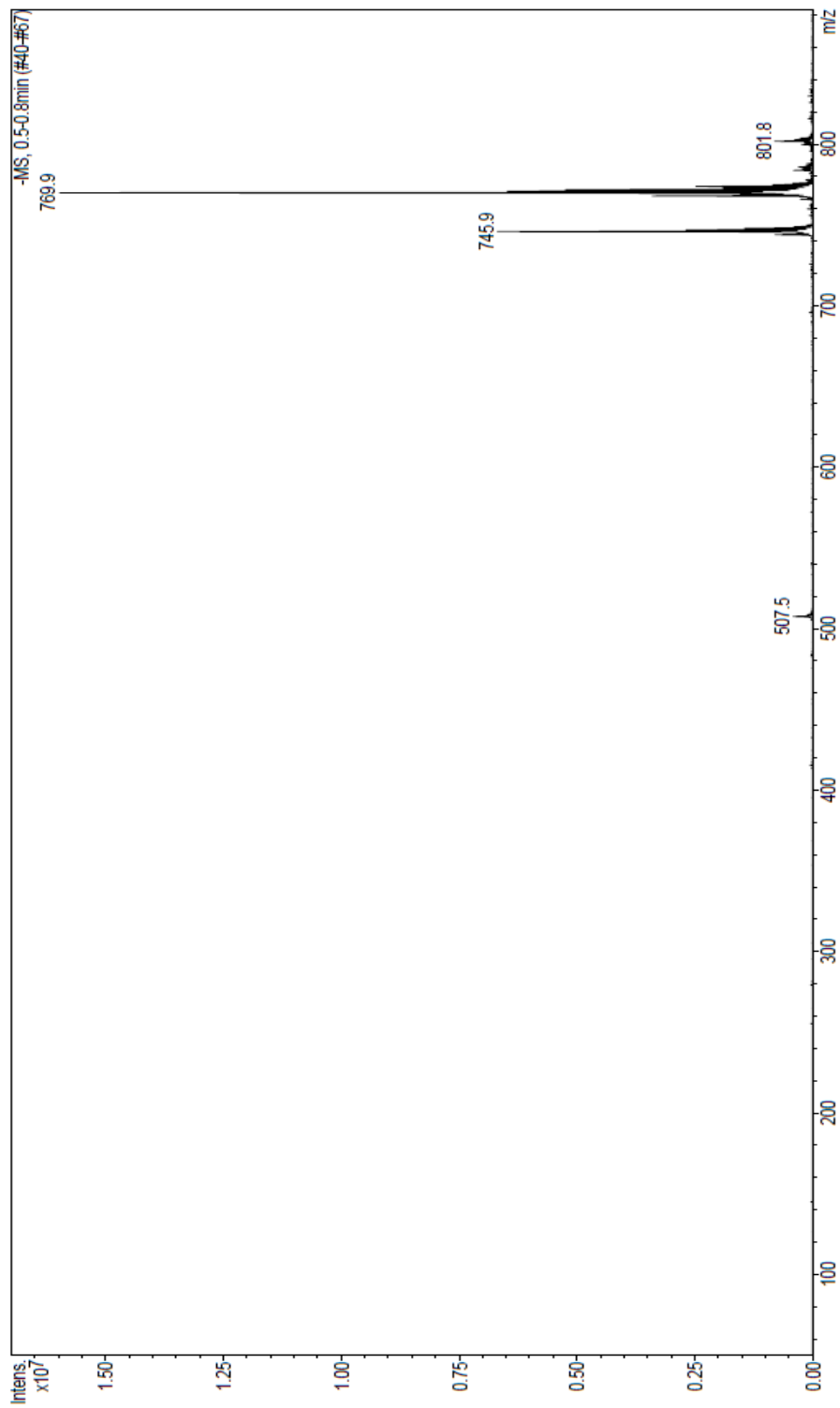


Allegato 30 : spettro di massa della PC di riferimento

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cro76_d
Sample Name 1 mg/ml dil 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Comment Richiedente: Manzoni

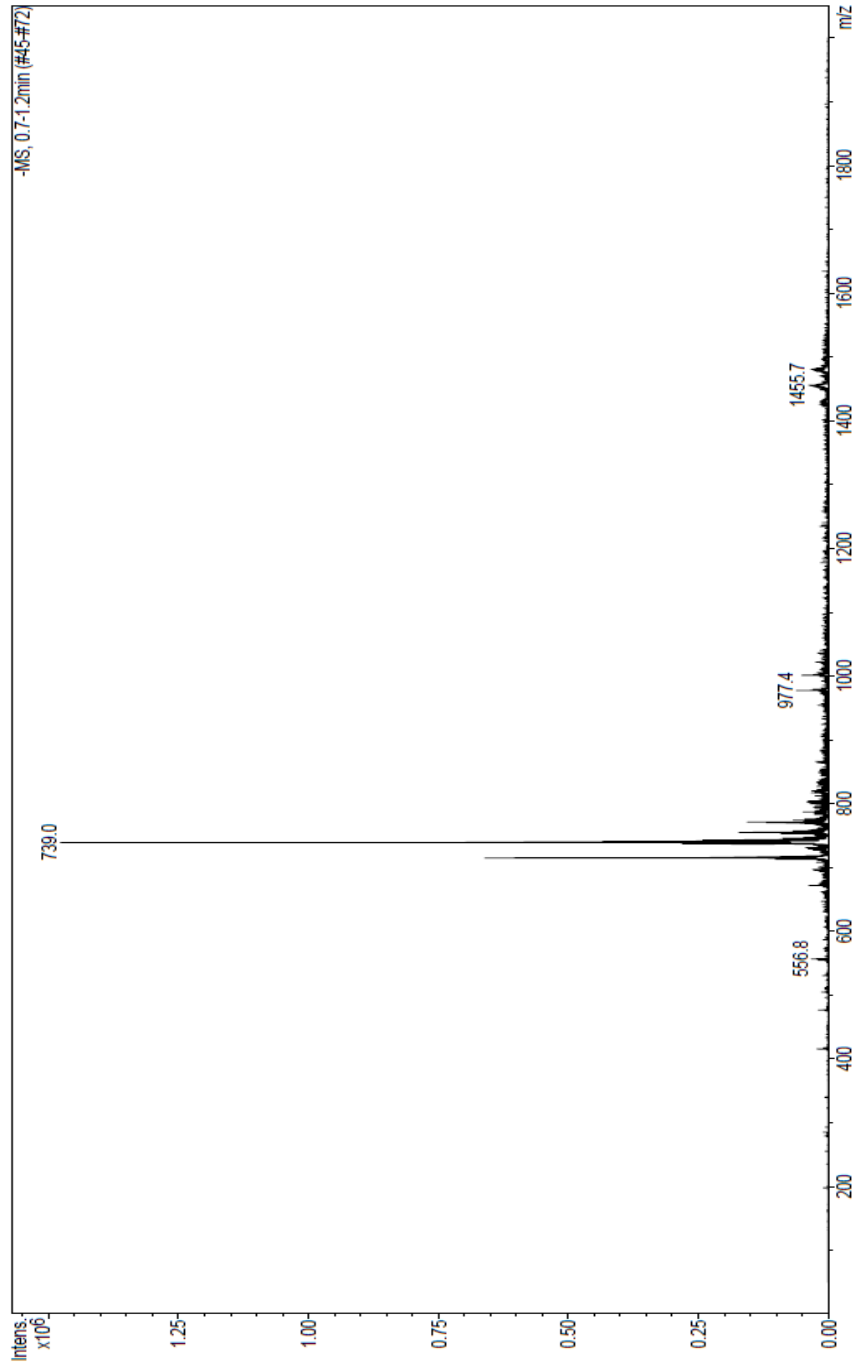
Acquisition Date 06/17/14 11:36:44
Method Copy of _01esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus



