



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica  
Curriculum Scienze Chimiche

# ***Self-assembly di tensioattivi derivati dalla vitamina C***

# ***Self-assembly of surfactants derived from vitamin C***

**Relatore**

Prof. Pierandrea Lo Nostro

**Correlatore**

Dott.ssa Moira Ambrosi

**Candidato**

Ilaria Perini



## Abstract

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare un derivato anfifilico della vitamina C, caratterizzarne la fase solida e studiarne il *self-assembly* in fase acquosa. L'interesse nell'ottenere questo prodotto deriva dalla volontà di poter estendere le note proprietà antiossidanti della vitamina C ad ambienti non polari, utilizzando un procedimento il più possibile ecologico, e creare così un tensioattivo che potenzialmente possa riuscire a proteggere molecole sensibili all'ossidazione grazie alle sue proprietà chimiche e chimico-fisiche.

La sintesi, svolta per via enzimatica tramite un'esterificazione dell'acido L-ascorbico in posizione C6 con acido oleico, è avvenuta a partire da una soluzione in acetone di acido ascorbico ed acido oleico. Il prodotto grezzo è stato quindi filtrato su celite con acetato di etile e successivamente trattato con acqua ed estratto con etile acetato. Sul prodotto sono state svolte misure di massa,  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $^1\text{H-NMR}$  e FT-IR per accertarne l'effettivo ottenimento ed individuare eventuali impurezze. Il solido ottenuto è stato liofilizzato e caratterizzato per determinarne la struttura cristallina e sono anche stati indagati i suoi aggregati in acqua alle diverse percentuali in peso di 5, 10, 20 e 40%. Per la caratterizzazione delle proprietà chimico-fisiche del solido e degli aggregati in fase acquosa sono state effettuate misure di calorimetria a scansione differenziale (DSC), grazie alle quali è stato possibile individuarne gli intervalli di transizione. Sui campioni inoltre è stato eseguito lo *scattering* di raggi X ad alto e basso angolo alla temperatura di 10 °C sul solido (WAXD e SAXS) e di 4 e 20 °C sugli aggregati (SAXS), cioè subito prima e subito dopo degli intervalli di transizione individuati tramite DSC. Da tali misure è stato possibile osservare una struttura ordinata per il solido liofilizzato, una forma di *self-assembly* lamellare per i gel alla temperatura di 4 °C e micelle dalla forma di ellissoide prolato alla temperatura di 20 °C. Inoltre dallo svolgimento di un test DPPH è stato possibile verificare che le proprietà antiossidanti della vitamina C sono rimaste inalterate nel prodotto di sintesi.

## Sommario

Capitolo 1: Introduzione.....	5
1.1 Vitamina C e radicali liberi.....	5
1.2 Acido oleico .....	6
1.3 Self-Assembly: gel, coagel, micelle.....	7
1.4 Ascorbil alcanoati a catena singola .....	9
1.5 Potenzialità dell'ascorbile oleato .....	11
1.6 Test DPPH .....	11
Capitolo 2: Materiali e Procedure .....	13
2.1 Premessa alla scelta del metodo di sintesi.....	13
2.2 Procedura di sintesi .....	14
2.2.1 Attivazione setacci molecolari.....	15
2.2.2 Sintesi enzimatica .....	15
2.3 Procedura di separazione e purificazione .....	16
2.3.1 Separazione .....	16
2.3.3 Cristallizzazione .....	17
2.4 Misure e preparazione dei campioni.....	18
2.5 Reagenti e strumentazione .....	19
Capitolo 3: Risultati e Discussione.....	23
3.1 Caratterizzazione del solido .....	23
3.1.1 Misure NMR.....	23
3.1.2 Misure di spettrometria di massa .....	25
3.1.3 Misure di DSC .....	27
3.1.4 Misure SAXS.....	28
3.1.5 Misure di FT-IR.....	29
3.1.6 Misure di WAXS.....	31
3.2 Studio degli aggregati in acqua .....	32
3.2.1 Misure DSC .....	33
3.2.2 Misure di SAXS.....	40
3.3 Test DPPH .....	46
Capitolo 4: Conclusioni .....	48
Sigle e abbreviazioni .....	49
Bibliografia.....	50
Ringraziamenti.....	52

## Capitolo 1: Introduzione

In questo capitolo introduttivo verranno esposte alcune considerazioni sulle proprietà antiossidanti dell'acido L-ascorbico e dell'acido oleico. Saranno date nozioni su *self-assembly* di composti anfifilici e verranno spiegate l'importanza e le grandi potenzialità che potrebbe avere una molecola come l'ascorbile oleato.

### 1.1 Vitamina C e radicali liberi

I radicali liberi sono sostanze estremamente reattive; questi possiedono un elettrone spaiato in grado sia di legarsi ad altri radicali sia di strappare un elettrone da alcune molecole, rendendole a loro volta dei radicali.

Alcuni radicali, come superossidi,  $\cdot\text{OH}$  e  $\cdot\text{OOH}$ , vengono originati dagli stessi processi aerobi e dall'uso biochimico di  $\text{O}_2$ . Tali sostanze vengono denominate AOS (*Active Oxygen Species*) e, come tutti i radicali liberi, sono spesso collegati ad effetti dannosi sia per l'ambiente sia per l'uomo, e vengono spesso individuate quali responsabili di tali processi nocivi; tra questi, si può nominare la riduzione di  $\text{O}_3$  in atmosfera, l'ossidazione e degradazione del cibo e l'invecchiamento stesso dell'uomo. Sembra inoltre che abbiano un ruolo nello sviluppo e maturazione di gravi patologie quali Alzheimer, ischemia e cancro. AOS e radicali attaccano proteine, DNA, membrane lipidiche e deteriorano funzioni biologiche. In particolare gli acidi grassi insaturi, componenti fondamentali delle membrane lipidiche, possono subire un processo di perossidazione ad opera di queste sostanze [Lo Nostro 2000].

Piante e animali utilizzano sostanze naturali per contrastare l'azione di queste molecole nocive, come bioflavonoidi, polifenoli, terpeni, alcaloidi e vitamine. Tra queste, la vitamina C, o acido L-ascorbico, assume un ruolo di rilievo come *radical scavenger*. Essa possiede quattro gruppi OH, due dei quali, quelli in posizione 2 e 3, formano una struttura enediolica e sono i responsabili del potere antiossidante della vitamina C. La struttura e l'equilibrio tautomerico della vitamina C sono illustrate di seguito [Figura 1]; l'OH in posizione 3 è il più acido, con una pKa di 4.2. Gli OH in posizione 6 e 5 hanno rispettivamente il comportamento di un alcol primario e secondario. L'alcol secondario,

essendo meno reattivo, sarà anche più difficile da attaccare per una eventuale esterificazione.

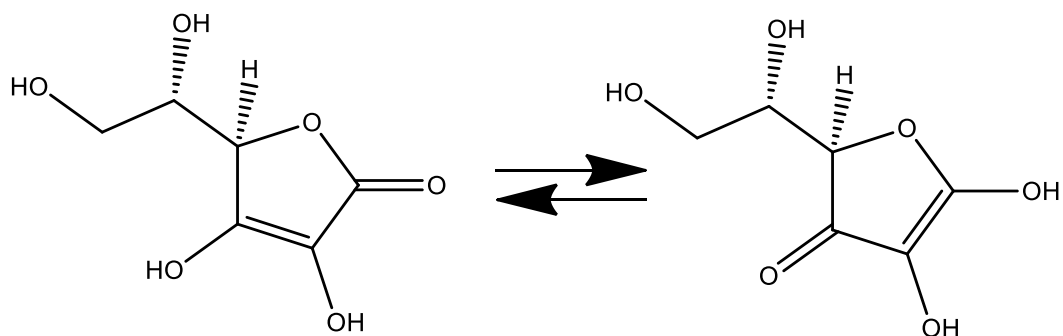


Figura 1: Equilibrio tautomerico dell'acido ascorbico

Allo stesso tempo però la vitamina C può comportarsi essa stessa da agente pro-ossidante, se inserita in un ambiente in cui sono presenti tracce di metalli pesanti [Lo Nostro 2000].

Sicuramente è possibile affermare che questa molecola, il cui meccanismo di *radical scavenger* è illustrato più avanti all'interno di questo capitolo, sia di grande interesse per quello che riguarda lo studio sulla protezione dei sistemi biologici.

## 1.2 Acido oleico

L'acido oleico è il maggiore costituente dell'olio di oliva, nel quale lo si trova soprattutto in forma di trigliceride, cioè come triestere del glicerolo. Si tratta di un acido Omega-9 con doppio legame in *cis*; tale struttura lo rende un acido dalla catena abbastanza ingombrante. La sua struttura è riportata di seguito [Figura 2]:

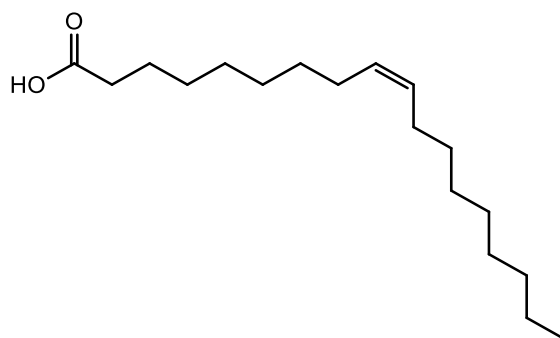


Figura 2: Struttura dell'acido oleico

Data la presenza del doppio legame, questo acido monoinsaturo ha dimostrato di possedere proprietà antiossidanti. In natura l'acido oleico può andare incontro ad un processo di perossidazione lipidica detta irrancidimento, favorito da una specie radicalica [Figura 3] [Paquette 1985, Sun 2011].

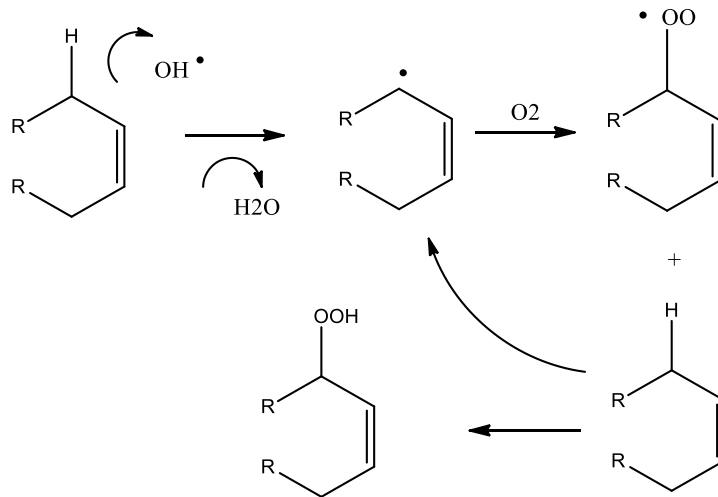


Figura 3: Processo di perossidazione lipidica

### 1.3 Self-Assembly: gel, coagel, micelle

Con *Self-assembly* si intende il processo che porta un soluto disperso in un solvente ad organizzarsi in modo spontaneo in strutture ordinate, tramite specifiche interazioni intermolecolari con altre molecole di soluto. Questo meccanismo è tipico dei tensioattivi, cioè delle sostanze organiche composte da una parte polare e idrofila, chiamata "testa", e da una parte idrofoba, generalmente composta da una catena di carboni, indicata col termine "coda". Questa doppia natura polare e apolare rende tali sostanze affini sia a fasi acquose che a fasi più apolari, e sempre grazie a questa loro particolarità tali molecole si riescono ad organizzare in molte strutture diverse, a seconda di parametri come la lunghezza della catena idrofobica o la temperatura. Occorre menzionare che il fenomeno dell'auto-associazione avviene anche nel caso di altre macromolecole come le proteine, oppure anche in solventi non acquosi, come per esempio quando un alcano semifluorurato viene disperso in un perfluorocarburo liquido.

Tra i diversi tipi di aggregati che si conoscono, si possono citare i bistrati, le micelle e i liposomi, strutture ad alto grado di impacchettamento in cui vengono massimizzate le

interazioni coda-coda e testa-acqua, mentre vengono minimizzati i contatti fra le porzioni idrofobe e l'acqua. Esistono anche sistemi inversi in cui il tensioattivo è disperso in una fase "olio". Le immagini riportate di seguito [Figura 4], sono solamente delle idealizzazioni delle strutture reali e servono unicamente per rappresentare in modo approssimativo la disposizione delle teste polari e delle catene idrofobiche.

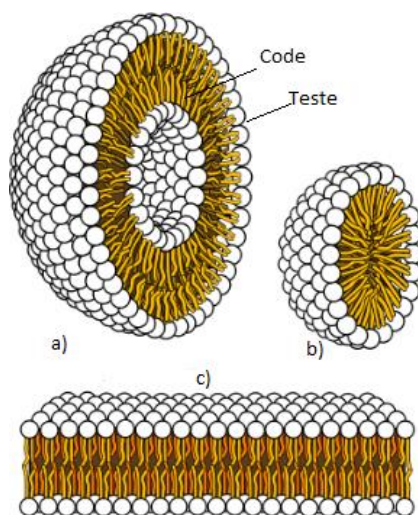


Figura 4: a) struttura di un liposoma b) struttura di una micella c) struttura di un bistrato  
Immagine tratta da protect\citeweb <https://it.wikipedia.org/wiki/Micella>

Infatti queste illustrazioni non riflettono lo stato liquido in cui si trovano le code idrofobiche, le quali possiedono una maggiore o minore flessibilità e libertà conformazionale a seconda della lunghezza della catena idrofobica e delle condizioni al contorno. Di conseguenza il raggio della micella è circa il 75% della lunghezza della catena nella sua conformazione *all-trans* e non ci sono spazi vuoti al centro della struttura aggregata. Inoltre, nel caso dei liposomi, lo strato più interno di ogni doppio foglietto contiene meno molecole e con le code più divaricate dello strato più esterno.

In particolare, tra gli aggregati formati da un doppio strato di tensioattivi a singola catena, sono di elevato interesse due diverse fasi: i gel e i *coagel*. Questi ultimi appaiono come cristalli idrati, composti da una struttura ordinata di strati lamellari fortemente impacchettati; in questa disposizione le catene di idrocarburi hanno una limitata libertà di movimento e la distanza tra due strati è circa 10 Å; in tale spazio si trova una piccola quantità di molecole d'acqua fortemente legata a fare da ponte e a distanziare due



lamelle. Sono proprio le forti interazioni tra le molecole d'acqua e le teste polari a stabilizzare la fase *coagel*.

La fase gel invece presenta un minor grado di cristallinità del *coagel*; le catene di idrocarburi nei gel possiedono maggior libertà di movimento, e le molecole di acqua tra le lamelle sono presenti in quantità maggiori rispetto al *coagel*, in uno spazio di circa 1000 Å. La fase gel è organizzata in modo che tra i due strati di acqua fortemente legati si estenda un più ampio spazio occupato da acqua intermedia. Un aumento di temperatura di norma porta ad una espansione anisotropa delle catene di idrocarburi, che si risolve in parziale collasso della rigida struttura del *coagel*, in modo che l'acqua possa penetrare e riempire gli spazi tra le teste polari.

Tramite DSC è stato possibile indagare le interazioni tra acqua e le molecole di tensioattivo: come precedente accennato, sono stati riconosciuti almeno due diversi tipi di acqua: quella fortemente legata, della quale non si vede la transizione in scansione calorimetrica, e l'acqua libera, o acqua *bulk*, che invece si riconosce dalla transizione attorno agli 0 °C. Tramite questa tecnica è possibile ricavare il numero di molecole di acqua di idratazione, vale a dire le molecole di acqua fortemente legata per testa polare.

Le transizioni *coagel*-gel e *coagel*-micelle sono fenomeni reversibili, determinati dalla lunghezza delle code idrofobiche e dall'aumento della temperatura. La temperatura in cui il *coagel* è in equilibrio con le micelle è chiamata "punto di Krafft", mentre la minima concentrazione di tensioattivo in acqua necessaria alla formazione di micelle è chiamata *cmc*, ovvero *critical micelle concentration*, e la temperatura corrispondente è chiamata *cmt* [Lo Nostro2000, Ambrosi2004].

#### **1.4 Ascorbil alcanati a catena singola**

A causa della sua natura polare, la vitamina C è un antiossidante insolubile in mezzi idrofobici, e inoltre non è in grado di attraversare membrane lipidiche, costituite in buona parte da un doppio strato di acidi grassi insaturi, che ricordiamo essere particolarmente suscettibili alla perossidazione lipidica.

Studi precedenti hanno condotto alla sintesi di esteri o eteri della vitamina C mediante l'inserimento di catene idrocarburiche in posizione 6, 5, 3 e 2. Tale provvedimento ha reso la vitamina C solubile nei grassi; inoltre così facendo si ottiene una struttura anfifilica,

capace di interagire con le biomembrane ed in grado di organizzarsi in aggregati supramolecolari, proprio come i modelli di *self-assembly* riportati nel paragrafo precedente; più la catena alchilica è lunga, più è favorito l'inserimento del tensioattivo nel bistrato molecolare [Lo Nostro Elsevier 2000].

Di particolare interesse sono i derivati 6-O-ascorbil alcanoli, cioè esteri della vitamina C con catene sature di atomi di carbonio, abbreviati con ASC $n$ , in cui  $n$  sta per il numero di atomi di carbonio presenti nella catena. Gli ASC $n$  sono tensioattivi anionici in acqua, e il tipo di aggregati che formano è dipendente dalla struttura chimica, quindi dalla lunghezza della catena alchilica, dalla concentrazione e dalla temperatura.

