



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari (Internazionale)
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e farmaceutiche (STEBICEF)
Chimica Fisica (CHIM/02)

AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI DI TENSIOATTIVI IN FASE GASSOSA: FORMAZIONE E SOLUBILIZZAZIONE DI AMINOACIDI

IL DOTTORE
VALENTINA CALABRESE

IL COORDINATORE
PROF. PATRIZIA DIANA

IL TUTOR
PROF. VINCENZO TURCO LIVERI

CICLO XXX
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2018

Indice

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

1.1 LA CHIMICA SUPRAMOLECOLARE E I PROCESSI DI AUTOAGGREGAZIONE	5
1.2 FORZE INTERMOLECOLARI	7
1.3 ARCHITETTURE SUPRAMOLECOLARI DI INTERESSE BIOLOGICO	16
1.3.1 AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI DI TENSIOATTIVI	18

CAPITOLO II: OBIETTIVO DELLA TESI E STATO DELL'ARTE

2.1 SCOPO DELLA TESI	23
2.2 AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI DI TENSIOATTIVI IN FASE GASSOSA	24
2.2.1 INFLUENZA DEL PROCESSO DI ELETTROSPRAY SUL MECCANISMO DI AGGREGAZIONE IN FASE GASSOSA	24
2.2.2 MIRROR EFFECT	28
2.2.3 INFLUENZA DELLA TESTA POLARE	31
2.2.4 INFLUENZA DELLA PORZIONE IDROFOBICA	33

CAPITOLO III: PARTE SPERIMENTALE

3.1 MATERIALI E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	35
3.2 APPARECCHIATURE E METODI	37
3.2.1 MISURE DI SPETTROMETRIA DI MASSA IN MOBILITÀ IONICA: CONDIZIONI SPERIMENTALI UTILIZZATE.	37
3.2.2 MISURE DI STABILITÀ DEGLI AGGREGATI: COSTRUZIONE DELLE CURVE DI FRAMMENTAZIONE E DI COMPARSA E CONDIZIONI SPERIMENTALI UTILIZZATE	40
3.2.3 MISURE RELATIVE ALLE CCS DEGLI AGGREGATI E CONDIZIONI SPERIMENTALI UTILIZZATE	43

CAPITOLO IV: RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 CARATTERIZZAZIONE DEGLI AGGREGATI DI TENSIOATTIVO IN FASE GASSOSA	45
4.1.1 FENOMENI DI AUTOAGGREGAZIONE DEL TENSIOATTIVO (1R,2S)-(-)-N-DODECIL-N-DIMETIL-EFEDRINIO BROMURO (DMEB)	45
4.1.2 PATTERN DI FRAMMENTAZIONE E STABILITÀ IN FASE GASSOSA DEGLI AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI DEL TENSIOATTIVO AOTNA	50
4.1.3 PATTERN DI FRAMMENTAZIONE E STABILITÀ IN FASE GASSOSA DEGLI AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI DEL TENSIOATTIVO DMEB	57
4.1.4 CROSS SECTION E GEOMETRIA DEGLI AGGREGATI IN FASE GASSOSA DEL TENSIOATTIVO DMEB	62
4.2 FENOMENI DI INTERAZIONE E SELEZIONE CHIRALE DI AGGREGATI DI TENSIOATTIVO IN FASE GASSOSA	66
4.2.1 INTERAZIONE DEGLI AGGREGATI DI DMEB CON L'AMINO ACIDO TRIPTOFANO	66
4.2.2 INTERAZIONE DEGLI AGGREGATI DI DMEB CON L'AMINO ACIDO SERINA	80

CONCLUSIONI **82**

BIBLIOGRAFIA **83**

Capitolo I

Introduzione

1.1. La Chimica Supramolecolare e i processi di autoaggregazione

Il termine Chimica Supramolecolare è stato coniato dal chimico Jean-Marie Lehn, che la definì come “chimica oltre le molecole”.^[1] Se la chimica tradizionale studia le molecole ponendo l’attenzione sui legami covalenti fra gli atomi che le compongono, quella supramolecolare studia entità di maggiore complessità risultanti dall’associazione di due o più molecole mediante interazioni non covalenti e concentrando l’attenzione su tali forze, in genere di natura più debole di quelle intramolecolari. Sono proprio queste forze, insieme alla natura delle specie di cui gli aggregati sono costituiti, a determinare le loro proprietà strutturali, conformazionali e dinamiche. Una conoscenza dettagliata della relazione tra struttura molecolare e interazioni intermolecolari è di fondamentale importanza per la progettazione e realizzazione di sistemi supramolecolari con proprietà chimiche e fisiche mirate per specifiche applicazioni e funzionalità.