Allegato 31 : spettro di massa del PG

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr022z.d
Sample Name 1 mg/ml dil 1:100 MeOH
Comment Richiedente: Manzoni
Acquisition Date 04/14/14 13:26:24
Method Copy_of_01esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus

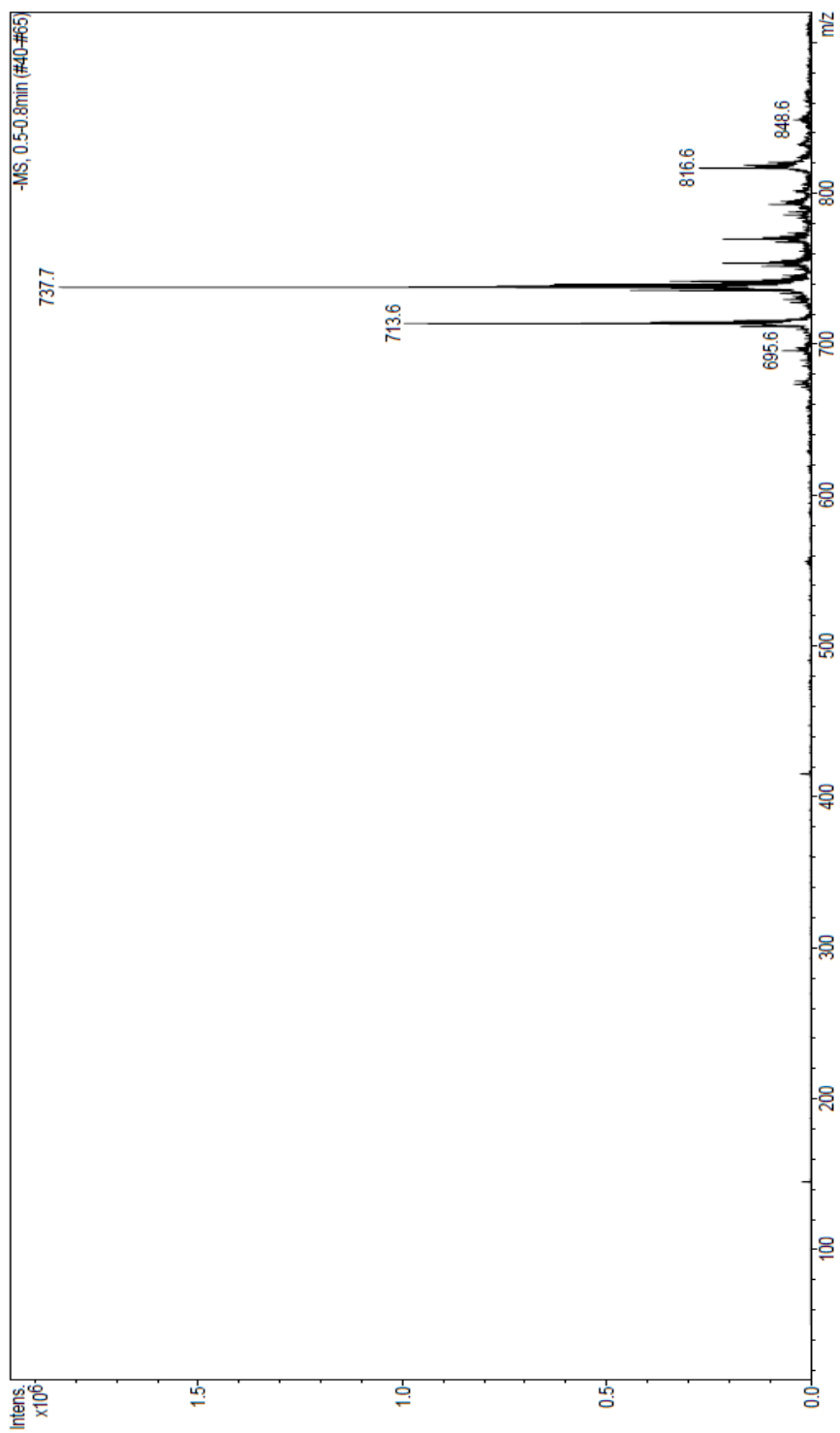


Allegato 32 : spettro di massa della reazione CR022Z

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr057h_d
Sample Name 1 mg/ml dil 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Comment Richiedente: Manzoni

Acquisition Date 06/25/14 16:03:44
Method Copy of _01esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus



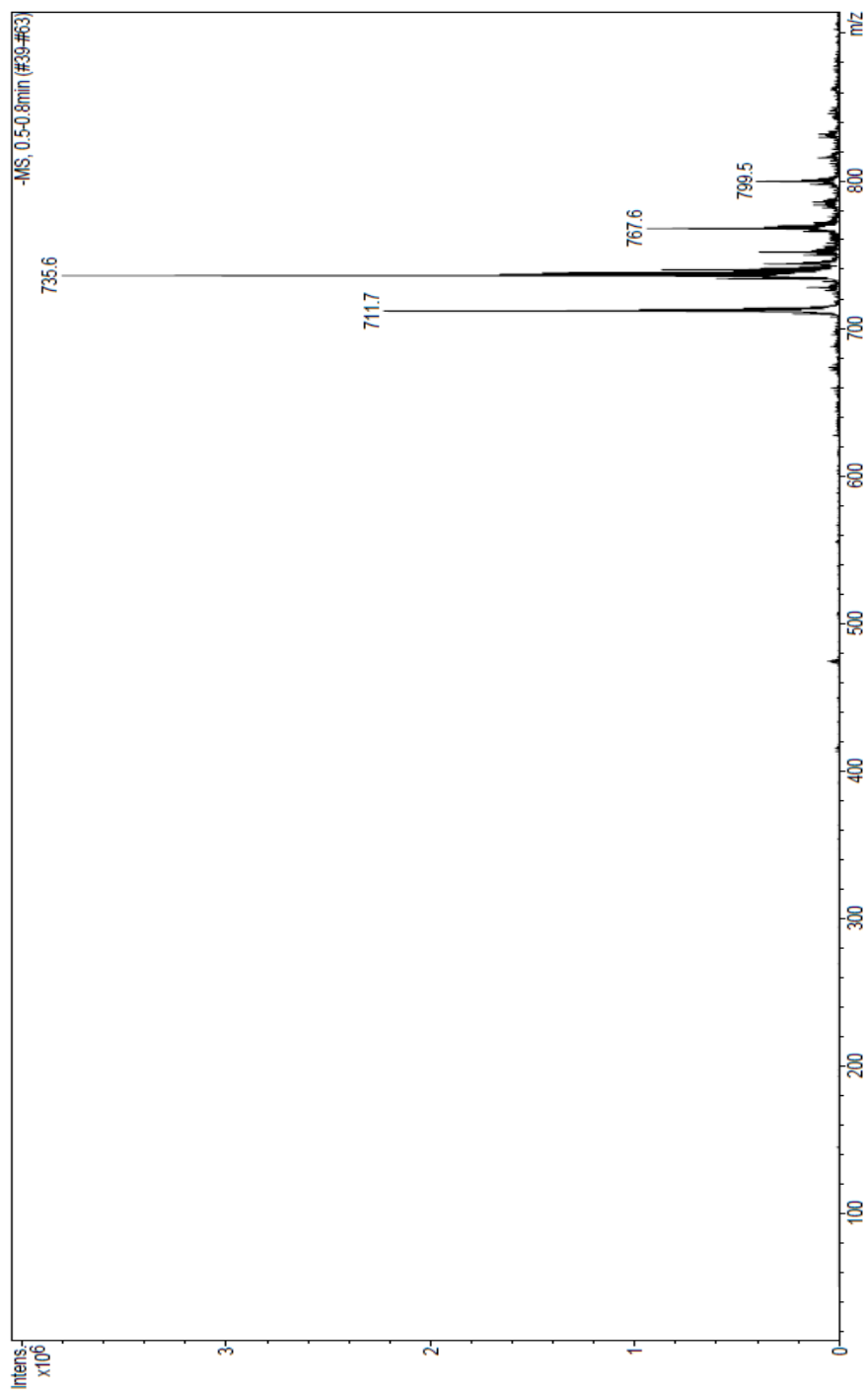
Allegato 33 : spettro di massa della reazione CR057