A temperatura ambiente la solubilità degli ASC $n$  è scarsa, ad eccezione di ASC8, ed aumenta con la temperatura. Tutti gli ASC $n$  formano, in dipendenza dalla loro catena, dispersioni micellari al di sopra della loro cmc e a temperature al di sopra della loro cmt. Se raffreddate, queste dispersioni diventano *coagel*. È stato osservato che, riscaldando, queste fasi cristalline idrate transiscono da *coagel* a micelle o da *coagel* a gel [Figura 5]; la prima transizione avviene per catene idrofobiche con numero di atomi di carbonio  $\leq 10$ , mentre la seconda è osservata per numero di atomi di carbonio  $\geq 11$  [Palma 2002].

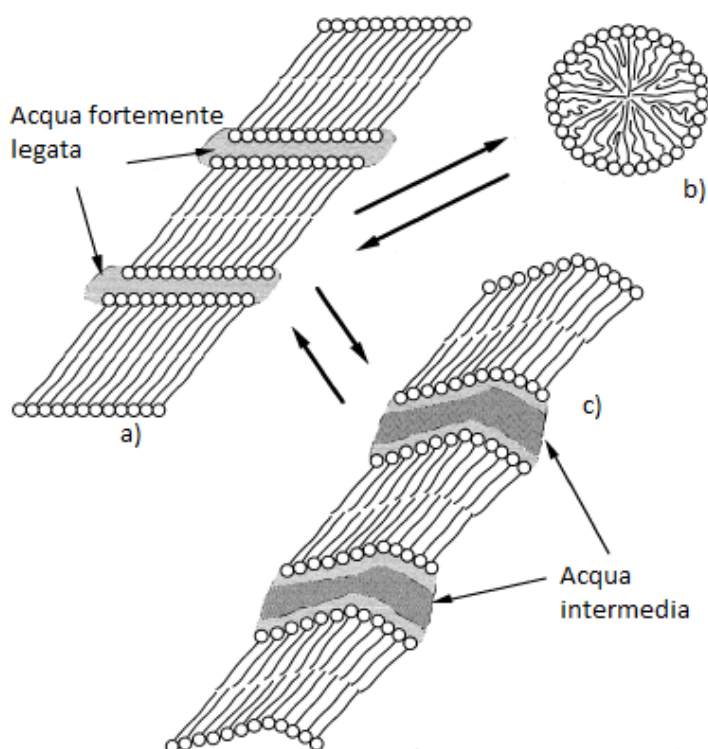


Figura 5: Transizioni tra a) *coagel* b) *micella* c) *gel*. Immagine tratta da Langmuir 2002, 18, 9219-9224

Dagli studi è emerso che, indipendentemente dalla lunghezza della coda idrofobica, tutti gli ASC<sub>n</sub> conservano le proprietà antiossidanti della vitamina C, ma data la loro natura di tensioattivo e la loro capacità di formare in acqua gli aggregati sopra riportati, forniscono un ambiente ideale per solubilizzare e proteggere sostanze idrofobiche facilmente degradabili e sensibili all'ossidazione da parte di AOS, calore e luce [Palma 2003].

### **1.5 Potenzialità dell'ascorbile oleato**

L'estere che deriva dall'unione di acido ascorbico e acido oleico è una molecola anfifilica, ma a differenza degli ASC<sub>n</sub> precedentemente citati, la catena idrofobica presenta un'insaturazione *cis* fra gli atomi di carbonio 9 e 10; questa rende l'ascorbile oleato un tensioattivo abbastanza ingombrante e meno predisposto ad un rigido impacchettamento nella eventuale formazione di aggregati.

Trattandosi di una molecola che nasce dall'unione di due sostanze che possiedono entrambe separatamente un potere antiossidante, le potenzialità dell'ascorbile oleato possono essere molteplici. Infatti se come gli altri tensioattivi è capace di formare aggregati micellari o di altro tipo può essere impiegata nella protezione di sostanze idrofobiche e suscettibili all'ossidazione, col vantaggio che la coda fornisce anch'essa un'ulteriore protezione contro l'ossidazione e direttamente nel core idrofobico dell'aggregato.

Le applicazioni di questa molecola, data anche la sua natura *green* che non comporta danni né per l'uomo né per l'ambiente, neanche considerando le procedure di sintesi presentate in questo lavoro di tesi, possono essere potenzialmente sfruttate nel campo farmaceutico, nei processi di *drug delivery*, cosmetico e alimentare.

### **1.6 Test DPPH**

Il DPPH (2,2-difenil- 1-picrilidrazile) è un radicale stabile [Figura 6];

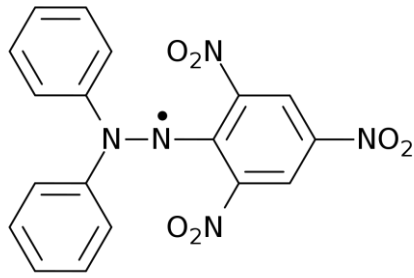


Figura 6: Struttura di DPPH

Una soluzione di questo radicale in metanolo assume una colorazione viola intenso. Se fatto reagire con un antiossidante, il radicale viene neutralizzato (*radical quenching*) e la sua colorazione passa dal viola al giallo tenue a causa delle diverse frequenze di assorbimento dovute alla diversa struttura elettronica.

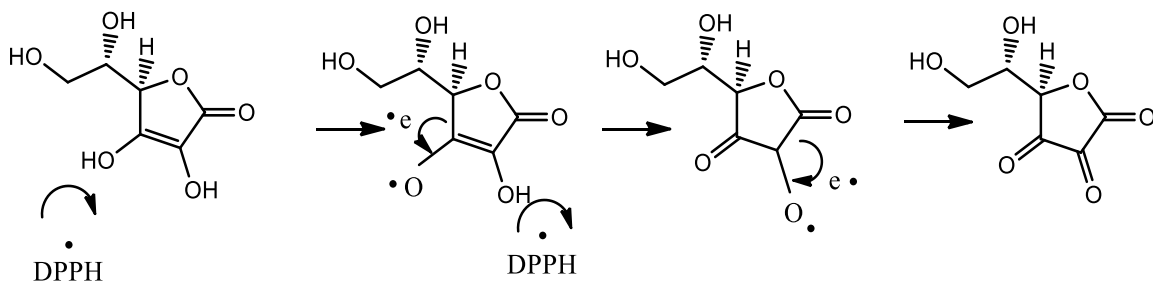


Figura 7: Meccanismo dell'azione antiossidante della Vitamina C con DPPH

In Figura 7 viene riportato il meccanismo dell'azione antiossidante che avviene tra vitamina C e DPPH.

## Capitolo 2: Materiali e Procedure

L'ascorbile oleato è stato ottenuto per sintesi enzimatica a partire da una soluzione in acetone di acido ascorbico e acido oleico. Il prodotto grezzo viene filtrato su celite con acetato di etile, quindi trattato con acqua ed estratto con etile acetato.

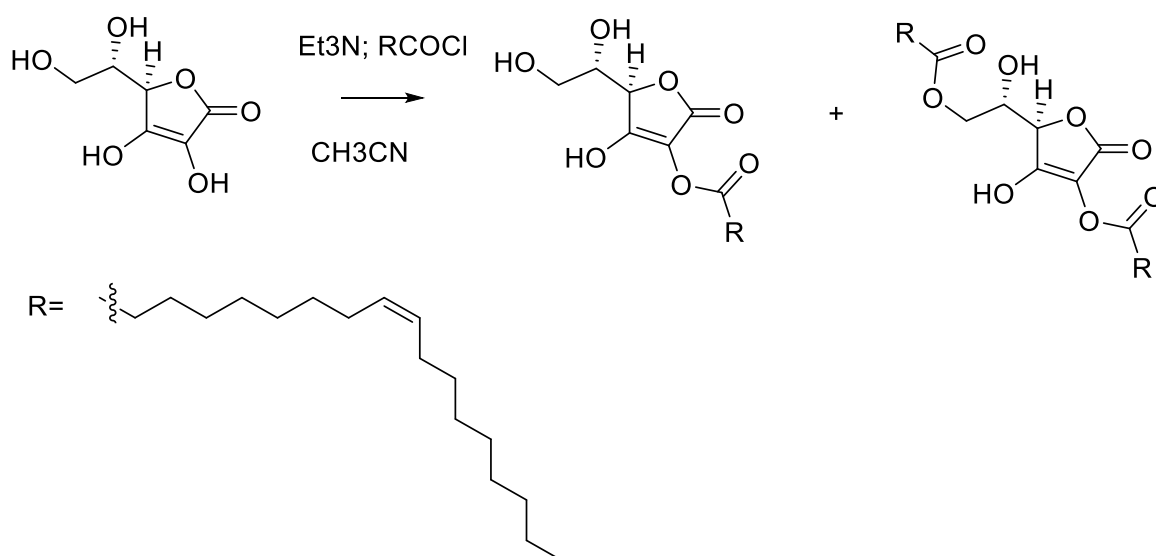
Sul prodotto ottenuto sono state successivamente svolte misure di  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , punto di fusione, massa, DPPH, DSC, FT-IR, WAXS e SAXS.

### 2.1 Premessa alla scelta del metodo di sintesi

La scelta di utilizzare la sintesi enzimatica per ottenere ascorbile oleato è stata il frutto di osservazioni e risultati tratti da precedenti studi.

L'oggetto di studio per la presente tesi è l'estere oleico della vitamina C in posizione 6. Questo non è un prodotto facilmente ottenibile, soprattutto a causa della presenza dei gruppi OH in posizione 2 e 3; come discusso nel capitolo di introduzione, è proprio il gruppo enediolico costituito dai gruppi OH in 2 e 3 a conferire alla vitamina C un forte carattere riducente, e quindi è il responsabile del noto potere antiossidante ad essa associato. Da qui l'importanza di ottenere il derivato in posizione 6, al fine di avere un prodotto anfifilico che conservi le proprietà della vitamina C. Per quanto invece riguarda la posizione 5, è possibile affermare che l'OH sul C5, essendo un alcol secondario, risulta molto meno reattivo dell'OH in C6, quindi non è preso in considerazione il suo ruolo competitivo con la posizione 6.

Un primo tentativo di sintesi è stato svolto in un precedente lavoro di tesi [Tesi Bicocchi 2016] con esterificazione diretta a partire da acido L-ascorbico tal quale con oleil cloruro in acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Per catalisi basica è stata utilizzata  $\text{Et}_3\text{N}$ . Come prodotti di reazione però sono stati ottenuti esteri mono- e di-sostituiti [Figura 8]. In particolare, come monosostituito è stato ottenuto l'ascorbil estere in posizione 2, mentre come disostituito è stato sintetizzato l'ascorbil estere 2,6, che è anche il prodotto preponderante.



*Figura 8: Schema della reazione di esterificazione della vitamina C con acido oleico in acetonitrile per catalisi basica*

Visto il mancato ottenimento del prodotto desiderato, nel precedente lavoro di tesi è stato sviluppato un secondo metodo, che prevedeva la protezione dei gruppi OH 2,3 tramite gruppi protettori facilmente rimovibili e compatibili alla presenza di doppi legami. Come gruppo protettore è quindi stato scelto il PMB-bromuro. La reazione è stata effettuata in DCM; l'acido ascorbico protetto in 2,3 è stato fatto reagire con oleil cloruro in presenza di  $\text{Et}_3\text{N}$ . Con questo secondo metodo però si sono ottenute scarse rese. Infine, è opportuno menzionare che anche l'esterificazione di Fischer con acido oleico e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  è stata effettuata in studi precedenti, ma non ha avuto esito positivo in quanto si otteneva una totale degradazione dei reagenti, anche lavorando in atmosfera protetta di  $\text{N}_2$  e in bagno di ghiaccio.

## 2.2 Procedura di sintesi

Nell'ambito di questo lavoro di tesi, la sintesi dell'ascorbile oleato, eseguita per un totale di tre volte, è stata effettuata seguendo le indicazioni riportate in letteratura [Dolle 2011]. Tuttavia sono state apportate alcune modifiche su metodo e quantità di reagenti utilizzate, allo scopo di ottimizzare il processo sintetico.

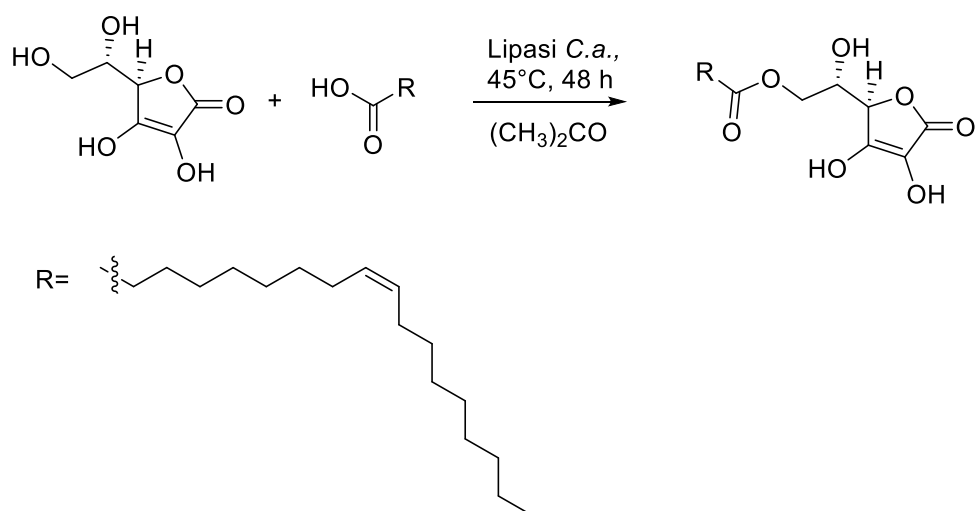


Figura 9: Schema di reazione per la sintesi messa in pratica durante questo lavoro di tesi

Lo schema di reazione è riportato in Figura 9 e le fasi del procedimento utilizzato sono le seguenti:

### 2.2.1 Attivazione setacci molecolari

Per eliminare l'acqua dall'ambiente di reazione e per spostare l'equilibrio di reazione verso il prodotto desiderato sono stati utilizzati setacci molecolari dal diametro poroso di 4 Å; l'acqua infatti è uno dei prodotti di reazione, quindi il suo allontanamento dalla reazione è necessario. Questi sono stati pesati e successivamente attivati per riscaldamento dentro ad un pallone posto sotto vuoto. In questo modo è stato possibile eliminare la presenza di umidità dalle cavità delle zeoliti. Per impedire che l'aria potesse contaminare i setacci attivati, ad esempio reintroducendo umidità all'interno, si è proceduto con l'esecuzione di tre cicli di purificazione con vuoto/N<sub>2</sub>.

### 2.2.2 Sintesi enzimatica

In una provetta sono stati aggiunti i reagenti acido oleico e acido L-ascorbico, opportunamente pesati in precedenza. Si è scelto di lavorare in eccesso di acido ascorbico, in misura di 5:1 equivalenti, in modo da esaurire l'acido oleico, che rimane difficile da eliminare nella purificazione a causa di problemi dovuti alla coprecipitazione

con l'ascorbile oleato. Questa scelta dei rapporti equivalenti è stata il risultato di una progressiva ottimizzazione sulla stechiometria dei reagenti effettuata in precedenza nel laboratorio dove è stata svolta la sintesi; infatti utilizzando quantità stechiometriche esatte o eccesso di acido oleico il processo di purificazione ne risultava complesso e inefficace.

Nella provetta è stato inserito l'enzima *lipasi 73940-1G* fornito da *Candida antarctica*, un'ancorina magnetica e le zeoliti precedentemente attivate; per l'inserimento di queste ultime è stato utilizzato un imbuto di vetro e si è cercato di agire velocemente e in presenza di un flusso di azoto. La provetta è stata quindi sigillata con l'apposito tappo. Per aggiungere l'acetone è stata utilizzata una siringa di vetro *Hamilton*, con la quale è stato forato il tappo della provetta. Al termine dell'operazione la provetta è stata sigillata con *parafilm*.

La provetta è poi stata immersa in un bagno ad olio; la soluzione è rimasta a reagire sotto agitazione per 48 h, ad una temperatura di 45 °C.

## **2.3 Procedura di separazione e purificazione**

### **2.3.1 Separazione**

L'apparato di separazione è stato realizzato fissando sopra una beuta una colonna di separazione di vetro tramite morsetti a noce.

All'interno della colonna sono stati inseriti nell'ordine: un piccolo batuffolo di cotone e circa 5 cm di celite in polvere. Per facilitare la discesa del prodotto, affinché potesse essere raccolto nella beuta e separato così da residui solidi e reagente in eccesso, la colonna è stata preventivamente impaccata con etil acetato, mediante flusso di N<sub>2</sub>.

La provetta è stata quindi interamente svuotata in colonna, usando un magnete per evitare la caduta dell'ancorina, e lavata più volte con etil acetato per raccogliere ogni possibile residuo di prodotto rimasto all'interno. Sempre utilizzando il flusso di N<sub>2</sub>, è stato inserito in colonna altro etil acetato tramite pipetta *Pasteur*, per un totale di quattro volte, il quale, essendo un buon solvente per l'ascorbile oleato, ha permesso di raccogliere nella beuta il prodotto desiderato. In colonna invece sono stati tratti residui e sottoprodotti di reazione. Questo solvente però è in grado di solubilizzare parzialmente anche i residui



di acido ascorbico. È stato pertanto necessario effettuare un work-up acquoso per eliminare questa impurezza.