Analizzare la supramolecola più semplice, ovvero una specie dimerica, risulta particolarmente conveniente perché, riducendo il numero delle forze intermolecolari in gioco, diventa più facile razionalizzare i processi molecolari coinvolti nella sua formazione. Nel dimero, i due componenti del sistema devono possedere delle caratteristiche che ne rendono possibile una interazione efficace (un termine spesso utilizzato come sinonimo è riconoscimento^[2]). Queste possono essere:

- Complementarità sterica, ovvero avere una forma e una dimensione opportuna (domini concavi o convessi nella corretta collocazione)
- Complementarità dei siti di legame, ovvero possedere opportuni gruppi funzionali che devono trovarsi nella corretta disposizione spaziale in modo da rendere possibile l’interazione
- Possedere quanto più possibile grandi aree di contatto e siti di interazione, visto che le forze intermolecolari sono singolarmente più deboli rispetto ad un legame covalente. Per conferire stabilità si ha, quindi, la necessità di una cooperazione delle interazioni.

Quando uno dei due componenti è molto più grande dell’altro e in seguito al riconoscimento lo circonda parzialmente o lo ingloba, si parla di complesso host-guest, nel quale la specie guest è quella di dimensioni più piccole. Il riconoscimento avviene tanto più facilmente quanto più il recettore risulta preorganizzato, ovvero possiede già prima dell’interazione, siti di legame con geometria e complementarità tale da legare la molecola ospite, formando un complesso stabile. Questa condizione si verifica nel caso di host caratterizzati da una certa rigidità o da cavità

preformate della dimensione adatta ad accettare il substrato^[3] (in Figura 1.1 è mostrata una rappresentazione schematica di questo processo).

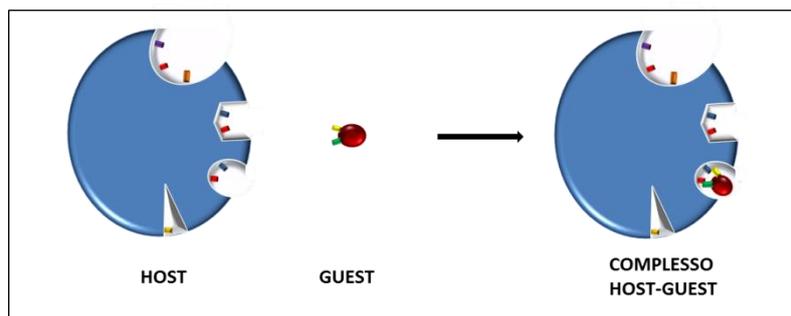


Figura 1.1: Rappresentazione schematica della formazione di un complesso host-guest

Nel caso di supramolecole formate da specie di dimensioni confrontabili, in genere si parla di processi di autoaggregazione (*self-assembly*). Ciò può avvenire attraverso la formazione di legami intermolecolari tra una o poche unità base che possiedono le opportune caratteristiche di complementarità, e in funzione delle condizioni del sistema, portare alla formazione di aggregati composti da centinaia o migliaia di unità base, organizzate in strutture caratterizzate da un ordine locale a tempi brevi e da processi di rottura e formazione di legami intermolecolari a tempi lunghi. Tali specie supramolecolari autoprodotte mediante *self-assembly*, possono inglobare piccole molecole ospite al loro interno o in superficie, generando sistemi host-guest di complessità superiore. Il sistema supramolecolare si forma pertanto grazie alle caratteristiche strutturali degli stessi componenti, ed evolve secondo tre fasi successive:^[2]

- Il riconoscimento molecolare, in cui i componenti complementari interagiscono selettivamente.
- La crescita cooperativa, in cui i molteplici componenti si dispongono nella corretta orientazione reciproca.
- La terminazione del processo, che avviene grazie alla presenza di una caratteristica intrinseca dei componenti dell'aggregato o del sistema, identificata come segnale di stop del processo di auto-aggregazione.