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr050h_d
Sample Name
Comment 1 mg/ml dil 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Richiedente: Manzoni

Acquisition Date 06/25/14 15:56:34
Method Copy of _01esquirew.MS

Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus

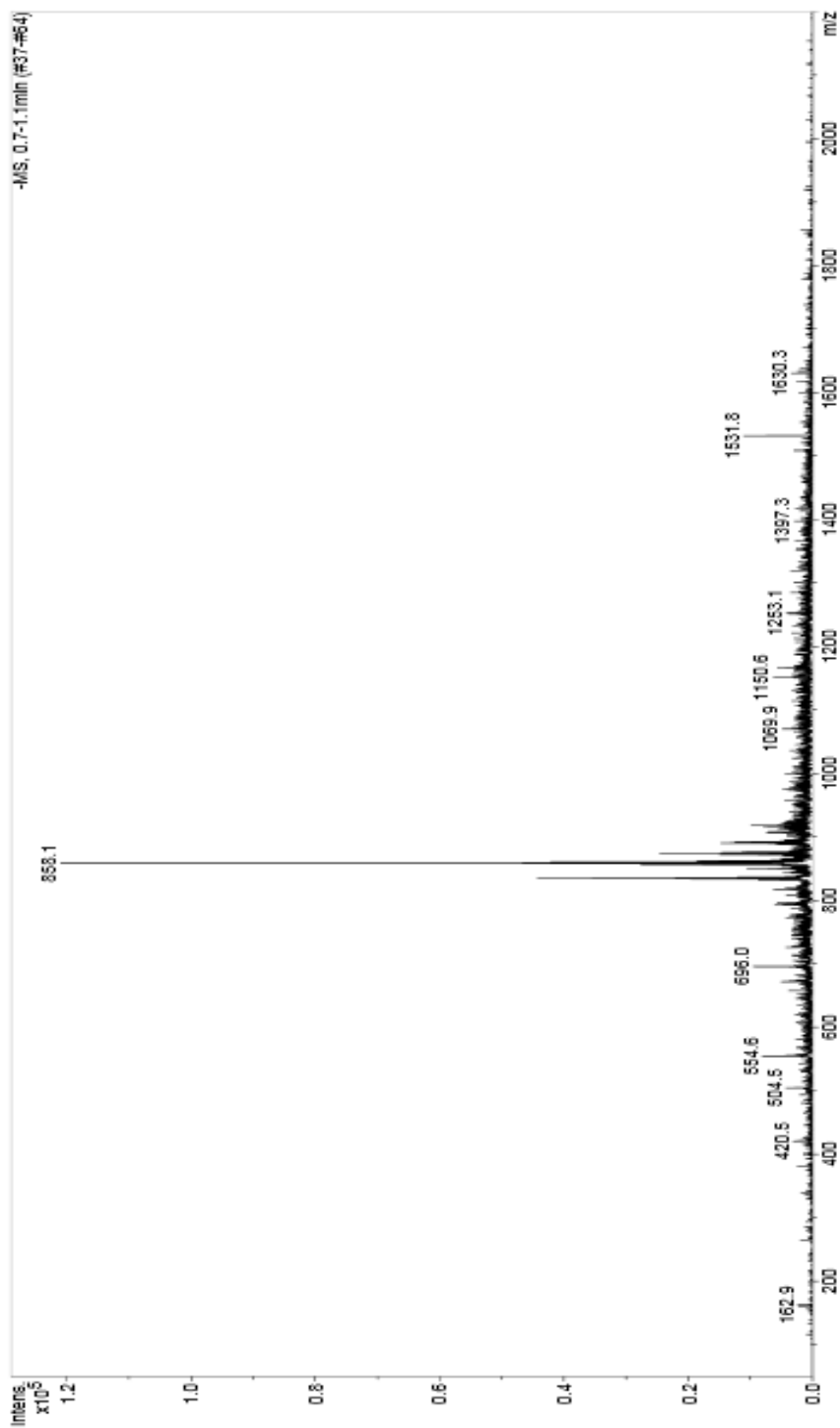


Allegato 34 : spettro di massa della reazione CR050

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr064m_d
Sample Name 1 mg/ml CH2Cl di 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Comment Richiedente: Manzoni

Acquisition Date 05/05/14 16:58:08
Method Copy of _D1esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus

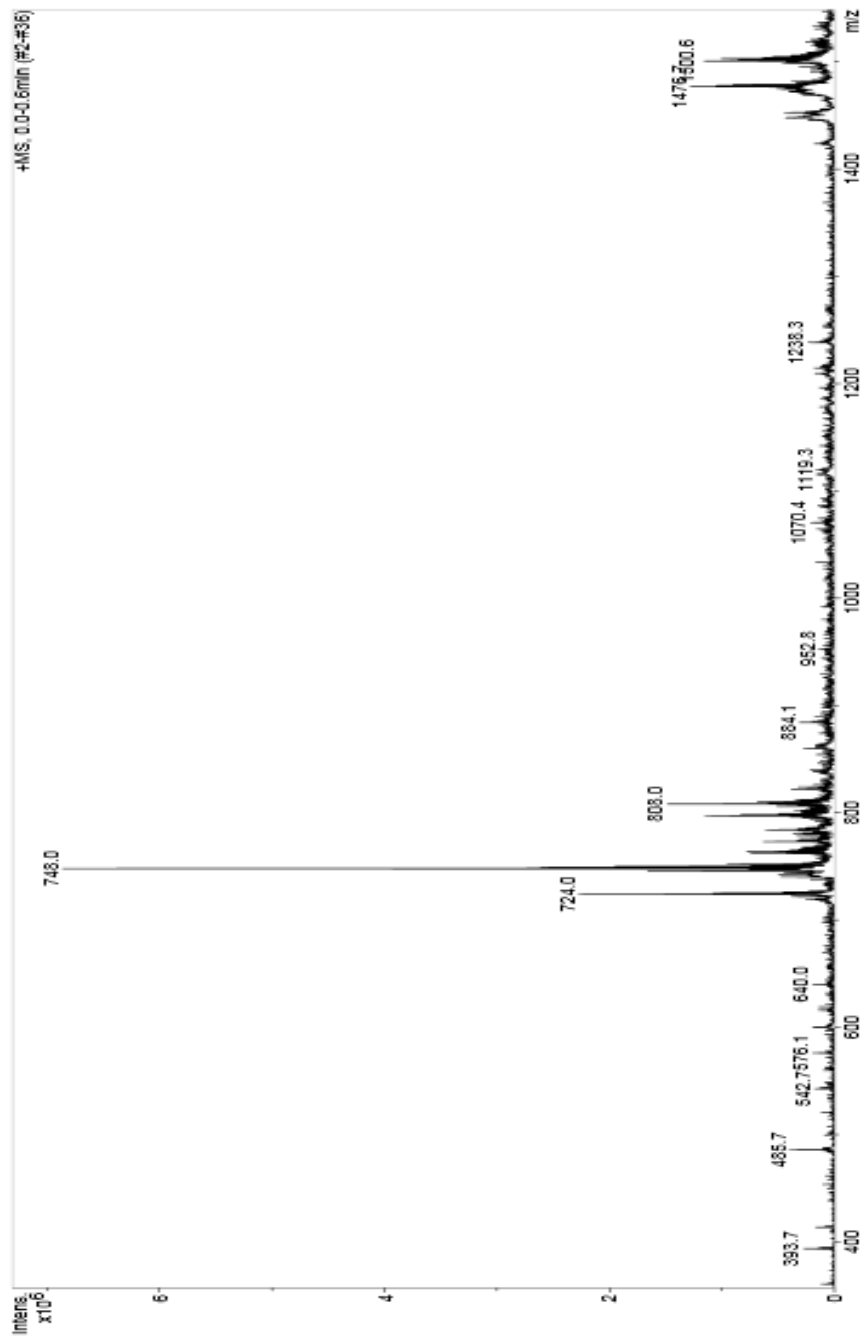


Allegato 35 : spettro di massa della reazione CR064

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr049m_d
Sample Name 1 mg/ml CH2Cl di 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Comment Richiedente: Mianzoni

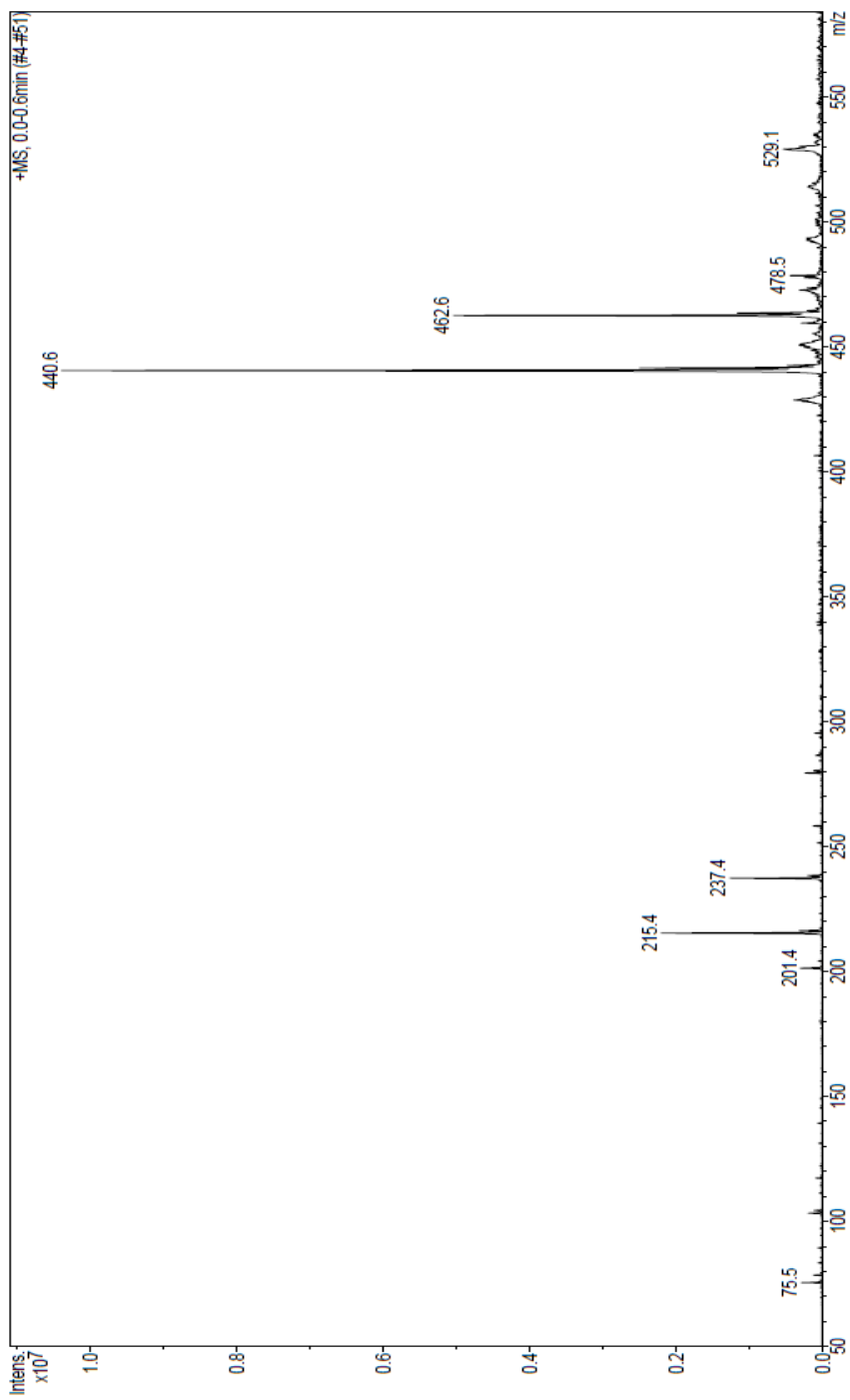
Acquisition Date 05/05/14 16:35:10
Method Copy of_01esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire-3000plus



Allegato 36 : spettro di massa della reazione CR049

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s rc001.d
Sample Name 1 mg/ml dil 1:100 MeOH
Comment Richiedente: Colnaghi
Acquisition Date 12/03/13 16:44:09
Method Copy of _01esquirew.MS
Operator Instrument
Administrator esquire3000plus