### 2.3.2 Work-up acquoso

L'intero contenuto della beuta è stato versato in un imbuto separatore. La beuta è stata poi lavata con etil acetato per raccogliere i residui. Quindi è stata aggiunta acqua demineralizzata e *brine*, cioè salamoia. Nonostante la consistente aggiunta di salamoia, un'emulsione si è formata all'interfase. Questa però è stata eliminata semplicemente aspettando alcuni minuti. Il lavaggio è stato eseguito per tre volte.

### 2.3.3 Cristallizzazione

A questo punto alla beuta contenente il prodotto è stato aggiunto  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  finché non si osserva il distacco del solido dal fondo del recipiente, cioè finché non si osserva "*spolverare*", e si è lasciato riposare. Dopo aver filtrato il prodotto si è proceduto con l'evaporazione del solvente per mezzo di *rotavapor*. Il solido così ottenuto è stato sciolto in poche gocce di dietil etere ed è stato aggiunto etere di petrolio per farlo precipitare. La precipitazione però è risultata difficoltosa a causa del formarsi di una sospensione, ma immergendo il pallone per alcuni minuti in un bagno di ghiaccio è stato possibile migliorare questa operazione. Si è proceduto dunque ad una filtrazione tramite colonna riempita di celite e di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  previo impaccamento della colonna con etere di petrolio. Dopo aver quindi trasferito l'intero contenuto del pallone in colonna, si è aggiunto etere di petrolio per rimuovere eventuali impurità di acido oleico; il tutto è stato raccolto in una beuta ed immerso in un bagno di ghiaccio per osservare eventuali precipitazioni da recuperare del prodotto voluto. Non è stata però osservata alcuna precipitazione; alla colonna è stato aggiunto dietil etere, e l'eluato è stato raccolto in un pallone. In seguito ad un nuovo trattamento con *rotavapor* e pompa a vuoto, il prodotto è stato pesato e su di esso sono state eseguite misure di NMR per la caratterizzazione del composto e verificare quindi l'effettivo ottenimento dell'ascorbile oleato. Visivamente il prodotto appare come un solido trasparente tendente al bianco, con aspetto solido abbastanza 'ceroso'.

È importante fare menzione del fatto che in una successiva sintesi è stato utilizzato dietil etere al posto di etil acetato per la separazione su colonna. Questo è stato fatto per eliminare il passaggio del work-up acquoso, visto che si temeva la presenza di acqua di cristallizzazione nel prodotto. Inoltre è stata utilizzata soltanto vetreria essiccata in stufa. Dalle analisi eseguite successivamente però non sono stati osservati cambiamenti apprezzabili tra i due metodi di purificazione.

## 2.4 Misure e preparazione dei campioni

Sul campione ottenuto dalla sintesi sono state eseguite misure di NMR per verificare la presenza dell'ascorbile oleato e mettere in luce eventuali impurezze. Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  sono risultati in accordo con la struttura del composto, quindi da questi si è accertato che la reazione avvenuta fosse quella desiderata.

Nonostante l'ottenimento degli spettri NMR soddisfacente, la non corrispondenza del punto di fusione del solido con quello riportato in letteratura [Viklund 2003], ha richiesto anche un'analisi tramite spettro di massa, dal quale si è potuto nuovamente confermare la presenza dell'ascorbile oleato.

A questo punto sul campione sono state svolte misure di DSC sia sul solido sia su dispersioni in acqua contenenti diverse percentuali di tensioattivo. Queste ultime sono state preparate sciogliendo il solido in acqua a 50 °C e successivamente raffreddate in frigorifero. Una fase condensata bianca si forma durante la fase di raffreddamento. Tre cicli di *annealing* (riscaldamento-raffreddamento) sono stati eseguiti al fine di ottenere una fase omogenea. Per omogeneizzare al meglio i campioni sono stati utilizzati strumenti come il bagno a ultrasuoni e vortex.

Essendo il solido ottenuto mediante work-up acquoso, parte del campione è stato liofilizzato al fine di rimuovere acqua eventualmente presente. Sul liofilizzato sono state svolte misure di DSC e FT-IR, entrambe messe poi a confronto con il prodotto di sintesi "crudo".

Data la possibile instabilità del prodotto contenente una testa di vitamina C ed un doppio legame nella catena, entrambi sensibili all'ossidazione, questo è stato continuamente testato mediante misure  $^1\text{H-NMR}$  che non hanno mostrato variazioni nel tempo.

Per verificare le proprietà antiossidanti del prodotto è stato svolto un test DPPH e il

risultato è stato messo a confronto con dei test analoghi svolti sulla vitamina C e sull'acido oleico.

Infine sono state effettuate misure di *scattering* di raggi X (SAXS) per cercare di determinare sia la struttura del solido, sia lo stato di aggregazione dei campioni ottenuti sciogliendo il prodotto in acqua prima e dopo le transizioni visibili ad occhio nudo e responsabili delle transizioni presenti nei termogrammi delle DSC.

## 2.5 Reagenti e strumentazione

I reagenti utilizzati, L-Ascorbic acid > 99.0% e acido oleico 90%, sono stati forniti rispettivamente da Sigma-Aldrich e Aldrich. Sigma-Aldrich ha anche fornito l'enzima utilizzato, *Lipase immobilized from Candida antarctica*, 7394-1G, i setacci, ovvero *molecular sieves*, 4 Å, *beads*, 8-12 mesh, la celite (CaO)<sub>3</sub>.Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, e il DPPH.

Tutte le pesate sono state effettuate con bilancia analitica CP225D Sartorius.

Tutti i solventi sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

**Misure NMR.** Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR sono stati acquisiti alle frequenze e con i solventi indicati nel capitolo di trattazione dei dati. I *chemical shifts* ( $\delta$ ) sono stati espressi in parti per milioni (ppm). Lo strumento utilizzato è stato un Varian Gemini 200, S/N Rev. A0894 da Agilent Technologies e un Varian Mercury 400.

L'assegnazione dei segnali <sup>1</sup>H-NMR è stata effettuata con l'aiuto di uno spettro COSY.

**Misure FT-IR.** Le misure di FT-IR sono state condotte utilizzando uno spettrometro Nexus 970-FTIR (Thermo-Nicolet), S/N AFK0401096 fornito da Thermo Electron Corp., con una risoluzione di 4 cm<sup>-1</sup> e 128 scansioni. Il range di energia investigata è dai 600 ai 4000 cm<sup>-1</sup>. È stato usato un cristallo ATR e un detector MCT-A. Dopo aver acquisito gli spettri è stata fatta una correzione con il pacchetto software Omnic, distribuito con lo strumento.

**Misure DSC.** Le misure di DSC sono state effettuate con un apparato Q2000 V24 TA INSTRUMENT, S/N 0160 Waters S.p.a. usando pan di alluminio sigillati sotto atmosfera inerte di azoto. Il *rate* di riscaldamento utilizzato era quello di 2 °C/min. Per il solido è stato indagato un intervallo di temperature che va da 0 °C a 120 °C. All'inizio della

scansione il campione è stato mantenuto per 5 minuti a 0 °C. Per gli aggregati in fase acquosa sono stati adottati due diversi metodi: il primo (procedura 1) consiste nel tenere il campione a 0 °C per 30 minuti e poi riscaldare fino a 60 °C. Il secondo (procedura 2) invece è stato quello di partire da 0 °C, raffreddare fino a -90 °C e poi riscaldare fino a 60 °C. In entrambi i casi i campioni vengono preparati al di sopra della temperatura di transizione e fatti condensare dentro il pan prima dell'inizio della scansione. Le temperature di transizione di fase sono state prese come temperature relative ai massimi dei picchi, e le variazioni di entalpia sono state ottenute misurando l'area sottesa ai picchi. Sono stati analizzati campioni di ascorbile oleato solido e di due sue dispersioni acquose contenenti 5, 10, 20 e 40 % di tensioattivo in peso.

**Misure di Spettrometria di Massa.** Le misure di spettrometria di massa sono state ottenute con uno strumento THERMO-LCQ-Fleet, S/N LCF10212 da Thermo Fisher Scientific, per mezzo di un elettro-nebulizzatore (ESI) e utilizzando N<sub>2</sub> come gas di trasporto. Lo spettro che si registra è uno spettro di ioni negativi separati da un sistema analizzatore a quadrupolo sulla base del rapporto massa\carica (m/z).

**Misure SAXS.** Le misure di *scattering di Raggi X a piccolo angolo* sono state eseguite con un apparato S3-Micro SWAX-camera (Kratky), S/N 021008 da Hecus X-Ray Systems GmbH, equipaggiato con un detector sensibile alla posizione (OED 50M) costituito da 1024 canali di 54 µm di dimensione. La lunghezza d'onda operativa  $\lambda=1.542 \text{ \AA}$  (CuK $\alpha$ ) è stata ottenuta attraverso una sorgente X ultra-brillante a microfuoco puntiforme (GENIX-Fox 3D, Xenocs), operata alla massima potenza di 50 W (50 kV e 1 mA). Lo strumento è stato calibrato nella regione di basso angolo per mezzo di uno standard (benehato di argento  $d=58.34 \text{ \AA}$ ) [Blanton 2011] e mediante lupulen ( $d=4.12 \text{ \AA}$ ) per la regione ad angoli maggiori. La distanza tra campione e detector è di 281 mm. Il vettore di *scattering* campionato,  $q=(4\pi n/\lambda)\cdot\sin\theta$ , è risultato 0.01-0.54  $\text{\AA}^{-1}$ , dove  $2\theta$  è l'angolo di *scattering* e l'indice di rifrazione  $n$  è stato preso uguale a 1. L'esperimento è stato condotto in trasmissione sia sul solido che sui gel con l'uso di apposite celle. La temperatura dei campioni durante la misura è stata mantenuta per mezzo di un elemento Peltier a 10 °C per i solidi e a 4 e 20 °C per i gel, cioè prima e subito dopo la temperatura di transizione ottenuta da DSC. Per quanto riguarda l'analisi del solido sono state eseguite misure di WAXS (*Wide-Angle X-*

*ray Scattering*) con un intervallo di  $2\theta$  che varia da  $18^\circ$  a  $26^\circ$  [Venturini 2014]. L'elaborazione delle curve è stata effettuata usando il programma IGOR PRO; il procedimento prevede che la curva sperimentale venga fittata con una *'trial function'*, la cui forma è predetta da assunzioni teoriche o conoscenze preacquisite. Il programma cerca di modificare i parametri non tenuti fissi dall'operatore, in modo da riuscire a fittare la curva. I parametri calcolati permettono di ricavare informazioni sul campione in esame. [Tempestini 2015].

In particolare, tramite la legge di Bragg  $n\lambda=2d\sin\theta$ , esplicitando  $\lambda$  e sostituendola nell'equazione per  $q$  sopra citata, è possibile ricavare la relazione  $q=2\pi/d$  in cui l'ordine di diffrazione  $n$  è pari a 1, cioè è relativo al primo picco di riflessione. Con questa formula si lega il vettore  $q$  allo *spacing* lamellare, cioè alla distanza tra due piani di due lamelle adiacenti di tensioattivo organizzato secondo un modello teorico che verrà discusso in seguito.

Le curve di *scattering* sono riportate come  $I(q)$  vs  $q$ , dove  $I(q)$  è la variabile dipendente dell'esperimento di *scattering* e contiene informazioni su dimensione, forma e interazione esistente tra i centri di *scattering* interni al campione. L'intensità di *scattering* è definita come:

$$I(q) = KN_p V_p 2(\Delta\rho) 2P(q)S(q) + B$$

In cui:

- $K$  è una costante che dipende dalle variabili specifiche dello strumento,
- $N_p$  è la densità numerica delle particelle che *scattering* la radiazione sonda,
- $V_p$  è il volume della particella singola,
- $\Delta\rho$  è il contrasto dell'esperimento, che quantifica la differenza di interazione tra la radiazione sonda e particella rispetto all'interazione tra radiazione sonda e mezzo continuo,
- $P(q)$  è il fattore di forma e polidispersità, che descrive appunto la forma degli aggregati,
- $S(q)$  è il fattore di struttura, che descrive l'interazione tra gli aggregati, ad esempio l'interazione tra due micelle,
- $q$  è il vettore di *scattering*,
- $B$  è un background che dipende dal rumore dello strumento e dallo *scattering* incoerente.

$P(q)$  descrive come l'intensità di *scattering* viene variata dai fenomeni di interferenza conseguenti alla diffusione della radiazione sonda dagli atomi che costituiscono lo stesso tipo di disomogeneità.  $P(q)$  dunque descrive l'arrangiamento atomico nello spazio reciproco.

Ciò che viene analizzato dallo strumento non è il dettaglio atomico, ma una media per ciascuna molecola, per cui si definisce una densità di lunghezza di *scattering* (SLD):

$$\sum_i^n \frac{b_i}{V} = \delta \frac{NA}{M} \sum_i^n b_i$$

In cui:

- $b_i$  è la lunghezza di scattering dell'atomo  $i$ -esimo; ed è caratteristica dell'atomo  $i$ -esimo attraverso la quale viene quantificata l'interazione tra radiazione sonda e materia.
- $V$  è il volume molecolare,
- $\delta$  è la densità "bulk" della molecola considerata,
- $M$  è il peso molecolare,
- $NA$  è il numero di Avogadro.

## Capitolo 3: Risultati e Discussione

In questo capitolo verranno riportati e commentati gli spettri e i grafici ottenuti dalle misure di NMR, spettrometria di massa, DSC, SAXS e WAXD. Verranno infine discussi i risultati del test DPPH.

### 3.1 Caratterizzazione del solido

Sul solido sono state eseguite misure con varie tecniche di analisi al fine di accertarne l'avvenuta sintesi e indagarne la struttura cristallina.

#### 3.1.1 Misure NMR

Sui campioni ottenuti dalle sintesi sono state eseguite misure di NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  per verificare l'effettivo ottenimento del prodotto desiderato.

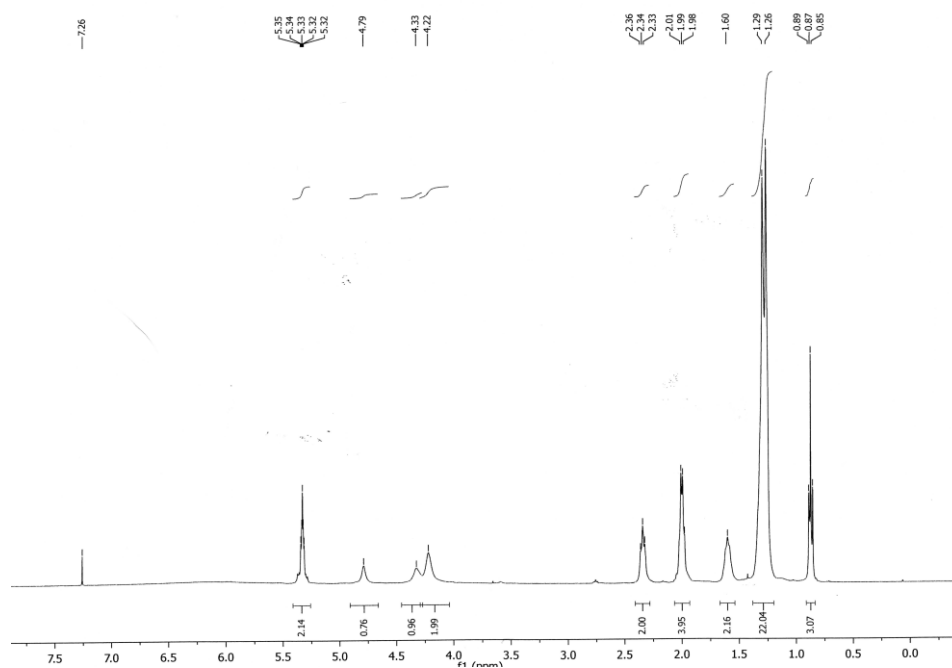


Figura 10: Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del solido in  $\text{CDCl}_3$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 0.87 (3H, t,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.26-1.29 (20H, m), 1.53-1.67 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.98-2.05 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 2.28-2.39 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 4.14-4.28 (2H, m,  $\text{CHaHb}$  e  $\text{CHOH}$ ), 4.28-4.96 (1H, m,  $\text{CHaHbO}$ ), 4.79 (1H, bs,  $\text{CCHO}$ ), 5.29-5.37 (2H, m,  $\text{CH}=\text{CH}$ ).