E' importante notare che il quadro appena fornito, rappresenta una situazione ideale in cui le molecole sono dei sistemi rigidi e non vi è alcuna influenza dall'ambiente esterno. In realtà, tutte le molecole sono dotate di una propria dinamica conformazionale dovuta alla libera rotazione attorno ai legami singoli e dipendente da una serie di fattori, primo fra tutti, la temperatura. In funzione delle condizioni del sistema (composizione, natura del solvente, pH, etc.), ogni specie presente esiste in un range di diverse conformazioni, ognuna delle quali può essere più o meno adatta a formare legami deboli con le molecole vicine, e a favorire o meno il processo di riconoscimento.

Una menzione particolare da fare riguarda l'ambiente nel quale avviene il riconoscimento. Quando si trovano dispersi in soluzione, infatti, recettore e substrato interagiscono con le molecole del solvente, e affinché avvenga il riconoscimento, queste interazioni si devono in parte rompere. L'entalpia della formazione di un complesso bimolecolare, quindi, dipende dalla differenza fra l'energia necessaria per la rottura delle interazioni fra substrato o recettore e molecole di solvente e l'energia liberata dalla formazione delle interazioni deboli fra substrato e recettore. Allo stesso modo l'entropia del processo dipende dalla variazione del grado di disordine delle molecole di solvente non più interagenti, e da quello dovuto alla formazione del complesso host-guest. Visto che in funzione del tipo di solvente le interazioni che si instaurano con recettore e substrato possono essere più o meno labili, la scelta del solvente assume importanti conseguenze energetiche ed entropiche influenzando così sulla formazione e sulla stabilità del complesso che si forma.^[4]

E' utile ricordare che le interazioni instauratesi fra i componenti sono forze deboli e una volta formate possono essere singolarmente rotte da fluttuazioni locali di energia, restituendo i componenti liberi. Ciò dà vita ad alcune importanti caratteristiche come la possibilità di correggere gli errori durante l'assemblaggio o quella di rinnovare le molecole di cui è composto l'aggregato. In diretta conseguenza, tutte le architetture che si formano nei vari stadi del processo di aggregazione sono continuamente sottoposte a reazioni di formazione e dissociazione, e quindi ad una condizione di equilibrio termodinamico che corrisponde ad un minimo dell'energia libera del sistema ed in genere alla coesistenza di popolazioni di aggregati differenti. Tenendo conto della dinamica conformazionale delle molecole, della presenza di domini con polarità differente nella stessa specie e della direzionalità di alcuni tipi di interazioni, è possibile presupporre la formazione di un ampio spettro di isomeri supramolecolari, ovvero aggregati che sono costituiti dallo stesso numero e tipo di molecole ma nei quali la disposizione o l'orientazione reciproca delle molecole è differente. Anche in questo caso la popolazione di aggregati sarà maggiormente rappresentata dagli isomeri più stabili.

1.2 Forze intermolecolari

Come accennato nella parte introduttiva, la formazione e le caratteristiche strutturali delle architetture supramolecolari dipendono strettamente dal tipo di interazioni intermolecolari non covalenti che si generano fra i componenti. Ognuna di queste interazioni è caratterizzata da proprietà specifiche come energia, direzionalità e angoli di legame; quindi una buona conoscenza di queste forze è necessaria per la scelta dei componenti molecolari adatti a produrre l'architettura desiderata.

A differenza dei legami intramolecolari che derivano dalla condivisione di elettroni fra due specie atomiche, e che sono caratterizzate da un'energia relativamente elevata, compresa fra 150 e 450 kJ mol⁻¹, le forze di interazione non covalente hanno natura elettrostatica e sono singolarmente più deboli rispetto ad un legame covalente. Esse però posseggono la caratteristica di cooperatività, ovvero sono in grado di sommarsi sinergicamente, generando così una forza complessiva relativamente alta.