Allegato 37 : spettro di massa della reazione CR001

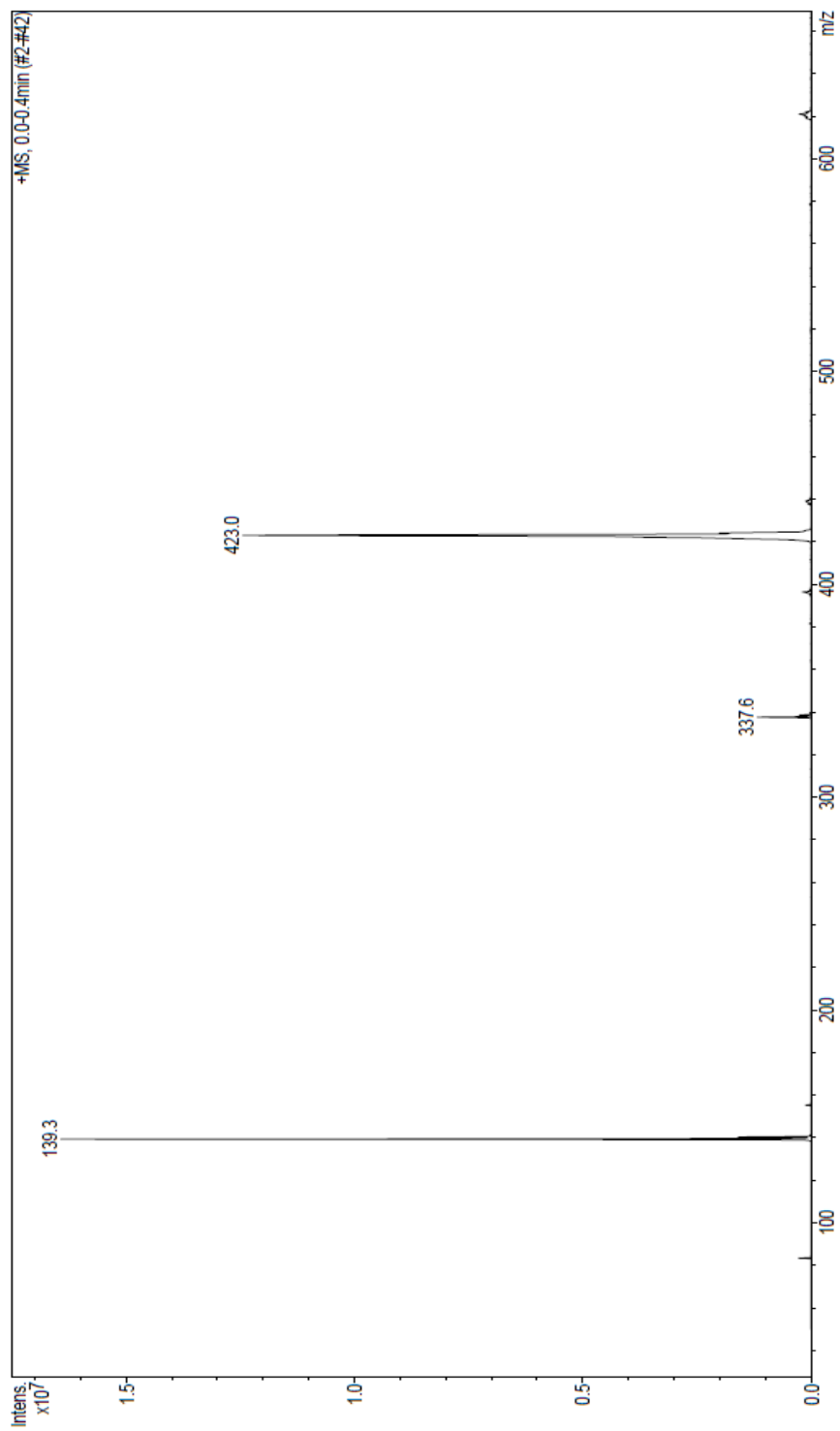
-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr005.d
Sample Name 1 mg/ml CH2Cl2 dil 1:100 MeOH
Comment Richiedente: Manzoni

Acquisition Date 01/15/14 08:19:42
Method Copy of _01esquirew.MS

Operator Instrument

Walter Panzeri
esquire3000plus

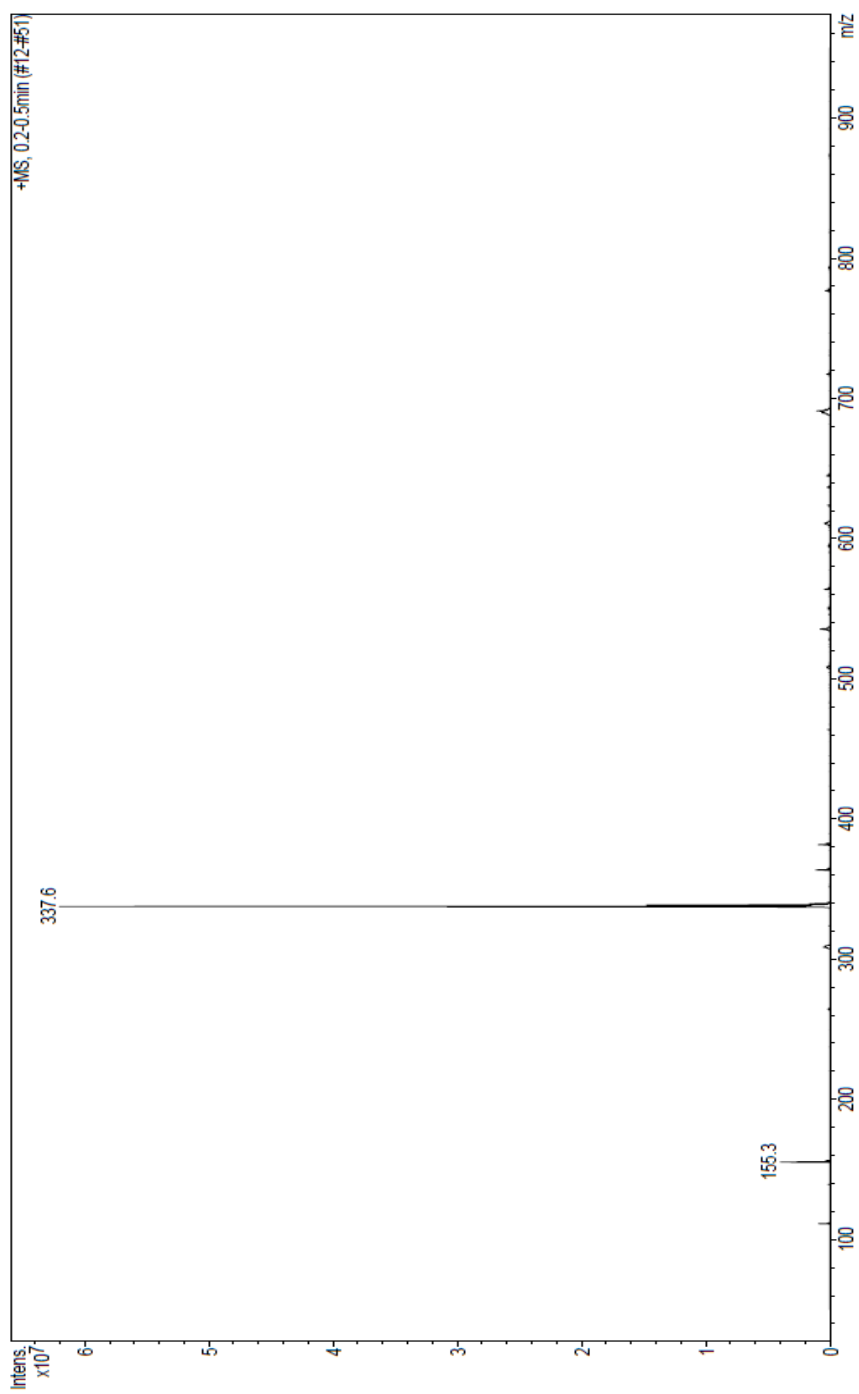


Allegato 38 : spettro di massa della reazione CR005

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s_cr003.d
Sample Name 1 mg/ml CH2Cl2 dil 1:100 MeOH
Comment Richiedente: Manzoni