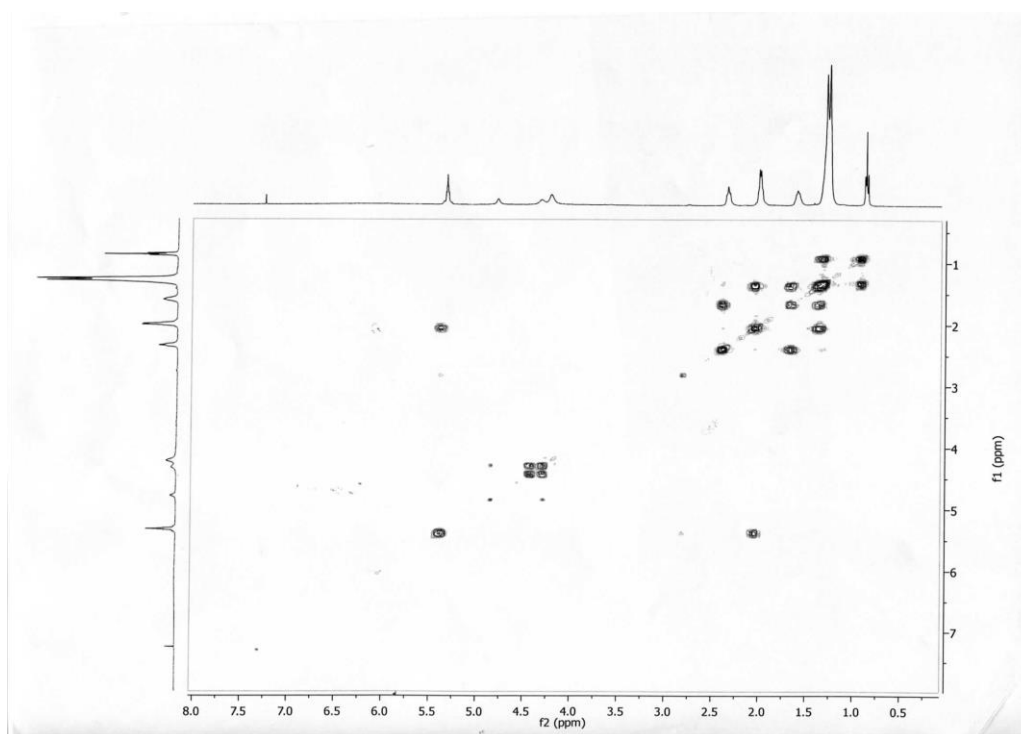


Figura 11: Spettro COSY del solido in  $\text{CDCl}_3$

Dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$  eseguito sul solido disciolto in  $\text{CDCl}_3$  [Figura 10] è possibile verificare l'ottenimento dell'ascorbile oleato. È stato riportato anche lo spettro di correlazione spettrale omonucleare, COSY, [Figura 11].

Come risulta evidente dall'integrazione dei picchi e dallo *shift*, lo spettro è coerente con la struttura dell'ascorbil oleato.



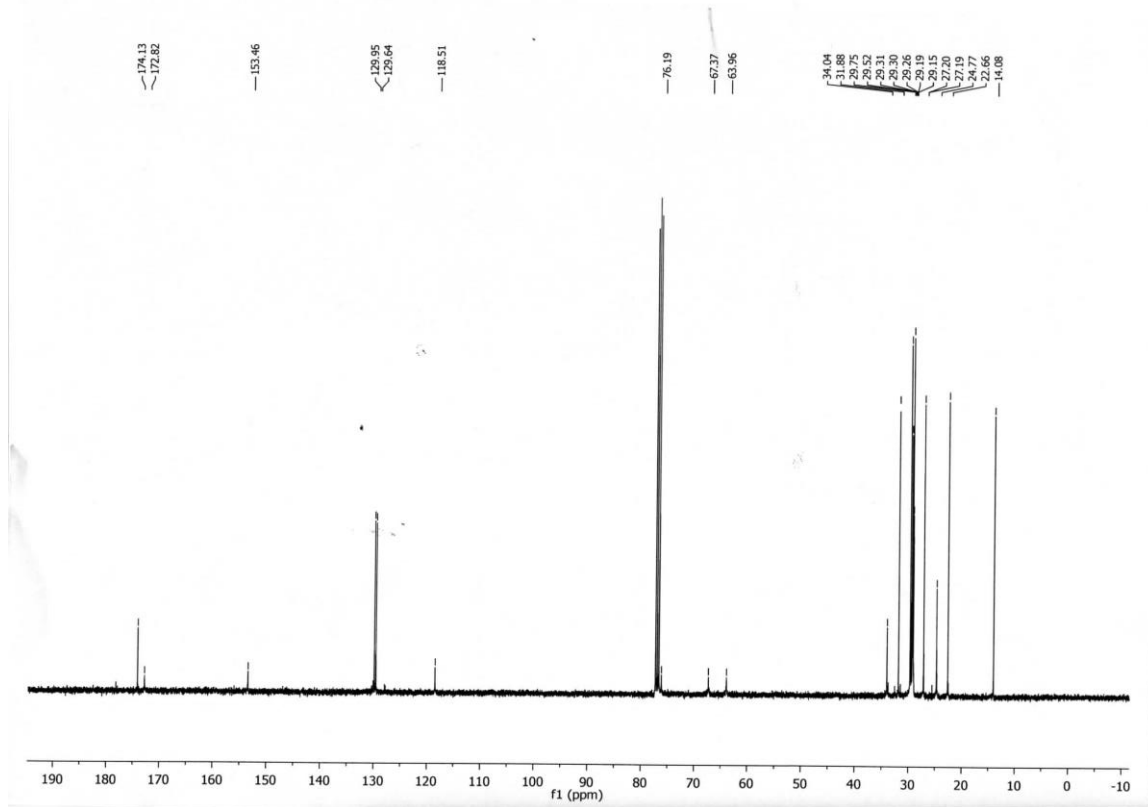


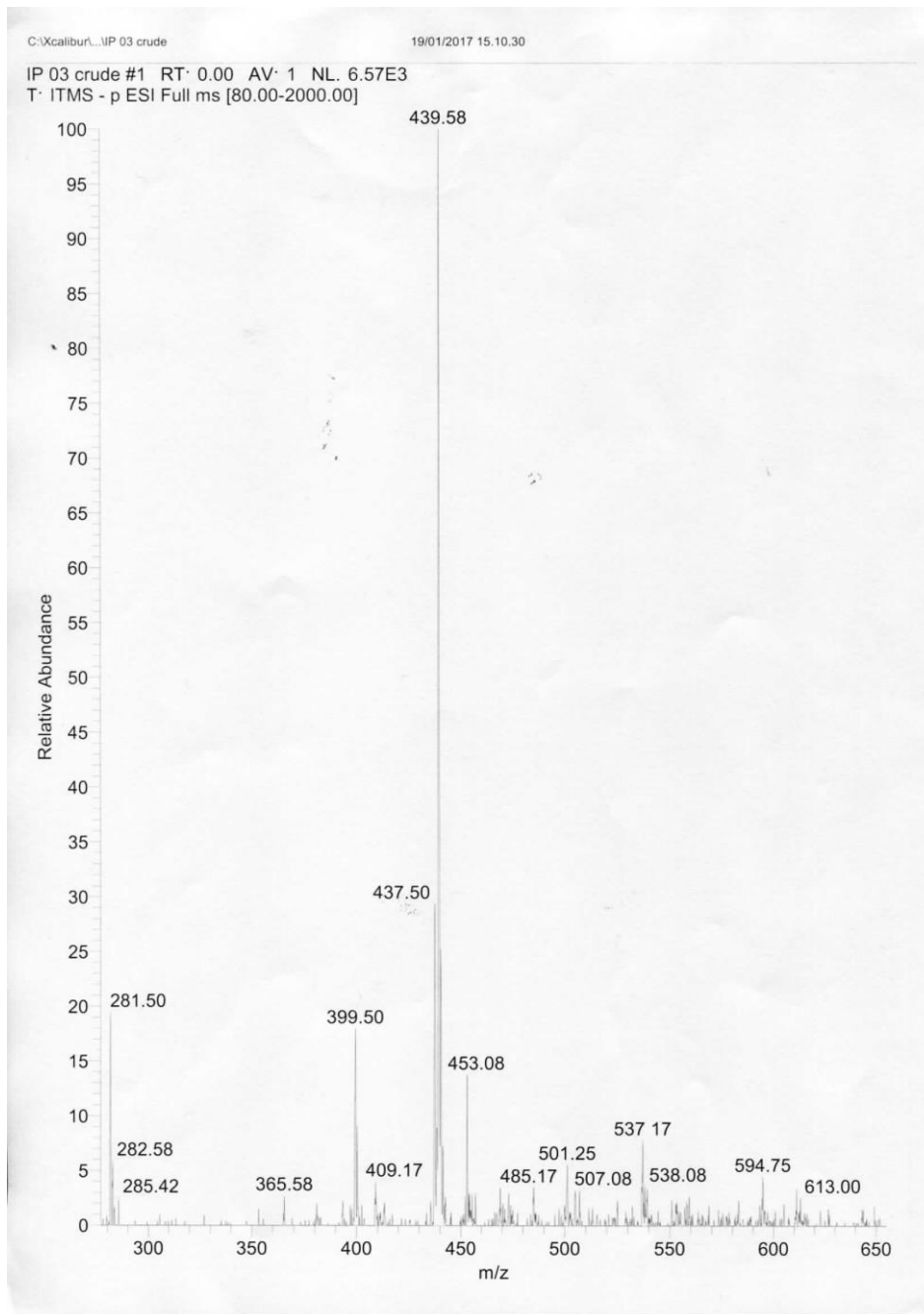
Figura 12: Spettro C-NMR sul solido in  $CDCl_3$

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.1, 22.6, 24.8, 27.2, 27.2, 29.2, 29.2, 29.3, 29.3, 29.3, 29.5, 29.8, 31.9, 34.0, 64.0, 67.4, 76.2, 118.5, 129.6, 130.0, 153.5, 172.8, 174.1.

Nello spettro del carbonio [Figura 12] si possono osservare i segnali dei carboni presenti nella molecola di ascorbile oleato.

### 3.1.2 Misure di spettrometria di massa

Sul campione è stata effettuata una misura di spettrometria di massa (MS). Si riporta lo spettro ottenuto [Figura13].



*Figura 13: Spettro di massa*

MS (ESI, negative): 439 (M-H)<sup>-</sup>

Come si vede dallo spettro, il picco base è coerente con la massa molecolare calcolata dell'ascorbile oleato, cioè 440.56 Da.

### 3.1.3 Misure di DSC

Le misure di calorimetria a scansione differenziale sono state effettuate sul campione solido sia immediatamente dopo la sintesi (crudo) che dopo liofilizzazione. Il termogramma ottenuto sul “crudo” è riportato in Figura 14.

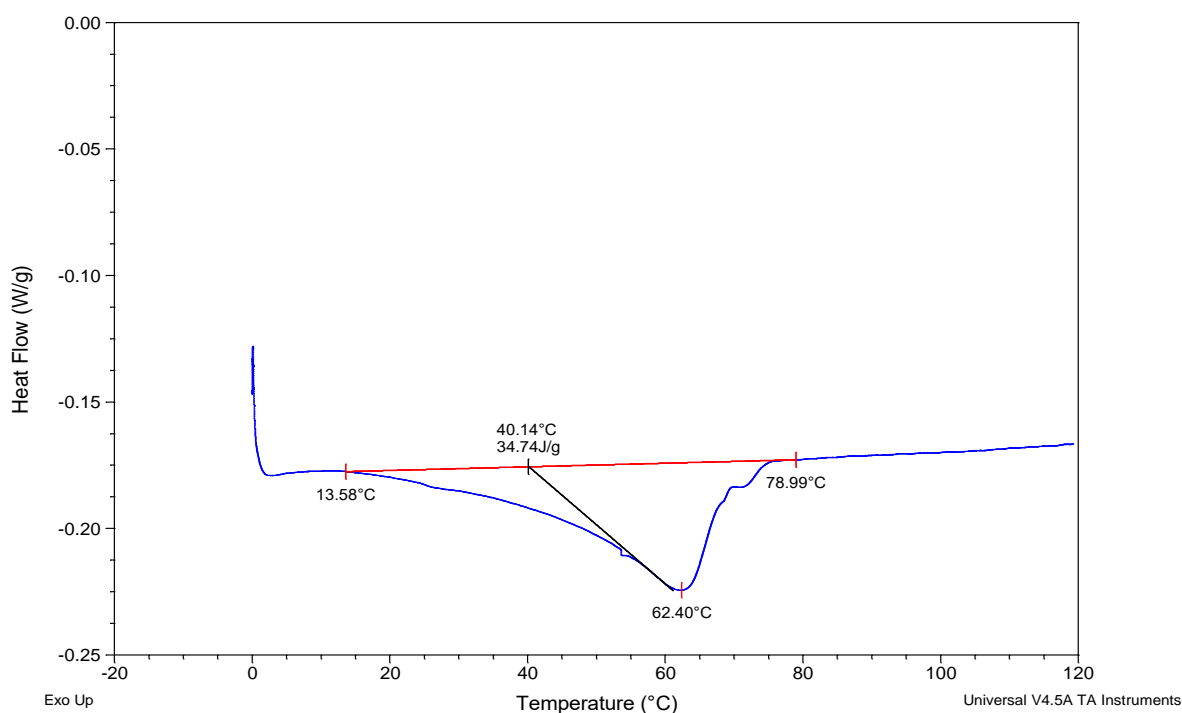


Figura 14: Termogramma: picco di fusione dell'ascorbile oleato “crudo”

Il campione è stato mantenuto a 0 °C per 5 minuti e poi riscaldato fino a 120 °C con una velocità di 2 °C/min. Secondo la convenzione riportata nel capitolo 3, è possibile osservare una temperatura di fusione di 62.40 °C, con un  $\Delta H_{fus}$  di 34.74 J/g. Data l'ampiezza del picco e il distacco della temperatura di fusione misurata con quella riportata in letteratura, (83-84 °C secondo [Viklund 2003]), si è ipotizzata la presenza di acqua nel campione derivante dal work-up acquoso. La liofilizzazione del campione per 24 ore a -55 °C e 30mTorr non ha però comportato alcun miglioramento significativo del picco di fusione. La presenza di una diversa struttura cristallina o la coesistenza di più strutture cristalline (polimorfiche) potrebbe spiegare la differenza di *melting point* e l'inattesa forma del picco. Queste ultime considerazioni verranno discusse nei paragrafi riservati alle misure di FT-IR e SAXS.

### 3.1.4 Misure SAXS

Dall'analisi del profilo SAXS per il solido è possibile concludere che l'ascorbile oleato è organizzato in una struttura di tipo lamellare [Figura 15].

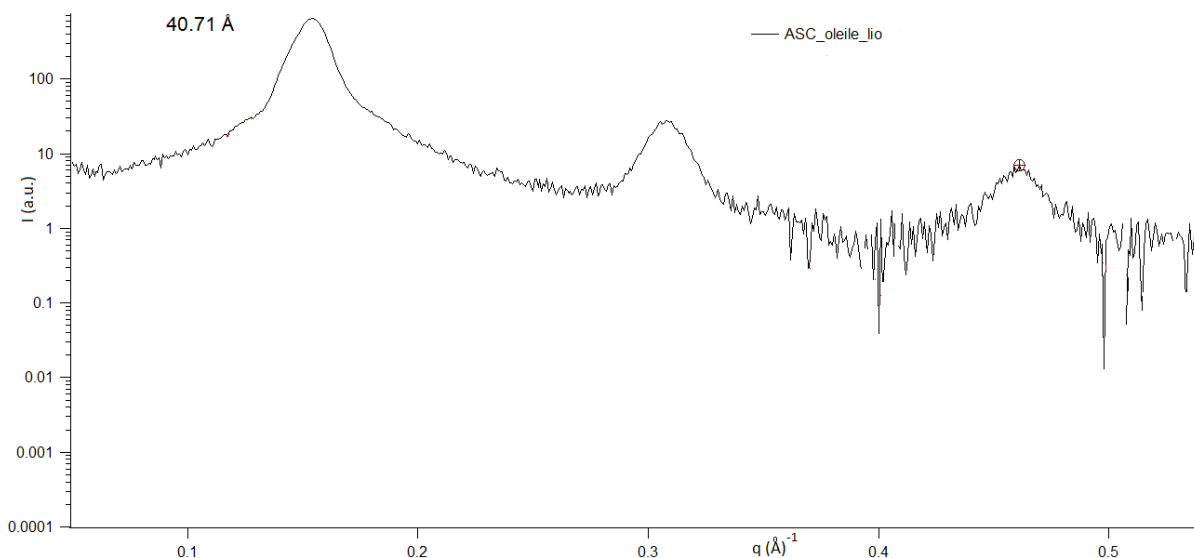


Figura 15: Profilo SAXS dell'ascorbile oleato liofilizzato

Si notano i tre picchi in corrispondenza del valore del vettore di *scattering*  $q$  pari a  $0.154 \text{ \AA}^{-1}$ ,  $0.308 \text{ \AA}^{-1}$ ,  $0.463 \text{ \AA}^{-1}$  relativi rispettivamente alla prima, seconda e terza riflessione della lamella.

Tramite la relazione  $q=2\pi/d$  si può ricavare uno spessore della lamella pari a  $d$  di  $40.71 \text{ \AA}$ , compatibile con le dimensioni della molecola.

Da questi dati sembrerebbe dunque esclusa la coesistenza di più forme polimorfe.