Le interazioni non covalenti coinvolte nella formazione degli aggregati supramolecolari sono:

- I legami ionici
- Interazioni che coinvolgono dipoli permanenti: ione-dipolo e dipolo-dipolo
- Legami ad idrogeno
- Interazioni che coinvolgono molecole non polari: forze dipolo-dipolo indotto e forze di dispersione di London (dipolo indotto-dipolo indotto)
- Le interazioni π
- Le interazioni idrofobiche

Legami ionici

I legami ionici si formano in seguito al trasferimento di elettroni di valenza da un atomo all'altro, generando due specie con carica netta opposta. Il legame ionico è quindi una interazione elettrostatica attrattiva fra ioni di carica opposta. La forza di interazione tra due cariche (Q_1 e Q_2) è regolata dalla legge di Coulomb e può essere calcolata come la derivata dell'energia di interazione $w(r)$ rispetto alla distanza r fra le due cariche (Equazione 1.1) [5]:

$$F = -\frac{dw(r)}{dr} = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0 r^2} = \frac{z_1 z_2 e^2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad \text{Eq. 1.1}$$

dove ϵ_0 è la permittività del vuoto, e la carica elementare dell'elettrone ($e = 1.602 \times 10^{-19}$ C), z_1 e z_2 sono il numero di cariche degli ioni e r la loro distanza. L'interazione elettrostatica è considerata una forza a lungo raggio nel senso che agisce a distanze intermolecolari relativamente grandi e, in accordo con la legge di Coulomb, aumenta al diminuire della distanza tra gli ioni e all'aumentare della loro carica. Per cariche dello stesso segno la forza risulta repulsiva.

L'energia dei legami ionici a seconda della distanza di equilibrio fra gli ioni può assumere valori anche molto elevati, compresi fra 100 e 700 kJ mol⁻¹. Alla stregua dei legami covalenti, i singoli legami ionici risultano quindi relativamente forti, ma a differenza di questi non hanno direzionalità. Tuttavia, quando sono contemporaneamente presenti più specie cariche, le mutue interazioni elettrostatiche determinano in genere una relazione spaziale tra di esse. Inoltre, è importante tenere

presente l'azione del solvente nel ridurre la forza di interazione. Per esempio l'acqua ha una costante dielettrica 78 a 25°C e la forza elettrostatica fra le due cariche sarà quindi 78 volte più piccola di quella nel vuoto.

Le caratteristiche delle interazioni elettrostatiche ne fanno un prezioso strumento per i processi di *self-assembly*. Nel riconoscimento molecolare, le interazioni non direzionali come le forze elettrostatiche, infatti, possono contribuire insieme alle interazioni direzionali a stabilizzare certe strutture. Un esempio è rappresentato dal processo di formazione del complesso enzima-substrato, nel quale le prime interazioni avvengono proprio grazie all'attrazione fra cariche nette opposte e il completamento del riconoscimento avviene poi per formazione di ulteriori interazioni direzionali delle due strutture più rigidamente collegate.^[6]

Interazioni ione-dipolo e dipolo-dipolo

Alcune molecole hanno dipoli permanenti generati da una condivisione asimmetrica degli elettroni fra atomi a differente elettronegatività. Nel caso più semplice, tali molecole posseggono una zona con una certa densità di carica positiva e un'altra con una uguale densità di carica negativa, e per questo quando si trovano in vicinanza di uno ione, tendono ad interagire con esso in modo che, se lo ione è positivo il dipolo si orienta con la parte negativa del dipolo e viceversa.

Anche in questo caso la forza corrisponde ad una interazione elettrostatica regolata dalla legge di Coulomb, inferiore rispetto a quella di una interazione fra ioni, e che include una certa orientazione della molecola rispetto allo ione. L'energia di interazione tra la molecola con momento di dipolo u e lo ione di carica Q distante r può essere calcolata tramite l'Equazione 1.2^[5]:

$$w(r, \theta) = -u \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 r^2} \cos\theta \quad \text{Eq. 1.2}$$

In funzione dell'angolo θ , ovvero della orientazione del dipolo, si verificherà o attrazione o repulsione. L'energia di interazione è compresa fra 15 e 600 kJ mol⁻¹ ed essendo molto più grande del valore di RT a temperatura ambiente (2.5 kJ mol⁻¹) permette di legare fortemente ioni a molecole polari opportunamente orientate, come nella solvatazione di Na⁺ e Cl⁻ in acqua.