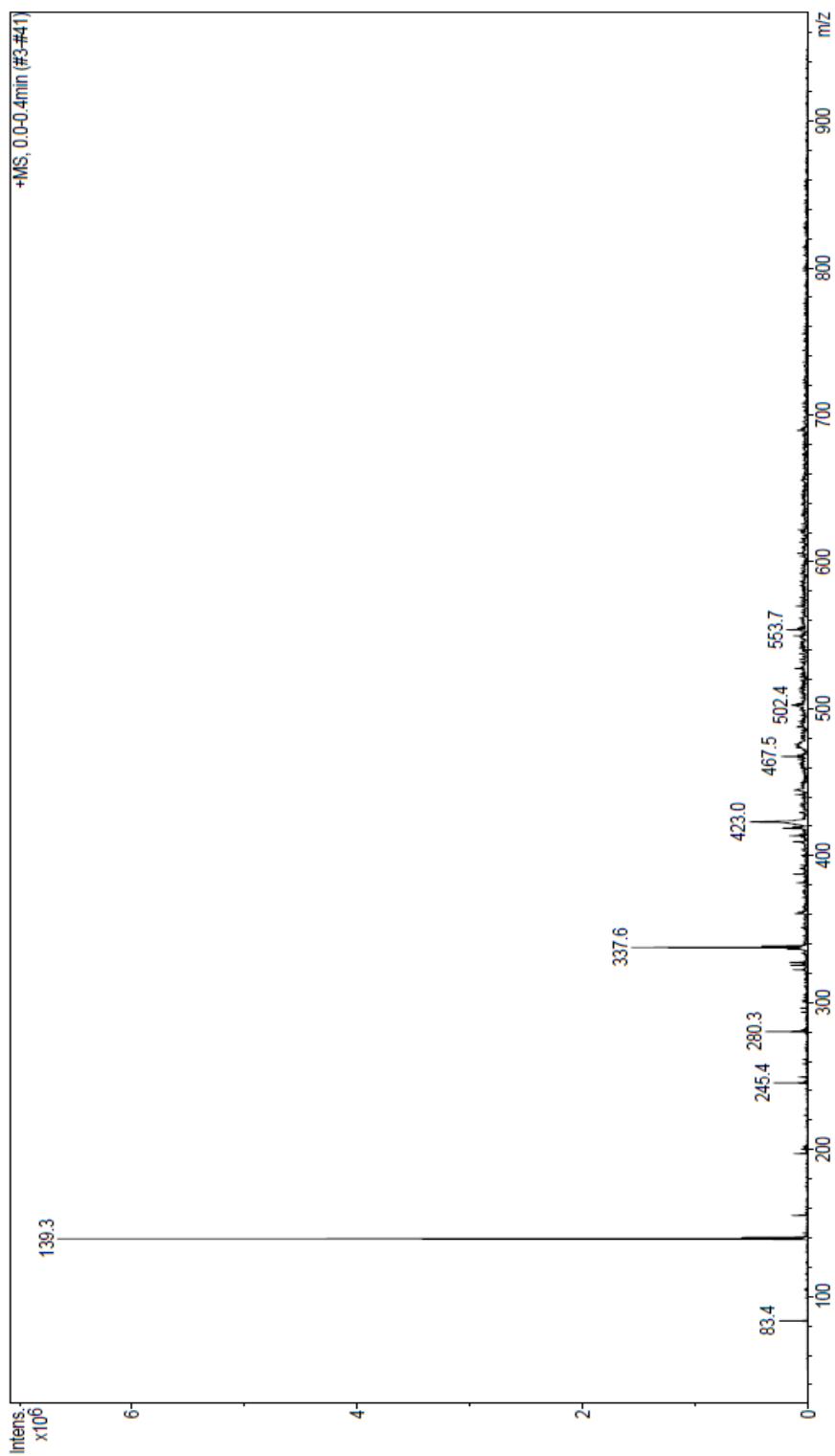
Acquisition Date 01/15/14 08:12:23
Method Copy of _01esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus



Allegato 39 : spettro di massa della reazione CR003

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr007.d
Sample Name 1 mg/ml CH2Cl2 dil 1:100 MeOH
Comment Richiedente: Manzoni
Acquisition Date 01/15/14 08:35:44
Method Copy of _01esquirew.MS
Operator Instrument
Walter Panzeri
esquire3000plus



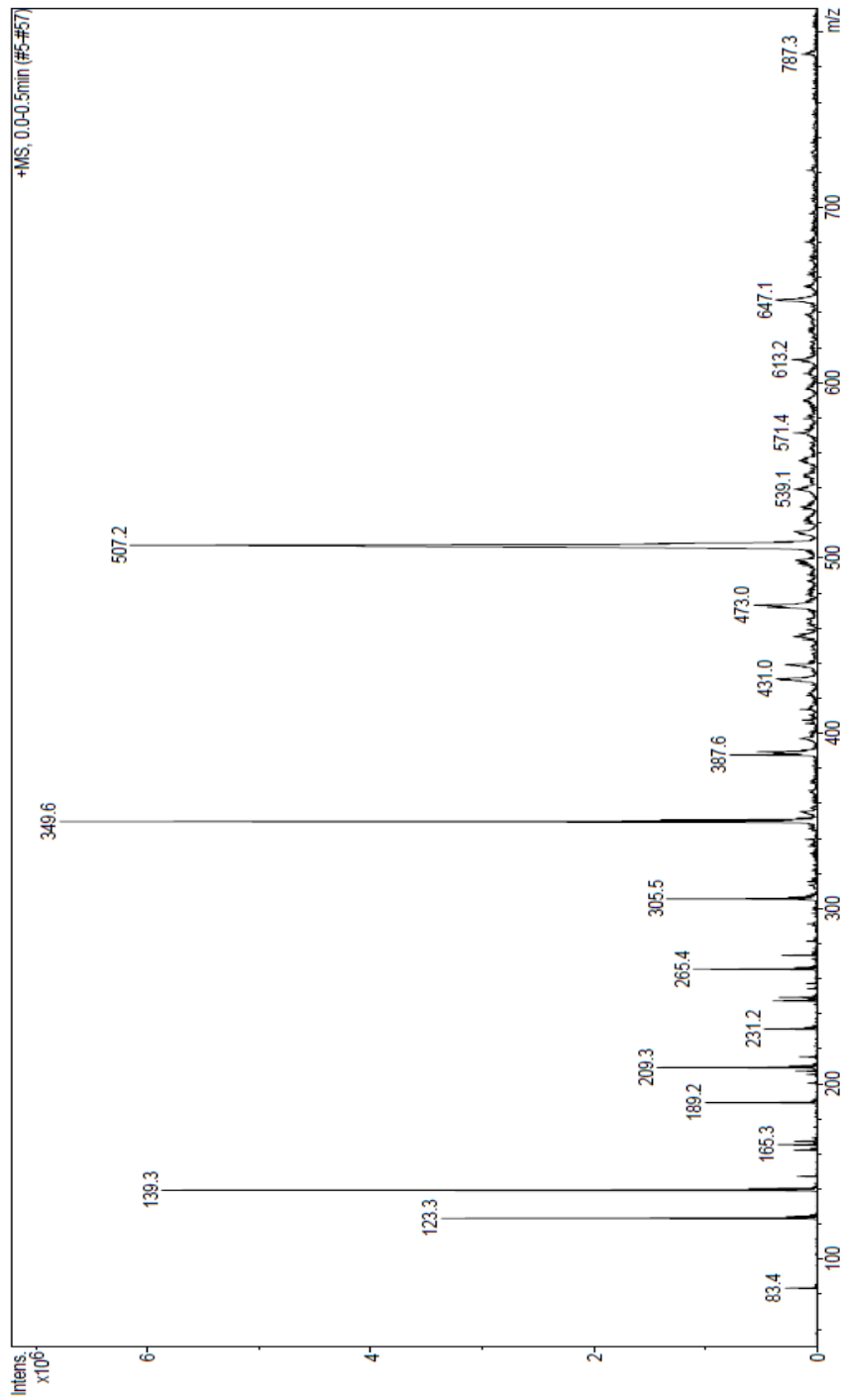
Allegato 40 : spettro di massa della reazione CR007