Stimando la lunghezza delle teste polari ( $l_p$ ) circa  $8.01 \text{ \AA}$  e la lunghezza delle code ( $l_c$ ) circa  $20.43 \text{ \AA}$  tramite misura col programma ChemBio3DUltra, è possibile rendere un'idea grossolana del grado di interdigitazione G.I. % delle code, assumendo che l'unità strutturale ripetuta ( $d$ ) sia composta nell'ordine da una testa, due code e un'altra testa [Figura 16].

$$G.I. (\%) = 100 \cdot \frac{d - 2l_p}{2l_c} \approx 60.4\%$$

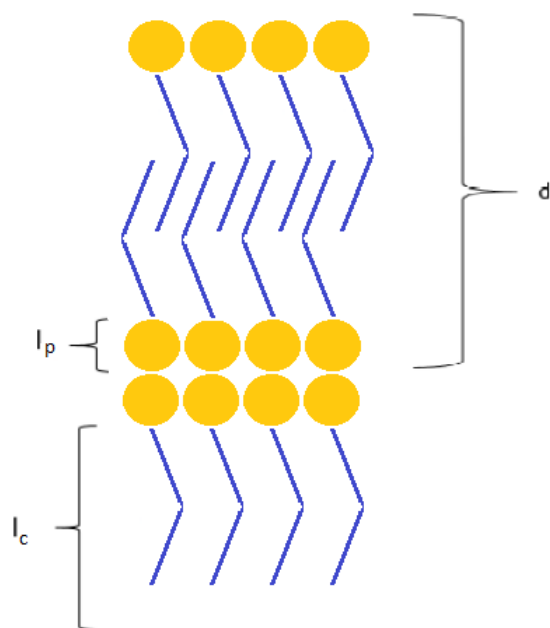


Figura 16: Schema ipotetico della struttura del solido. Questo è uno dei modelli più semplici che sono stati ipotizzati; è anche possibile che le molecole siano disposte in modo da essere più inclinate. Sembra invece esclusa l'ipotesi che gli strati siano organizzati secondo lo schema invertito di coda-testa-testa-coda.

### 3.1.5 Misure di FT-IR

Sul campione ottenuto dalla sintesi con work-up acquoso sono state eseguite misure di FT-IR, effettuate anche sullo stesso campione dopo liofilizzazione.

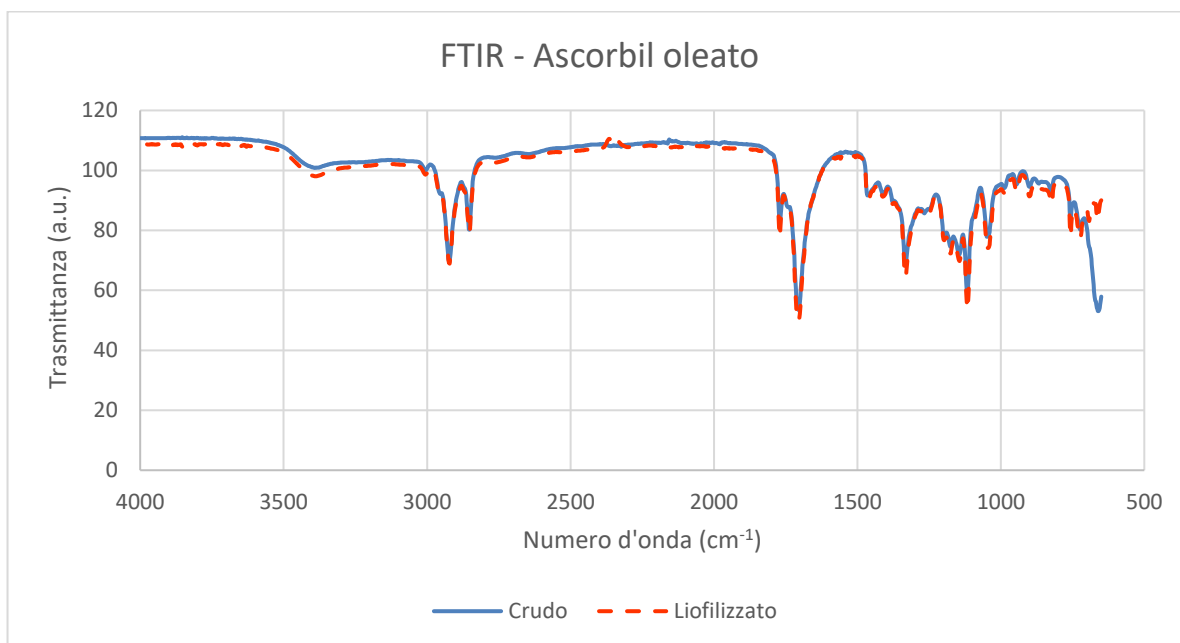


Figura 17: FT-IR dell'ascorbile oleato (curdo e liofilizzato)

FT-IR: 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  (OH stretching), 2800-2950  $\text{cm}^{-1}$  (CH stretching  $\text{sp}^3$ ), 1770  $\text{cm}^{-1}$  (C=O stretching), 1690  $\text{cm}^{-1}$  (C=O e C=C stretching bande slargate), 1400  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub> *umbrella mode*), 1100-1190  $\text{cm}^{-1}$  (C-O stretching).

La Figura 17 riporta a confronto lo spettro FT-IR del prodotto di sintesi con lo stesso prodotto liofilizzato.

Dallo spettro FT-IR si possono osservare i segnali di stretching C=O e C-H. Invece il segnale O-H appare in forma meno intensa rispetto al tipico segnale slargato e intenso dovuto allo stretching di questo legame. Probabilmente questo attenuamento della banda si deve al fatto che il campione solido su cui si è effettuata la misura ha limitate possibilità di formare legami ad idrogeno. Infatti i due OH in posizione 2 e 3, essendo coniugati nella struttura enediolica, sono poco disponibili a formare legami ad idrogeno. Rimane pertanto solamente l'OH in posizione 5. Oltretutto a causa del doppio legame *cis* le teste polari potrebbero trovarsi più lontane tra loro, e questo va a detrimento dei legami a idrogeno intermolecolari.

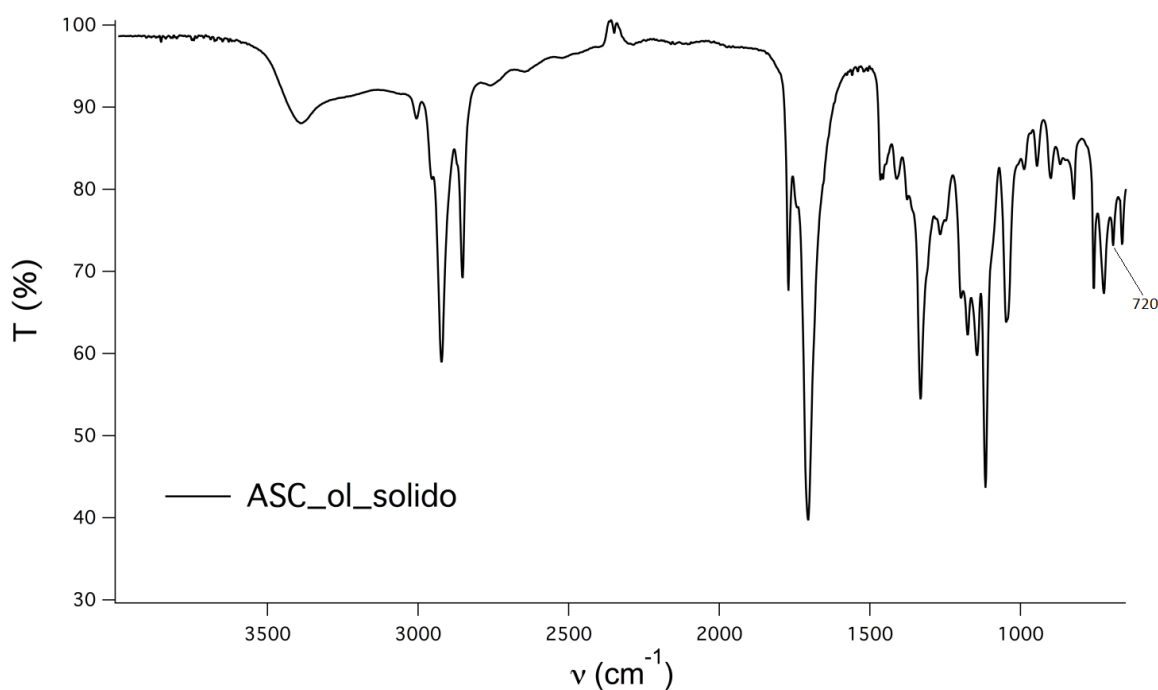


Figura 18: FT-IR dell'ascorbile oleato liofilizzato

Esaminando i segnali dello spettro FT-IR e il profilo WAXS è possibile determinare la struttura cristallina delle catene idrofobiche. Infatti, strutture diverse danno segnali caratteristici nella regione attorno a 4 Å per la curva WAXS e attorno ai 720 cm<sup>-1</sup> nello spettro FT-IR.

Da precedenti studi è noto che gli alcani a lunga catena possono formare delle unità strutturali ripetute, o celle cristalline, di forme diverse: esagonale ( $\alpha_H$ ), ortorombica ( $\beta_O$ ), triclina ( $\beta_T$ ) e monoclinica ( $\beta_M$ ), che si riconoscono dai picchi tra 750 e 710 cm<sup>-1</sup> dello spettro FT-IR e sono dovuti al *rocking* dei CH<sub>2</sub> della catena idrofobica [Bucci 2015].

In Figura 19 si riportano alcuni esempi di elementi strutturali geometrici.

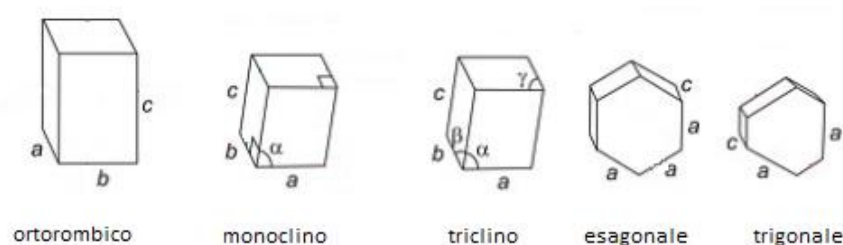


Figura 19: Esempi di elementi strutturali

L'impaccamento di tipo ortorombico produce un doppio assorbimento a 719 e 727 cm<sup>-1</sup>, mentre le forme esagonale e triclina generano un'unica banda, rispettivamente a 720 e 717 cm<sup>-1</sup> [Venturini 2014].

In Figura 18 è riportato lo spettro FT-IR del solido, in cui è stato messo in evidenza il segnale a 720 cm<sup>-1</sup>, che potrebbe quindi indicare un impaccamento esagonale del solido. Vale la pena notare che tra le possibili strutture cristalline, la esagonale è quella meno compatta, in accordo con la presenza del doppio legame *cis* che potrebbe ostacolare l'avvicinamento delle molecole [Martin 1958].

### 3.1.6 Misure di WAXS

Come precedentemente accennato, anche il profilo WAXS degli idrocarburi a lunga catena dipende dal tipo di cella cristallina. Nello specifico, il picco a 4.2 Å è associato ad una struttura esagonale; la struttura ortorombica è evidenziata da due picchi a 4.2 e 3.8 Å e la triclina genera tre diffrazioni a 4.5 3.8 e 3.6 Å.

Vengono riportati in Tabella 1 i picchi principali e in Figura 20 il profilo WAXS del solido.

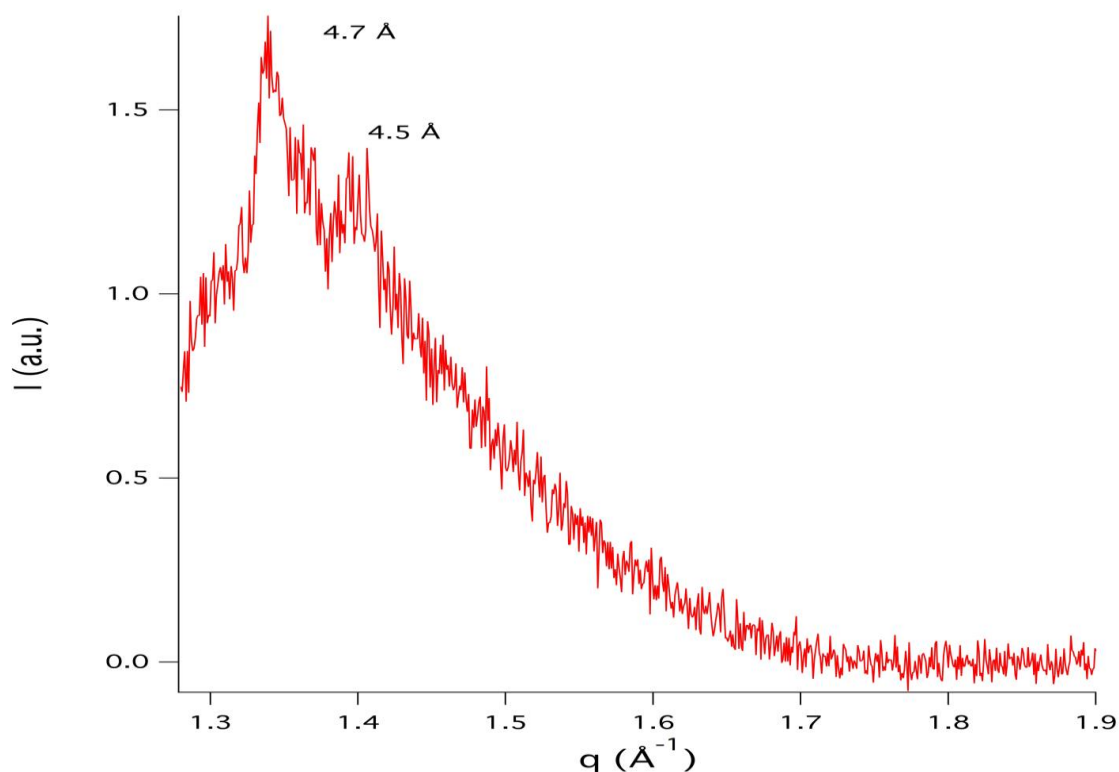


Figura 20: Profilo WAXS del solido

Tabella 1

<b>d (Å)</b>	<b>q (Å<sup>-1</sup>)</b>
4.7	1.34
4.5	1.39

Purtroppo la misura WAXS ottenuta non è molto definita, indicando un parziale disordine a corto raggio. I risultati ottenuti concordano comunque con la presenza di una struttura esagonale delle code idrofobiche.

### 3.2 Studio degli aggregati in acqua

Misure DSC e SAXS sono state eseguite su dispersioni acquose di ascorbile oleato contenenti diverse percentuali di tensioattivo. I campioni analizzati sono stati preparati mescolando le quantità richieste di tensioattivo e acqua ed omogeneizzati tramite tre cicli



di *annealing*. L'aspetto dei campioni prelevati dal frigorifero era quello di un "gel" bianco che si trasforma in una soluzione trasparente per riscaldamento.

### 3.2.1 Misure DSC

Le dispersioni acquose analizzate contengono una percentuale di tensioattivo in acqua di 5, 10, 20 e 40 %. Tutti i campioni sono stati preparati al di sopra della temperatura di transizione e sono state eseguite misure calorimetriche seguendo due diverse procedure. Dalle misure svolte con la procedura 1, cioè quella che prevedeva di equilibrare il campione a 0 °C per 30 minuti e successivamente scaldare ad un *rate* di 2 °C/min fino a 60 °C, è stato possibile individuare in tutti i termogrammi un'unica transizione con temperatura di picco attestata attorno ai 13 °C. Dalle misure SAXS svolte in seguito è stato possibile affermare che tali transizioni corrispondono ad un passaggio di fase da *coagel* a micelle. In Figura 21 è stato riportato un esempio di termogramma ottenuto con questa procedura.

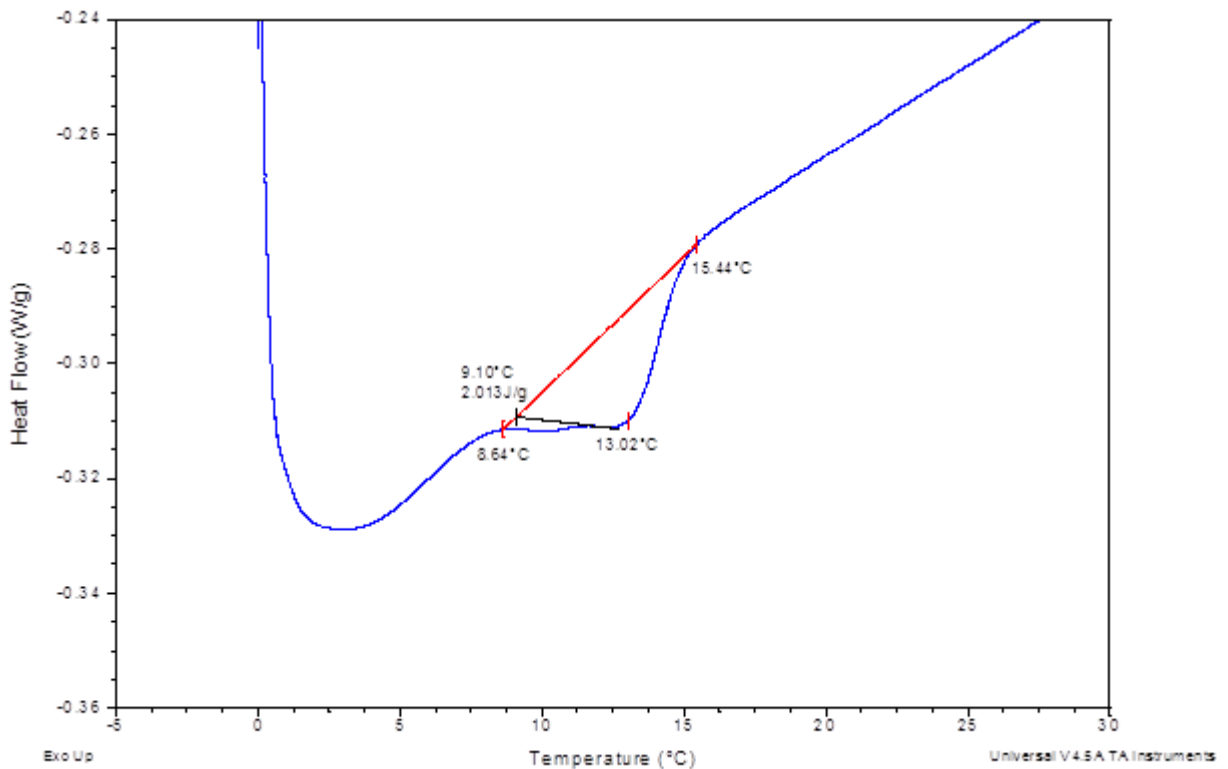


Figura 21: Termogramma del campione al 20% ottenuto con la prima procedura di solo riscaldamento (picco di transizione coagel-micelle)

Con la procedura 2, che prevedeva di equilibrare i campioni a 0 °C per 5 minuti per poi raffreddare fino a -90 °C e scaldare fino a 60 °C ad un *rate* di 2 °C/min, sono state osservate tre transizioni. In particolare con questo secondo metodo è stato possibile apprezzare la fusione dell'acqua libera [Figura 22] e la transizione inversa (*micelle-coagel*) a quella osservata nella prima procedura, attestata attorno a 6 °C [Figura23].

Le transizioni *coagel*-micelle visibili nel riscaldamento sono analoghe a quelle viste con la prima procedura, con una temperatura di transizione di circa 13 °C [Figura 24].

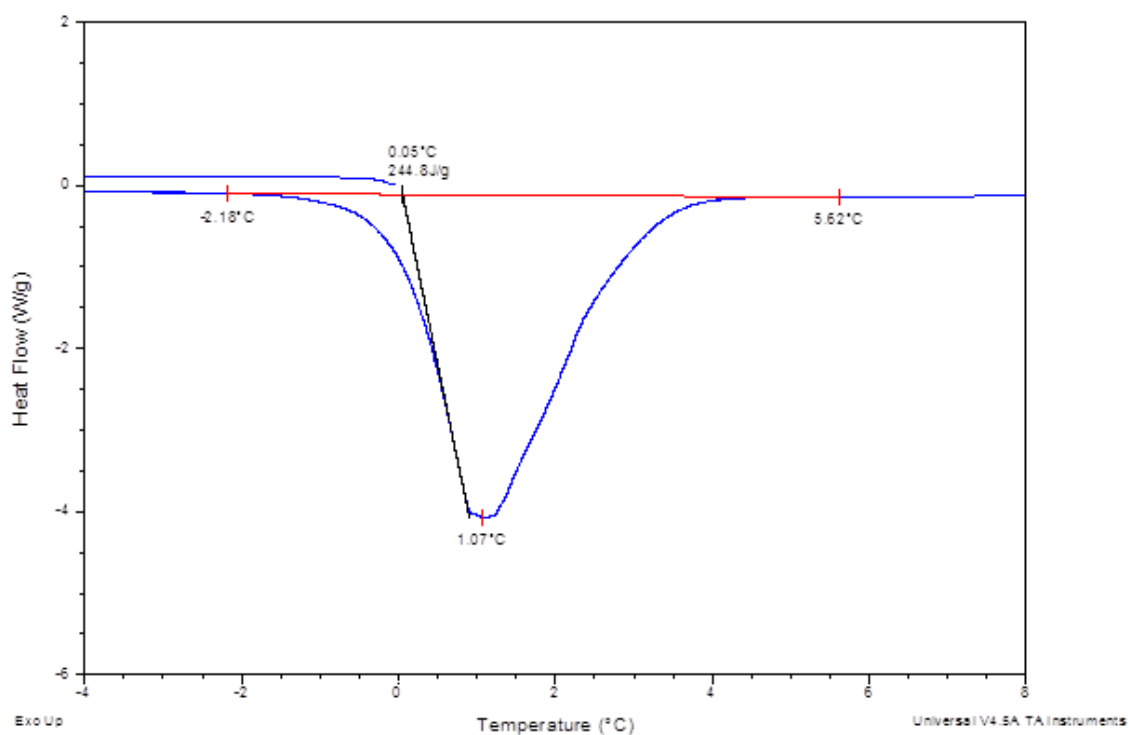


Figura 22: Picco di fusione dell'acqua libera per un campione al 20%

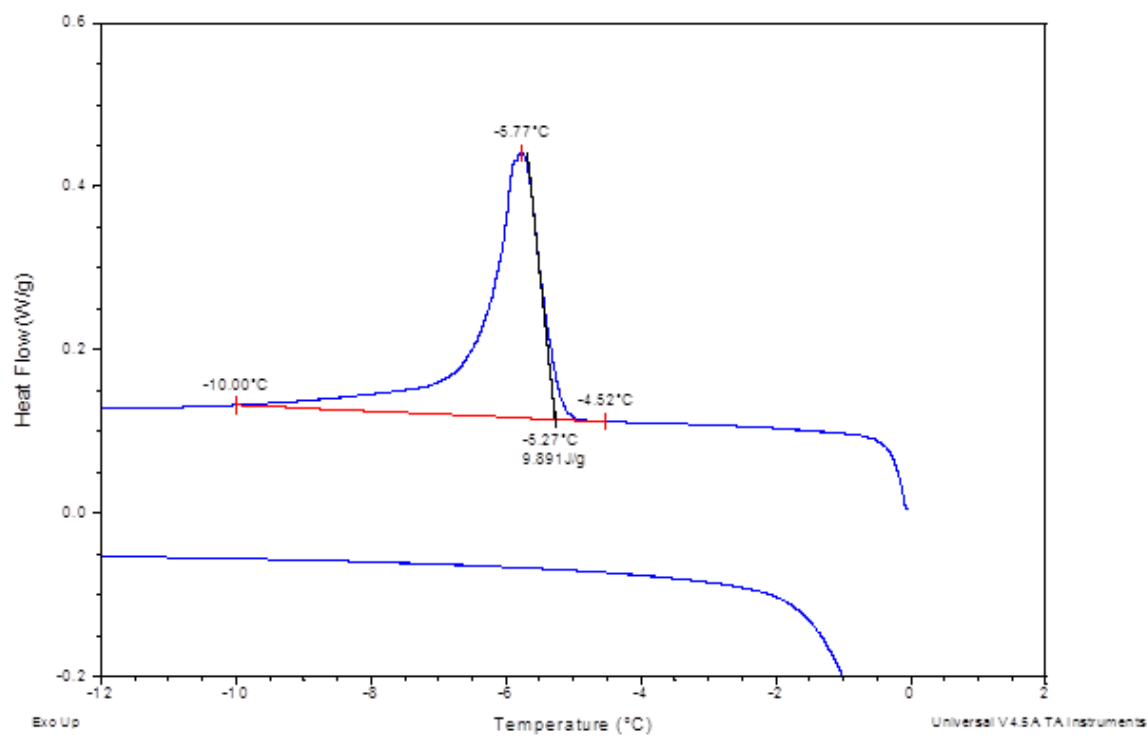


Figura 23: Termogramma che mostra la transizione micelle-coagel visibile col raffreddamento di un campione al 20%

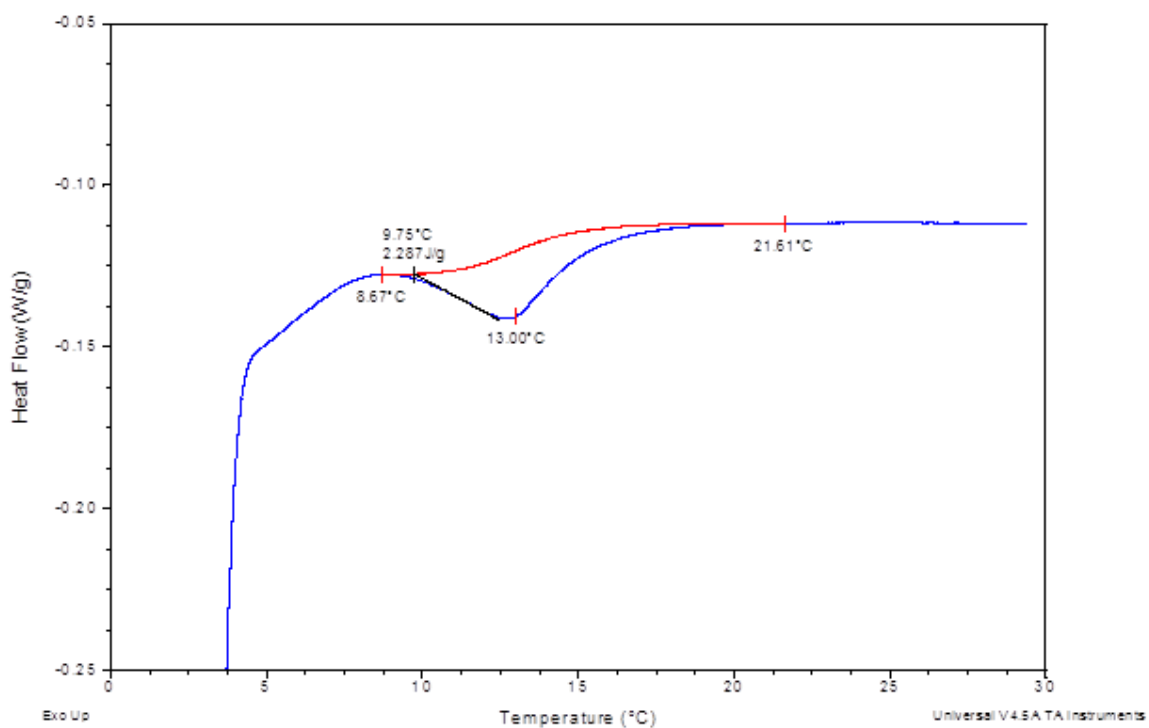


Figura 24: Termogramma che mostra la transizione coagel-micelle ottenuta con la seconda procedura per un campione al 20%

Mettendo in grafico i valori di  $\Delta H_{\text{trans}}$  in funzione della percentuale in peso P (w/w%) si osserva, sia per le curve di raffreddamento che per quelle in riscaldamento, un aumento lineare di  $\Delta H_{\text{trans}}$  all'aumentare della concentrazione di tensioattivo. In Figura 25, 26 e 27 vengono riportati i valori di  $\Delta H_{\text{trans}}$  in funzione di P rispettivamente per la transizione micelle-coagel ( $\Delta H_{\text{raff}}$  rampa di raffreddamento, procedura 2) e per la transizione coagel-micelle ( $\Delta H_{\text{risc1}}$  e  $\Delta H_{\text{risc2}}$  rampa di riscaldamento, procedura 1 e 2).

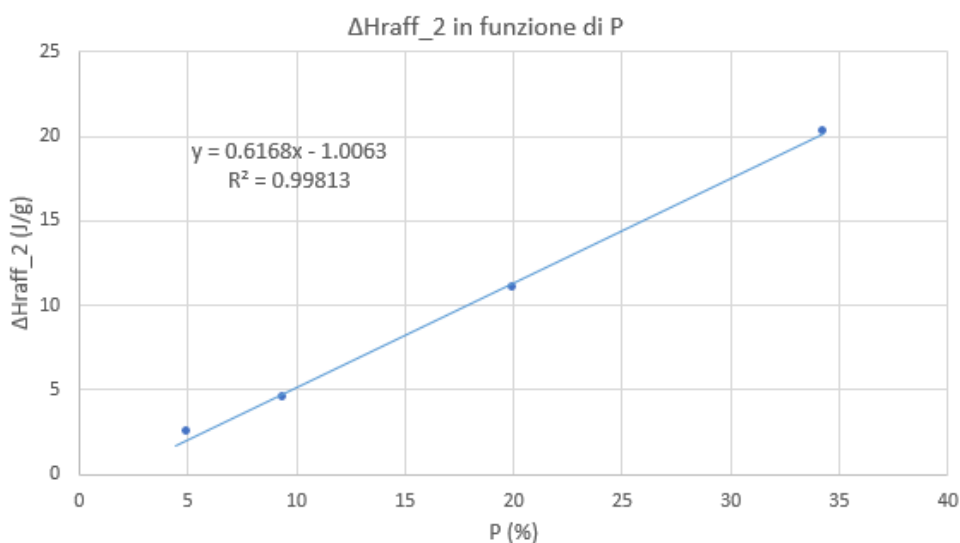


Figura 25:  $\Delta H$  relativo alle transizioni individuate dal raffreddamento in funzione della concentrazione di tensioattivo

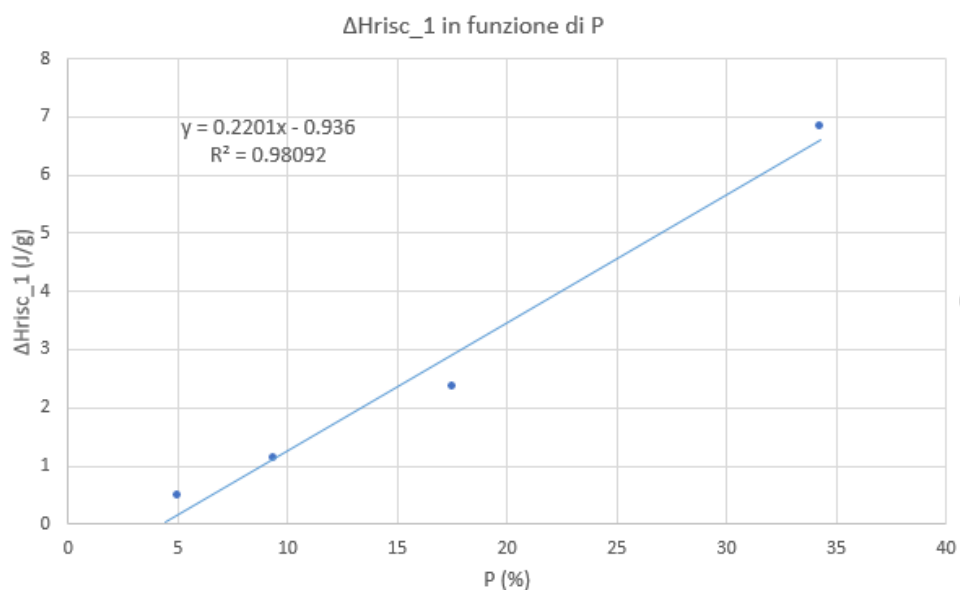


Figura 26:  $\Delta H$  relativo alle transizioni individuate dal riscaldamento con la prima procedura

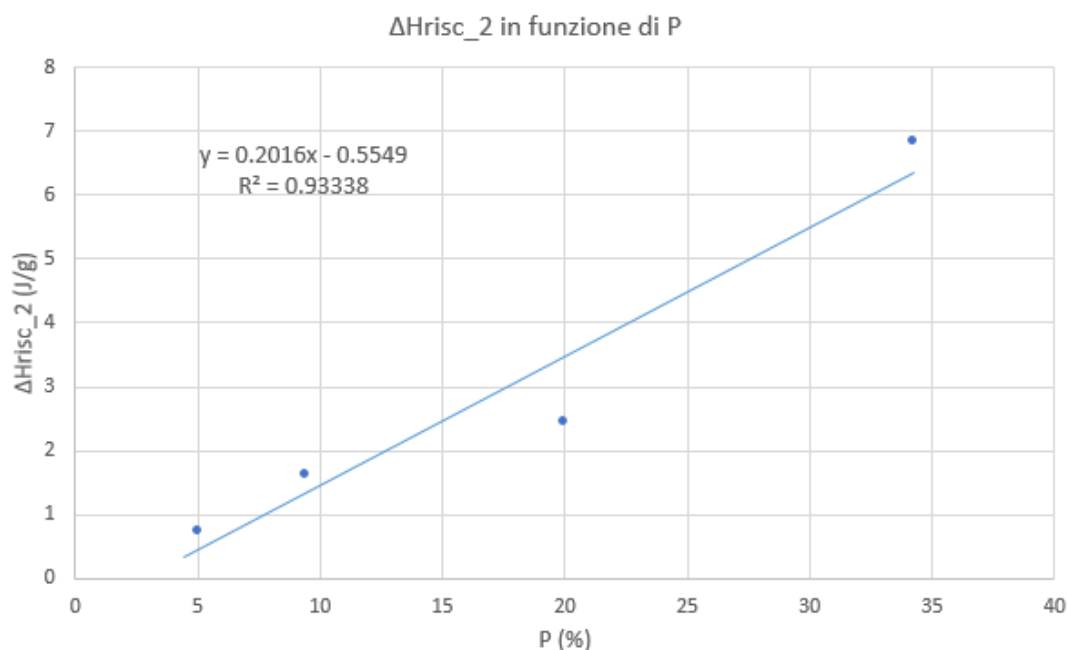


Figura 27:  $\Delta H$  relativo alle transizioni individuate dal riscaldamento con la seconda procedura

Il picco endotermico attorno a 0 °C riportato in Figura 22 è attribuibile alla fusione dell'acqua *bulk*, ovvero un'acqua libera che non risente della presenza del tensioattivo. Dal confronto dell'area di questo picco con quella di un campione di sola acqua è possibile ottenere la percentuale di acqua fortemente legata al tensioattivo e il numero di molecole di acqua legate per testa polare. Questo calcolo si basa sull'assunzione di una struttura lamellare delle dispersioni acquose in fase condensata, dove i bistrati di tensioattivo sono separati da sottili strati di acqua legata alle teste polari. In Figura 28 è stata riportata una rappresentazione schematizzata di questo modello teorico. Vale la pena tenere presente che, data la forma estremamente ingombrante della catena idrofobica dell'ascorbile oleato determinata dall'insaturazione in *cis* sul carbonio 9, l'impaccamento dei campioni analizzati presenterà un disordine maggiore di quello riportato in figura.