-L.G.S. - Laboratorio Grandi Strumenti - Display Report

Analysis Name s cr011_d
Sample Name 1 mg/ml dil 1:100 MeOH + HCOOH 0.1%
Comment Richiedente: Manzoni

Acquisition Date 01/16/14 09:21:23
Method Copy of_01esquirew.MS

Operator Walter Panzeri
Instrument esquire3000plus



Allegato 41 : spettro di massa della reazione CR011

BIBLIOGRAFIA

- 1) Numata, M.; Chu, H. W.; Dakhama, A.; Voelker, D. R. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proceedings of the National Academy of Science* (2010), 107(1), 320-325.
- 2) Virto, C.; Adlercreutz, P. Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme and Microbial Technology* (2000), 26(8), 630-635.
- 3) Phospholipids Handbook (1993) edited by Cevc, G. Marcel Dekker Inc. New York.
- 4) IUPAC-IUB: Commission on biochemical nomenclature. *European Journal of Biochemistry* (1987), 167, 181-184.
- 5) Hirschmann, H. The nature of substrate asymmetry in stereoselective reactions. *The Journal of Biological Chemistry* (1960), 235, 2762-2767.
- 6) Pichot, R.; Watson, R. L.; Norton, I. T. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *International Journal of Molecular Sciences* (2013), 14(6), 11767-11794.
- 7) Walde, P.; Giuliani, A. M.; Boicelli, C. A.; Luisi, P. L. Phospholipid-based reverse micelles. *Chemistry and Physics of Lipids* (1990), 53, 265-288.
- 8) Martinek, K.; Klyachko, N. L.; Kabanov, A. V.; Khmel'nitsky, Yu. L.; Levashov, A. V. Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochimica et Biophysica Acta* (1989), 981, 161-172.
- 9) Singer S. J.; Nicholson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* (1972), 175, 720-731.
- 10) Verkleij, A. J.; Post J. A. Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. *The Journal of Membrane Biology* (2000), 178, 1-10.
- 11) Erickson, J.; Hasegawa, Y. Lysophosphatidic acid and ovarian cancer: a paradigm for tumorigenesis and patient management. *Prostaglandin and Other Lipids Mediator* (2001), 64, 63-81.
- 12) Merchant, T. E.; Vroom, T. Malignant breast tumor phospholipid profiles using ³¹P magnetic resonance. *Cancer Letters* (2002), 176, 159-167.
- 13) Jones, M. N. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterization. *Advances in Colloid and Interface Science* (1995), 54, 93-128.
- 14) Celotti, F. *Patologia generale e fisiopatologia*. Napoli: EdiSES (2002).
- 15) Mycec, M.; Harvey, R. A.; Champe, P. C. *Farmacologia*. Bologna: Zanichelli (2000).
- 16) Stafford, R. E.; Dennis, E. A. Lysophospholipids as biosurfactants. *Colloids and Surfaces* (1988), 30, 47-64.
- 17) Nasir, M.; Bernards, M.; Charpentier, P. A. Acetylation of soybean lecithin and identification of components for solubility in supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007), 55, 1961-1969.
- 18) Baskin, R. Frost, L. D. Bile salt-phospholipid aggregation at submicellar concentration. *Colloids and surface B: Biointerfaces* (2008), 62, 238-242.
- 19) Minchiotti, M.; Scalambro, M. B.; Vargas, L.; Coronel, C.; Madoery, R. Isolation of phospholipase A₂ from soybean (glycine max) seeds: the study of its enzymatic properties. *Enzyme and Microbial Technology* (2008), 42, 389-394.

- 20) Altman, M. K.; Gopal, V.; Jia, W.; Yu, S.; Hall, H.; Mills, G. B. Targeting melanoma growth and viability reveals dualistic functionality of the phosphonothionate analogue of carba cyclic phosphatidic acid. *Molecular Cancer* (2010), 9, 1-14.
- 21) Lin, M.; Herr, D. R.; Chun, J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (2010), 91, 130-138.
- 22) Virto, C.; Svensson, I.; Adlercreutz, P. Enzymatic synthesis of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid. *Enzyme and Microbial Technology* (1999), 24, 651-658.
- 23) Shimanouci, T.; Takasi, M.; Vu, H. T.; Ishii, H.; Yoshimoto, N.; Umakoshi, H. Ag/Cu-catalyzed oxidation of cholesterol in 1,2-dypalmitoyl phosphatidylcholine liposome membrane. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2010), 2, 145-148.
- 24) Samadi, N.; Bekele, R.; Capatos, D.; Venkatraman, G.; Sariahmetoglu, M.; Brindley, D. N. Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie* (2011), 93, 61-70.
- 25) D'Arrigo, P.; Servi, S. Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules* (2010), 15, 1354-1377.
- 26) Seddon, K. R.; Annegret, S.; Torres M. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. *Pure and Applied Chemistry* (2000), 72, 2275-2287.
- 27) Muginova, S.V.; Galimova, A. Z.; Polyakov, A. E.; Shekhovtsova, N. T. Ionic liquid in enzymatic catalysis and biochemical methods of analysis: capabilities and prospects. *Journal of Analytical Chemistry* (2010), 65, 331-351.
- 28) Bronya, C.; Amal, S.; Douglas R. M. Synthesis, purification and characterization of ionic liquids. *Topics in Current Chemistry* (2009), 290, 1-40.
- 29) Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. Application of ionic liquids in industrial chemistry. *Chemical Society Reviews* (2008), 37, 123-150.
- 30) Holbrey, J. D.; Reichert, W. M.; Nieuwenhuyzen, M.; Johnston, S.; Seddon, K. R.; Rogers, R. D. Crystal polymorphism in 1-butyl-3-methylimidazolium halides: supporting ionic liquid formation by inhibition of crystallization. *Chemical Communications* (2003), 13, 1636-1637.
- 31) Murugesan, S.; Linhardt, R. J. Ionic liquids in carbohydrate chemistry- current trends and future directions. *Current Organic Synthesis* (2005), 2, 437-451.
- 32) Pinkert, A.; Marsh, K. N.; Pang, S.; Staiger, M. P. Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chemical Reviews* (2009), 109, 6712-6728.
- 33) Yang, Z.; Pan, W. Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* (2005), 37, 19-35.
- 34) Wasserscheid, P.; Welton, T. Ionic liquids in synthesis, Second Edition. Wiley VCH (2008).
- 35) Park, S.; Kazlauskas, R. J. Improved preparation and use of room temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *Journal of Organic Chemistry* (2001), 66, 8395-8401.
- 36) Abe, Y.; Kude, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Tsunashima, K.; Itoh, T. Design of phosphonium ionic liquids for lipase-catalyzes transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2008), 51, 81-85.