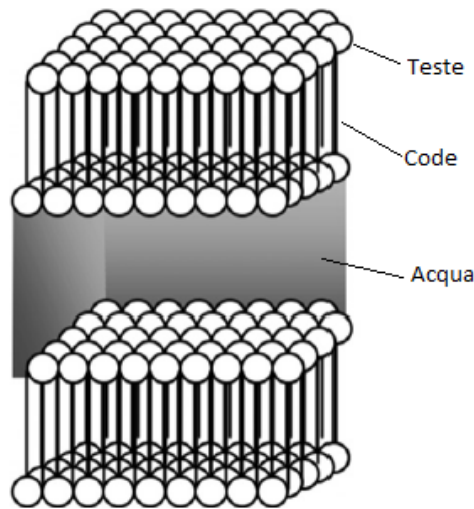


Figura 28: Modello teorico approssimato dei coagel dell'ascorbile oleato

I valori di acqua fortemente legata, espressi come massa percentuale  $W_b$  (*bound water*) sono stati calcolati con la formula:

$$(100 - P) \frac{(\Delta H_{acqua} - \Delta H_{exp})}{\Delta H_{acqua}}$$

in cui  $\Delta H_{acqua}$  è il calore di fusione dell'acqua pura misurato con un campione di sola acqua e pari a 348.35 J/g.  $\Delta H_{exp}$  è l'entalpia di fusione dell'acqua libera attorno a 0 °C e P (w/w%) è la percentuale in peso del tensioattivo nel campione.

I  $\Delta H$  devono essere espressi in J/g<sub>acqua</sub>; è possibile convertire il dato del termogramma da J/g<sub>campione</sub> a J/g<sub>acqua</sub> attraverso la formula  $\Delta H_{exp} = (100 * \Delta H_{termogramma}) / (100 - P)$ .

Considerando il modello teorico sopra citato, si può fare un calcolo di quante molecole di acqua si possono considerare fortemente legate per una singola testa polare di tensioattivo, secondo la formula:

$$N_b = \frac{M_n W_b}{M_{acqua} P}$$

In cui  $M_n$  e  $M_{acqua}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'ascorbile oleato, 440.56 Da, e dell'acqua, 18.02 Da.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 2:

Tabella 2

P (w/w%)	$\Delta H_{\text{exp}}$ (J/g <sub>acqua</sub> )	$W_b$	$N_b$
4.43	329.60	5.14	28
19.98	314.42	7.79	10
34.25	305.55	8.08	6

In Figura 29 è stato riportato l'andamento di  $W_b$  in funzione di P. Analogamente a quanto visto dai precedenti studi sugli ascorbili a catena satura, [Ambrosi 2004], al di sopra di una certa concentrazione, che in questo caso è circa attorno al 20%, l'andamento lineare raggiunge un plateau.

In Figura 30 è stato riportato anche l'andamento di  $N_b$  in funzione di P; si osservi che il numero di molecole di acqua legata per testa di tensioattivo diminuisce all'aumentare della concentrazione. Anche questo è in accordo con gli studi condotti sugli ASCn a catena satura.

Vale la pena notare, che sebbene, come già detto, i risultati concordino con quelli precedentemente ottenuti su composti analoghi, in questo caso i valori potrebbero non essere totalmente esatti data la presenza di più strutture lamellari idratate, come risulta dalle misure di SAXS discusse nel prossimo paragrafo.

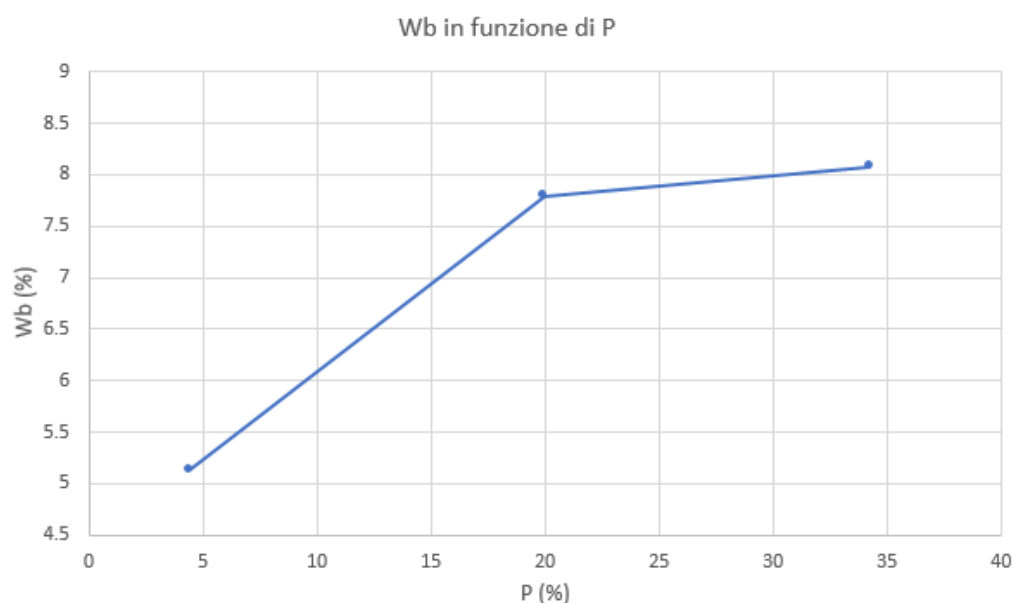


Figura 29: Andamento di  $W_b$  in funzione di P

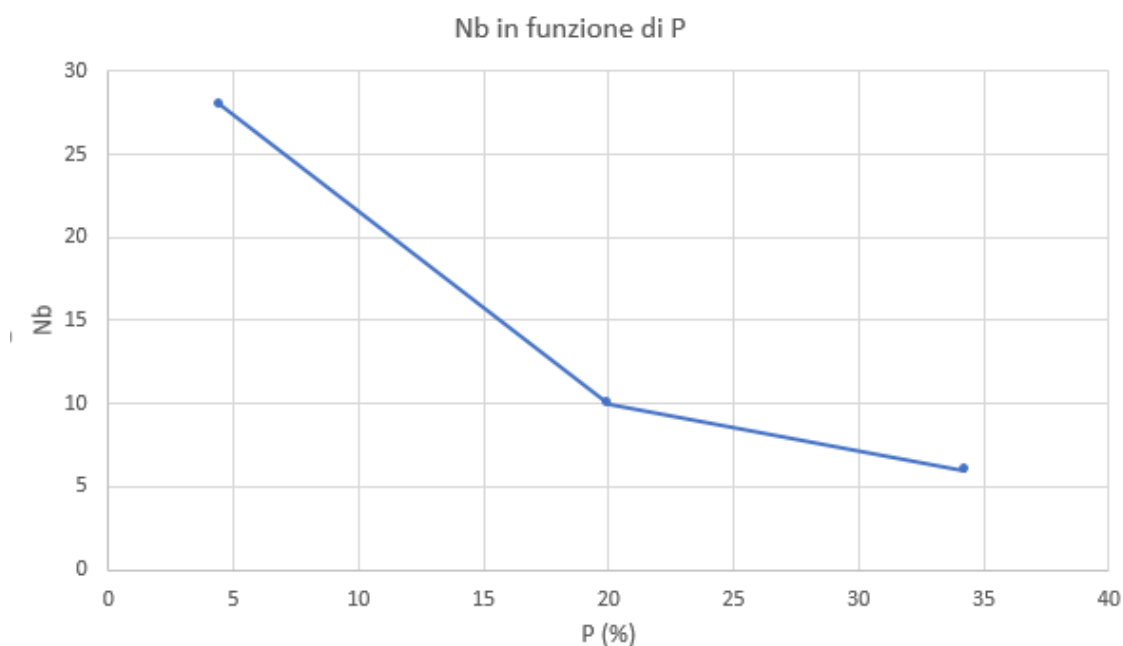


Figura 30: Andamento di Nb in funzione di P

### 3.2.2 Misure di SAXS

Le dispersioni acquose di ascorbile oleato con contenuti in solido pari a 20 e 40% in peso sono state esaminate tramite *scattering* di raggi X alla temperatura di 4 °C e di 20 °C, cioè al di sotto ed al di sopra della transizione visibile ad occhio nudo ed individuata mediante DSC, proprio allo scopo di capire di che tipo di transizione si trattasse.

In Figura 31 e 32 vengono riportate le curve SAXS dei campioni al 20 e al 40%. In entrambe le curve si osservano due serie di picchi; la prima con tre riflessioni ed un  $d$  corrispondente ad un valore di 64.7 Å, e la seconda con 4 riflessioni e un  $d$  di 50.1 Å. Queste due serie di picchi indicano la presenza in entrambi i *coagel* di due strutture lamellari con diverso spessore. Inoltre in entrambe le curve è visibile un picco corrispondente ad uno spessore  $d$  di 37.1 Å che potrebbe indicare la presenza di un residuo di solido che non è riuscito ad omogeneizzarsi. In Tabella 3 vengono riportati i valori di  $q$  e  $d$  per i campioni 20 e 40%.



Tabella 3

SERIE 1		
n° riflessione	d (Å)	q(Å <sup>-1</sup> )
1	64.7	0.0971
2	64.7	0.1941
3	64.7	0.291
SERIE 2		
1	50.1	0.125
2	50.1	0.250
3	50.1	0.376
4	50.1	0.501
PICCO SOLITARIO		
1	37.1	0.169

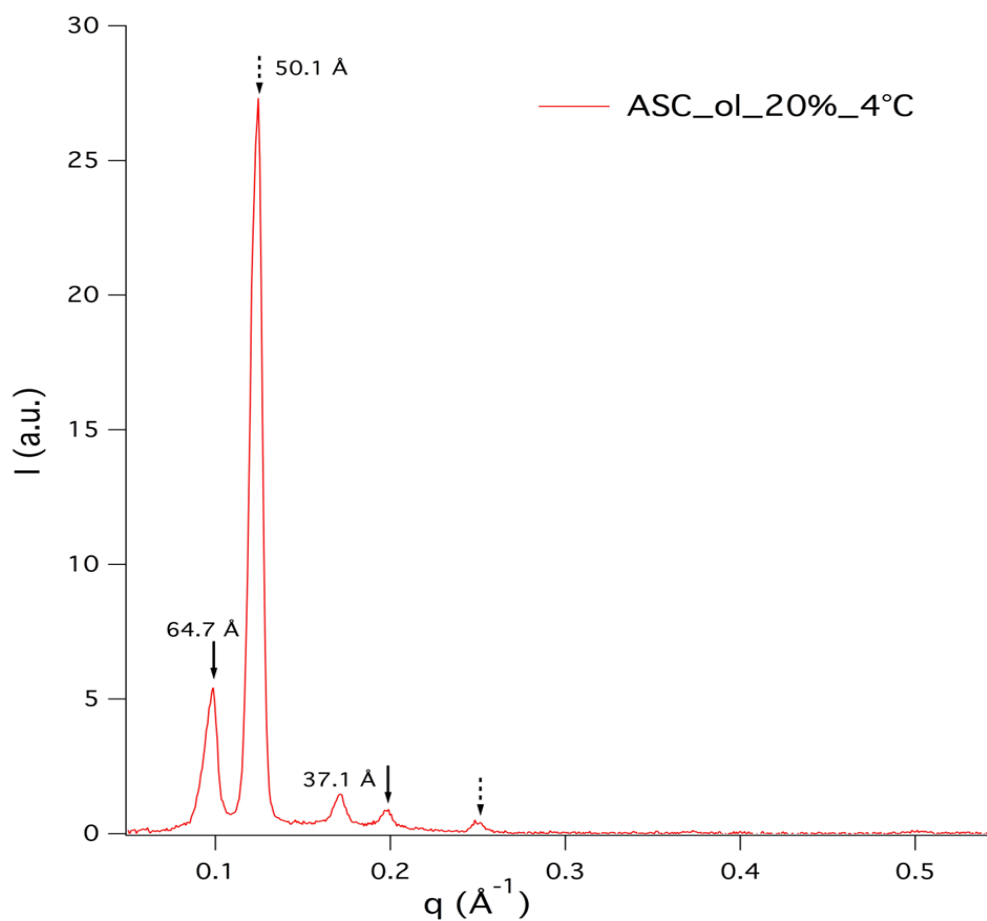


Figura 31: Curva SAXS del campione al 20% a 4 °C

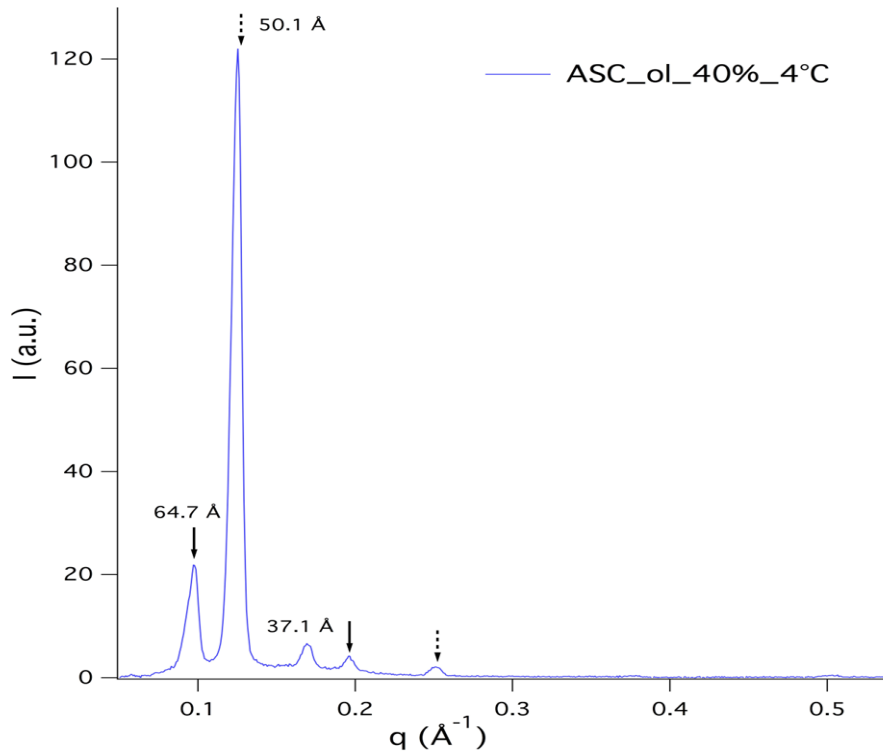


Figura 32: Curva SAXS del campione al 40% a 4 °C

I campioni sono stati analizzati anche al di sopra della temperatura di transizione, ovvero a 20 °C. Le curve ottenute sono riportate in Figura 33 e 34 insieme alle curve di *fitting*.

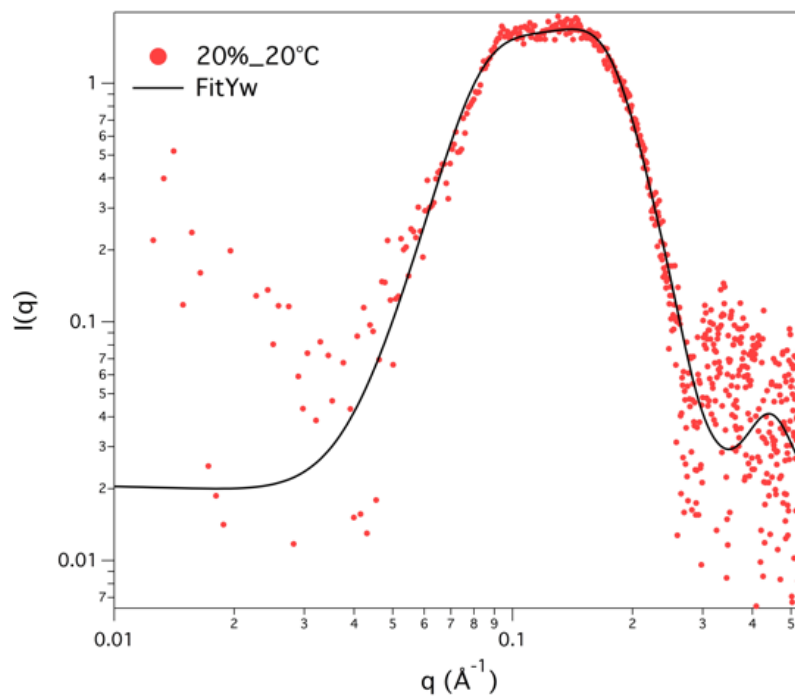


Figura 33: Curva SAXS per il campione al 20% alla temperatura di 20 °C

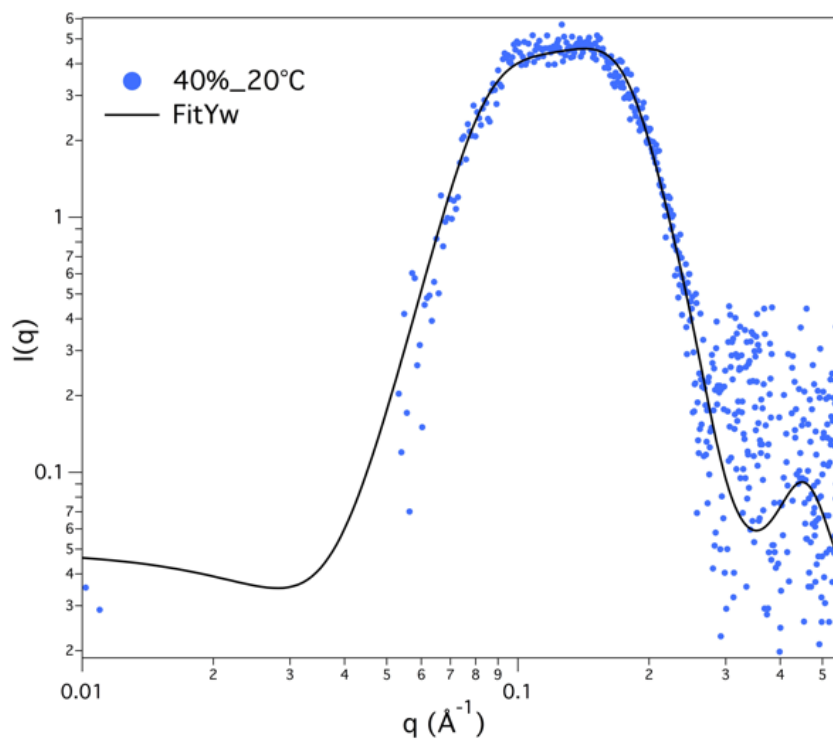


Figura 34: Curva SAXS per il campione al 40% alla temperatura di 20 °C

Le curve ottenute sono state fittate assumendo la presenza di micelle cariche di forma ellissoidale prolata di tipo *core-shell* [Figura 35]. Nel grafico del campione al 20% si nota una lieve risalita a sinistra probabilmente imputabile alla presenza di solido rimasto indisciolto.

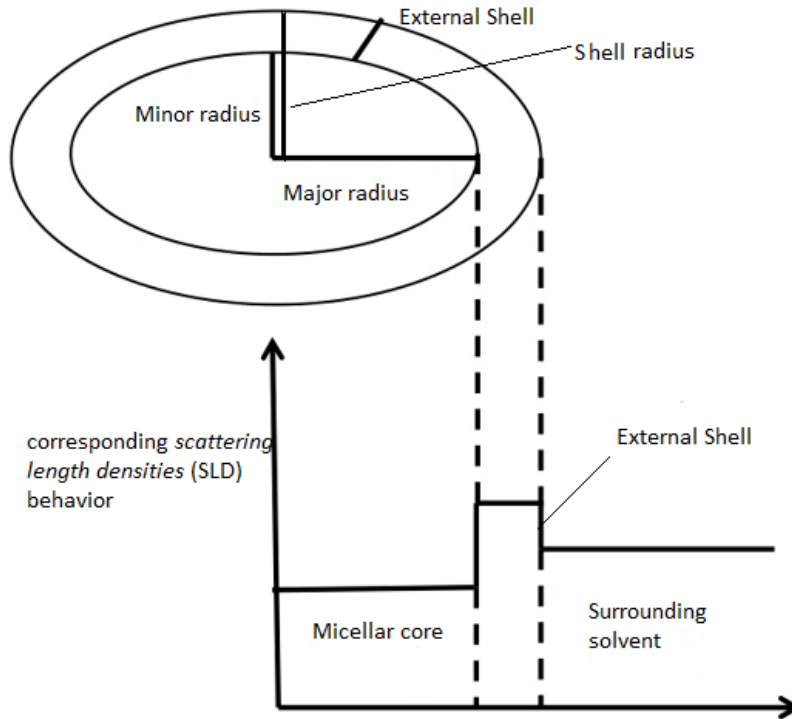


Figura 35: Schematizzazione di una micella dalla forma ellissoidale prolata di tipo core-shell

Dato il caso preso in esame, ovvero quello di un tensioattivo in acqua, il *core*, cioè il nucleo delle micelle, sarà composto dalle code idrofobiche, mentre lo *shell* esterno, *external shell* in figura, sarà formato dalle teste polari di vitamina C a contatto con l'acqua. L'equazione utilizzata per il *fitting* di  $I(q)$ , come anticipato nel capitolo 2, contiene un contributo che tiene conto della forma delle particelle,  $P(q)$ , che in questo caso è appunto un ellissoide prolato con struttura *core/shell* (*Prolate Core-Shell Ellipsoid*) ed è ottenuto da una media su tutte le possibili orientazioni dell'ellissoide. Il fattore di forma è normalizzato dal volume complessivo della particella. L'equazione utilizzata è la seguente:

$$P(q) = \frac{scale}{V} \int_0^1 |F(q, r_{min}, r_{maj}, \alpha)|^2 d\alpha + bkg$$

$$F(q, r_{min}, r_{maj}, \alpha) = V(r_{min}, r_{maj})(\Delta\rho)3j_1(u)/u$$

$$u = q[r_{maj}^2\alpha^2 + r_{min}^2(1 - \alpha^2)]^{1/2}$$

$$V(r_{min}, r_{maj}) = (4\pi/3) r_{maj}r_{min}^2$$

$$j_1(x) = (\sin x - x \cos x)/x^2$$

Nell'equazione  $F(q, r_{min}, r_{maj}, \alpha)$  è l'estensione di *scattering* di una particella singola e l'integrale in  $d\alpha$  rappresenta la media del suo modulo quadro sulle orientazioni. Le variabili da prendere in considerazione relative a  $P(q)$  sono: il fattore di scala (*scale*), i raggi di *core* e di *shell*, le SLD di *core*, *shell* e solvente e il *background*.

Nel modello considerato, i fattori di scala e di contrasto sono correlati. Il contrasto è dato da:

$$\Delta\rho = \text{SLD}(\textit{core}) - \text{SLD}(\textit{shell}) \text{ o } \text{SLD}(\textit{shell} - \textit{solvente})$$

Un altro contributo importante contenuto in  $I(q)$  è quello di  $S(q)$ , cioè il fattore di struttura, o *Screened Coulomb Structure factor*, per un sistema di oggetti ellissoidali carichi in un mezzo dielettrico. Quando è combinato con un fattore di forma appropriato, esso permette di includere nell'equazione gli effetti di interferenza dovuti alla repulsione coulombiana schermata tra particelle cariche.

Le variabili da tenere in considerazione per questo contributo sono la carica, la temperatura, fissata qua a 293 K, la concentrazione del sale monovalente, anche questa fissata e ottenuta tramite una stima approssimativa considerando la pKa dell'OH più acido della testa polare e assumendo che la dissociazione non vari in fase condensata e la costante dielettrica del solvente, che in questo caso è quella dell'acqua a 293 K.

I parametri strutturali estratti dai *fitting* sono il *major core radius*, il *minor core radius* e lo *shell radius* (*minor core radius* + *external shell*, vedi Figura 35). I valori ottenuti sono riportati in Tabella 4 insieme ai valori di SLD utilizzati, la carica ottenuta dal *fitting*, la concentrazione del sale monovalente, la temperatura e la costante dielettrica dell'acqua a 293 K.

Tabella 4

Coefficient	34.25%	20.23%
major core radius (Å)	20.3 ± 0.5	19.1±0.5
minor core radius (Å)	12.1±0.4	12.3±0.4
shell radius (Å)	20.3±0.2	21.0±0.2
SLD core (A <sup>-2</sup> )	7·10 <sup>-6</sup>	7·10 <sup>-6</sup>
SLD shell (A <sup>-2</sup> )	9.66·10 <sup>-6</sup>	9.64·10 <sup>-6</sup>
SLD solvent (A <sup>-2</sup> )	9.46·10 <sup>-6</sup>	9.46·10 <sup>-6</sup>
charge	6.1±3.1	2.8±1.5
monovalent salt (M)	0.0075	0.005
Temperature (K)	293	293
Solvent dielectric const.	80.36	80.36

I risultati ottenuti sono compatibili con le dimensioni della molecola; infatti, ricordando che le dimensioni della molecola sono state stimate 8.01 Å per le teste polari e circa 20.43 Å per le code idrofobiche, si osserva che i dati ottenuti per il *major core radius*, 20.3 e 19.1 Å, corrispondono proprio alla misura della catena non interdigitata. Dai dati di 20.3 e 21 Å ottenuti per lo *shell radius*, che ricordiamo essere composto dal raggio minore della micella ellissoidale sommato allo *shell* esterno, si vede che, sottraendo da tali valori i 12 Å corrispondenti al *minor core radius*, si ottiene proprio un valore intorno ad 8 Å, che è appunto corrispondente alla lunghezza stimata per la testa polare.

### 3.3 Test DPPH

È stata a tal fine preparata una soluzione 10<sup>-4</sup> M di DPPH in metanolo e una soluzione 10<sup>-3</sup> M di ascorbile oleato. Si è quindi svolto il test utilizzando prima una stechiometria 1:1 di DPPH e ascorbile oleato e poi un rapporto di 1:0.5 equivalenti, in modo da osservare la prima e la seconda cinetica dell'ascorbile in relazione ai due OH presenti in posizione 2 e 3. Il test DPPH è stato quindi messo a confronto con un test analogo svolto sulla vitamina C, per osservare eventuali cambiamenti del potere antiossidante tra acido L-ascorbico e il suo estere con acido oleico. Si è verificato che il potere antiossidante si è conservato;

entrambi gli OH in 2,3 del prodotto ottenuto sono liberi e attivi. Questo test qualitativo, in cui vengono osservati i tempi di sbiancamento della soluzione di DPPH che reagisce con gli antiossidanti, è stato utilizzato nell'ottica di condurre un'analisi preliminare volta a valutare in maniera comparativa l'attività antiossidante dell'ascorbil oleato rispetto all'acido ascorbico. Il test è stato svolto anche sull'acido oleico, del quale è stata preparata una soluzione in metanolo a concentrazione tripla rispetto a quella dell'ascorbile oleato. Su questo prodotto non è stato osservato una decolorazione apprezzabile della soluzione di DPPH.

## Capitolo 4: Conclusioni

Da questo lavoro di tesi è emerso che l'ascorbile oleato è una molecola facilmente ottenibile con una procedura di sintesi enzimatica che comporta il minimo impatto ambientale. Maggiori difficoltà sono state riscontrate nella sua purificazione, che comunque è stata effettuata permettendo di ottenere il prodotto in buona resa e con un elevato grado di purezza.

Da misure SAXS eseguite sul solido si è acclarato che questo tensioattivo si organizza in una struttura ordinata di forma lamellare, con uno spessore pari a 40.7 Å, compatibile con le dimensioni della molecola stimate mediante il programma ChemBio3DUltra. Le misure WAXS e FT-IR indicano che le catene idrofobiche si dispongono secondo unità strutturali con struttura esagonale.

Dalle analisi di DSC e SAXS sugli aggregati supramolecolari in acqua si può concludere che questi sono costituiti da *coagel* al di sotto di 13 °C, ovvero bistrati di ascorbile oleato separati da sottili strati di acqua fortemente legata alle teste polari. Le lamelle presentano un certo grado di polidispersità dimensionale. Alla temperatura di 20 °C le molecole si organizzano formando micelle ellissoidali prolate con struttura di tipo *core-shell*.

I test DPPH hanno confermato che le proprietà antiossidanti della vitamina C sono conservate.

In futuro, potrebbe essere interessante vedere come cambia la solubilità del tensioattivo in presenza di sali diversi in diverse concentrazioni, ad esempio seguendo la serie di *Hofmeister*. Potrebbe inoltre essere utile approfondire la possibilità di utilizzare le strutture supramolecolari formate in acqua come sistemi per *drug solubilisation* e *drug delivery*.



## **Sigle e abbreviazioni**

*AOS Active Oxygen Species*

*ATR Attenuated Total Reflectance*

*cmc critical micelle concentration*

*cmt critical micelle temperature*

*COSY COrrrelation SpectroscopY*

*DCM DiCloroMetano*

*DPPH 2,2-difenil- 1-picrilidrazile*

*DSC Differential Scanning Calorimetry*

*ESI ElectroSpray Ionization source*

*FT-IR Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

*MCT mercury cadmium telluride*

*MS Mass Spectroscopy*

*NMR Nuclear Magnetic Resonance*

*PMB Bromuro, para-Metossibenzil-Bromuro*

*SAXS small-angle X-ray scattering*

*SLD Scattering Length Density*

*WAXS wide-angle X-ray scattering*

## Bibliografia

[Ambrosi 2004] **Ambrosi, M. ; Lo Nostro, P. ; Fratoni, L. ; Dei, L. ; Ninham, B. W. ; Palma, S. ; Manzo, R. H. ; Allemandi, D. and Baglioni, P.** *Water of hydration in coagels*. PCCP, Vol. 6, 1401-1407 (2004)

[Blanton 2011] **Blanton, T. N. ; Rajeswaran, M. ; Stephens, P. W. ; Whitcomb, D. R. ; Misture, S. T. and Kaduk, J. A.** *Crystal Structure Determination of the Silver Carboxylate dimer  $[Ag(O_2C_{22}H_{43})]_2$ , Silver Behenete, Using Powder X-Ray Diffraction Methods*. Power Diffraction Vol. 26, 313-320 (2011).

[Dolle 2011] **Dolle, C. ; Magrone, P. ; Riva, S. ; Ambrosi, M. ; Fratini, E. ; Peruzzi, N. and Lo Nostro, P.** *Symmetric and Asymmetric Bolaamphiphiles from Ascorbic Acid*. J. Phys. Chem. B 2011, 155, 11638-11649

[Lo Nostro 2000] **Lo Nostro, P. ; Capuzzi, G. ; Romani, A. and Mulinacci, N.** *Self-Assembly and antioxidant properties of octanoyl-6-ascorbic acid*. Langmuir, Vol. 16, 1744-1750 (2000)

[Lo Nostro Elsevier 2000] **Lo Nostro, P. ; Capuzzi, G. ; Pinelli, P. ; Mulinacci, N. ; Romani, A. and Vincieri F. 3F.** *Self-assembling and antioxidant activity of some vitamin C derivatives*. Elsevier, Vol. 167 83-93 (2000)

[Martin 1958] **Martin, J.M. ; Johnston, R. W. B. e O'Neal, M.J.** *Infrared absorption of solid state n-paraffins relationship to crystalline type*. Spectrochimica, Vol. 12, 12-16 (1958)

[Palma 2002] **Palma, S. ; Manzo, R. H. ; Allemandi, D. ; Fratoni, L. and Lo Nostro, P.** *Coagels from Ascorbic Acid Derivatives*. Langmuir, Vol. 18, 9219-9224 (2002)

[Palma 2003] **Palma, S. ; Manzo, R. H. ; Allemandi, D. ; Fratoni, L. and Lo Nostro, P.** *Drugs solubilisation in ascorbyl-decanoate micellar solutions*. Elsevier, Vol. 212, 163-173 (2003)

[Paquette 1985] **Paquette, G. ; Kupranycz, D.B. e van de Voort, F.R.** *The mechanism of lipid Autoxidation I. Primary oxidation products.* Can. Inst. Food Sci. Technol. J., Vol. 18, 112-118 and 197-2068 (1985).

[Tesi Biccocchi 2016] *Studio della sintesi e funzionalizzazione di derivati della vitamina C come potenziali antiossidanti in ambito alimentare.* Tesi di laurea di **Biccocchi, F.** (2016)

[Tesi Bucci 2015] *Sintesi e caratterizzazione chimico fisica di derivati anfifilici dell'acido ascorbico a doppia catena e studio del loro self-assembly in acqua e in solventi organici.* Tesi di laurea di **Bucci, M.** (2015)

[Tesi Tempestini 2015] *Self-Assembly di derivati anfifilici a doppia catena dell'acido ascorbico.* Tesi di laurea di **Tempestini, E.** (2015)

[Venturini 2014] **Venturini, C. ; Pomposi, C. ; Ambrosi, M. ; Carretti, E. ; Fratini, E. and Lo Nostro, P.** *Effect of the Alkyl Chains and of the Headgroups on the Thermal Behavior of Ascorbic Acid Surfactants Mixtures.* J. Phys. Chem, Vol. 118, 3053-3062 (2014)

[Viklund 2003] **Viklund, F. ; Alander, J. ; and Hult K.** *Antioxidative properties and Enzymatic Synthesis of Ascorbyl FA Esters.* JAOCS, Vol. 80, no. 8 (2003)

[Sun 2011] **Sun, Y.-E. ; Wang, W.-D. ; Chen, H. W. e Li, C.** *Autoxidation of Unsaturated Lipids in Food Emulsion.* Crit. Rev. Food Sci. and Nutr. Vol. 51, 453–466. (2011)

## Ringraziamenti

*Innanzitutto desidero ringraziare il Prof. Pierandrea Lo Nostro, relatore della tesi, per avermi fornito l'opportunità di lavorare su questo campo della chimica davvero molto interessante e stimolante. Assieme a lui desidero anche ringraziare la Dott.ssa Moira Ambrosi, la Prof. Antonella Capperucci e Damiano Tanini per tutta la disponibilità ed il tempo dedicatomi durante lo svolgimento della tesi.*

*In ogni caso mi preme sottolineare che, a prescindere dal contributo a questa tesi delle persone citate in questa pagina, ogni errore o imprecisione presente in essa è imputabile unicamente a me.*