- 37) Namboodiri, V. V.; Rajender, S. V. An improved preparation of 1,3-dialkylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid using microwaves. *Tetrahedron Letters* (2002), 43, 5381-5383.
- 38) Monizzuraman, M.; Kamiya, N.; Goto, M. Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids. *Organic and Biomolecular Chemistry* (2010), 8, 2887-2899.
- 39) Monizzuraman, M.; Nakashima, K.; Kamiya, N.; Goto, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal* (2010), 48, 295-314.
- 40) Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* (2002), 13, 565-571.
- 41) Lau, R. M.; Sorgerdrager, M. J.; Carrea, G.; Van Rantwijk, F.; Secundo, F.; Sheldon, R. A. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. *Green Chemistry* (2004), 6, 483-487.
- 42) Zaho, U. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids- a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2010), 85, 891-907.
- 43) Sureshkumar, M.; Lee, C. K. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2009), 60, 1-12.
- 44) Pavlidis, I. V.; Gournis, D.; Papadopoulos, G. K.; Stamatis, H. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: structural and activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2009), 60, 50-56.
- 45) Armand, M.; Endres, F.; MacFarlane, D. R.; Ohno, H.; Scrosati, B. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nature Materials* (2009), 8, 621-629.
- 46) El Abedin, S. Z.; Welz-Biedermann, U.; Endres, F. A study on the electrodeposition of tantalum on NiTi alloy in an ionic liquid and corrosion behavior of the coated alloy. *Electrochemistry Communications* (2005), 7, 941-946.
- 47) Arnould, C.; Delhalle, J.; Mekhalif, Z. Multifunctional hybrid coating on titanium towards hydroxyapatite growth: electrodeposition of tantalum and its molecular functionalization with organophosphonic acids films. *Electrochimica Acta* (2008), 53, 5632-5638.
- 48) Tani, Y.; Itoyama, Y.; Nishi, K.; Wada, C.; Shoda, Y.; Satomura, T. An amperometric D-amino acid biosensor prepared with a thermostable D-proline and carbon nano tube-ionic liquid gel. *Analytical Sciences* (2009), 25, 919-923.
- 49) Zhang, Y.; Chen, X.; Lan, J.; You, J.; Chen, L. Synthesis and biological applications of imidazolium-based polymerized ionic liquid as gene delivery vector. *Chemical Biology and Drug Design* (2009), 74, 282-288.
- 50) Earle, M. J.; Katdare, S. P.; Seddon, K. R. Paradigm confirmed: the first use of ionic liquids to dramatically influence the outcome of chemical reactions. *Organic Letters* (2003), 6, 707-710.
- 51) Young, G.; Nippgen, F.; Titterbrandt, S.; Cooney, M. J. Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. *Separation and Purification Technology* (2010), 72, 118-121.
- 52) Wasserscheid, P. Volatile times for ionic liquids. *Nature* (2006), 439, 797.
- 53) Earle, M. J.; Esperanca, J. M. M. S.; Gilea, M. A.; Canongia, J. N.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* (2006), 439, 831-834.

- 54) Wells, A. S.; Coombe, V. T. On the fresh water ecotoxicity and biodegradation properties of some common ionic liquids. *Organic Process Research and Development* (2006), 10, 794-798.
- 55) Kumar, R. A.; Papaiconomou, N.; Lee, J-M.; Salminen, J.; Clarck, D. S.; Prausnitz, J. M. *In vitro* cytotoxicities of ionic liquids: effect of cation rings, functional groups and anions. *Environmental Toxicology* (2009), 24, 388-395.
- 56) Swatloski, R. P.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Green Chemistry* (2003), 5, 361-363.
- 57) Taylor, A. W.; Lovelock, K. R. J.; Deyko, A.; Licence, P.; Jones, R. G. High vacuum distillation of ionic liquids and separation of ionic liquid mixtures. *Physical Chemistry Chemical Physics* (2009), 12, 1772-1783.
- 58) Schlame, M.; Rua, D.; Greenberg, M.L. . The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipids Research* (2000), 39, 257-288.
- 59) D'Arrigo, P.; Cerioli, L.; Chiappe, C.; Panzeri, W.; Tessaro, D.; Mele, A. Improvements in the enzymatic synthesis of phosphatidylserine employing ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2012), 84, 132-135.
- 60) Signò, C. Utilizzo di liquidi ionici nelle trasformazioni enzimatiche di fosfolipidi. Tesi di Laurea in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano (a.a. 2011).

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamenti comuni

Prima di tutti volevamo ringraziare la Prof.ssa D'Arrigo per la pazienza e per aver insistito con noi anche quando l'unico risultato ottenuto era l'aumento entropico del laboratorio.

Un grazie al Prof. Mele per aver consigliato la tesi ed essere stato molto più che un normale docente.

Un grazie collettivo ad Andrea, Chiara, Davide e "Paolorenzo" per le risate e i "trick" di laboratorio che un normale ingegnere non potrebbe conoscere.

Un ringraziamento a Gabriele, che ha condiviso più di chiunque le nostre gioie e i nostri dolori.

Un grazie –veloce- come le ultime analisi che ci ha fatto, a Walter.

Infine, a tutti i compagni di corso per averci accompagnato in questi 5 anni.

Roberto

Ai miei genitori, ricchi d'amore e di comprensione che mi han permesso di studiare e mi hanno sorretto tutte quelle volte che stavo per cedere.

Ad Andrea e Licia, per poter affrontare tutto ciò che la vita vi metterà davanti (e fidatevi, se non è Analisi si può risolvere facile)

A Vittorio, con l'amara consapevolezza di aver oramai perso il titolo di "più bello della famiglia", con l'augurio di crescere e di assomigliare a tuo zio Roberto.

A Marchino, amico vero che mi ha sempre aiutato ed incoraggiato.

A Elena, per esserci stata sempre.. un grazie di cuore.

Ad Anna , Monica e Serena, per i loro meravigliosi sorrisi e le loro risate indimenticabili.

A tutta la Ludus in Fabula, per avermi sopportato nonostante il poco tempo disponibile.

Valentina kukka pyysi tuomaan valoa minulle, kun ainoa asia, joka ympäröi minut oli syvin yö.

Carlo

A tutta la mia famiglia, soprattutto i miei genitori Loredana ed Emilio, perché non avrei potuto chiedere di meglio.

A Eliana: da molto ormai ti considero parte della famiglia e non posso che ringraziarti per questo

A Monica, Valentina e Marco, per tutti i momenti belli vissuti insieme, perché anche una risata ha un valore enorme.

Al professor Mauro Parrini: grazie ai suoi consigli ho scelto la carriera di ingegnere..peccato che lui insegni filosofia.