Anche nel caso in cui due molecole caratterizzate da una certa polarità si trovino vicine, avviene qualcosa di molto simile: l'estremità positiva di una molecola tende ad interagire con l'estremità negativa dell'altra. Quanto più è accentuato il carattere asimmetrico della distribuzione delle cariche nelle molecole, tanto più queste forze saranno intense. Per due dipoli orientati in posizione fissa nello spazio, l'energia di interazione dipende dalla posizione reciproca dei due dipoli che determina

se la forza è attrattiva o repulsiva. In questo caso, l'energia di interazione è data da (Equazione 1.3) [5]:

$$w(r, \theta_{12}, \theta_1, \theta_2) = -\frac{u_1 u_2}{4\pi\epsilon_0 r^3} (2\cos\theta_1 \cos\theta_2 - \sin\theta_1 \sin\theta_2 \cos\theta_{12}) \quad \text{Eq. 1.3}$$

Dove u_1 e u_2 sono i momenti di dipolo delle due molecole, r la loro distanza, θ_{12} è l'angolo tra i due dipoli, θ_1 e θ_2 gli angoli formati dai due dipoli rispetto alla linea che congiunge i loro centri.

In generale in funzione della geometria e della forma molecolare le interazioni di tipo attrattivo si attuano quando i poli opposti delle molecole possono combaciare, orientandosi o tutti sullo stesso asse, o allineandosi parallelamente.

Per dipoli liberi di ruotare, subentra nel calcolo dell'energia un fattore dovuto ai moti termici e bisogna mediare l'interazione su tutte le possibili orientazioni assunte con una probabilità descritta dall'equazione di Maxwell Boltzmann. In questo caso l'energia dell'interazione ione-dipolo sarà pari a (Equazione 1.4) [5]:

$$w(r) = -\frac{Q^2 u^2}{6(4\pi\epsilon_0)^2 kT r^4} \quad \text{Eq. 1.4}$$

ed è di tipo attrattivo e dipendente dalla temperatura. Per quanto riguarda le interazioni dipolo-dipolo (u_1 e u_2) invece lo stesso procedimento porta ad una energia media di interazione pari a (Equazione 1.5) [5]:

$$w(r) = -\frac{2}{3} \frac{u_1^2 u_2^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 kT r^6} \quad \text{Eq. 1.5}$$

Questo tipo di interazione mediata per tutte le possibili orientazioni assunte dai due dipoli viene chiamata interazione di Keesom e l'energia di legame è compresa fra 4 e 25 kJ mol⁻¹.

Legami a idrogeno

Un particolare tipo di interazione è rappresentato dai legami idrogeno. Nonostante sia una interazione sostanzialmente elettrostatica, essa presenta un certo carattere covalente che determina un elevato grado di direzionalità del legame. Dato l'ubiquità e l'importanza di questo tipo di interazioni nei sistemi chimici e biologici, nel corso degli anni, sono state date differenti definizioni che focalizzano l'attenzione su aspetti differenti. In maniera semplicistica i ponti a idrogeno possono essere descritti come delle attrazioni che si instaurano fra un atomo di idrogeno della specie A-H e la molecola B-R, in cui A e B sono entrambi atomi elettronegativi e B possiede

almeno un doppietto elettronico non condiviso. L'atomo di idrogeno, fa quindi da ponte fra i due atomi elettronegativi e l'interazione viene solitamente indicata con la notazione A-H...B-R.

E' importante sottolineare che la forza dei legami a idrogeno non è necessariamente correlata con l'acidità di Brønsted ed essa dipende essenzialmente dall'elettronegatività dell'atomo donatore A (e quindi dalla densità di carica positiva sull'atomo di idrogeno), ma anche dalla direzione del legame. In particolare, la forza del legame dipende dalla geometria delle coppie elettroniche intorno all'atomo elettrone-donatore e diventa massima quando l'atomo donatore, l'idrogeno e l'atomo accettore si allineano sullo stesso asse, mentre tutte le altre direzioni di legame portano ad una riduzione della forza (in figura 1.2 vengono mostrate le possibili geometrie assunte dai legami a idrogeno). Più sono allineati gli orbitali degli atomi coinvolti, più il legame sarà forte e maggiore sarà il carattere covalente della forza. Si tratta comunque di interazioni a medio raggio la cui energia è inversamente proporzionale al quadrato della distanza intermolecolare. Tipicamente essa è compresa fra 10 e 120 kJ mol⁻¹ e il valore più frequente è di circa 40 kJ mol⁻¹.

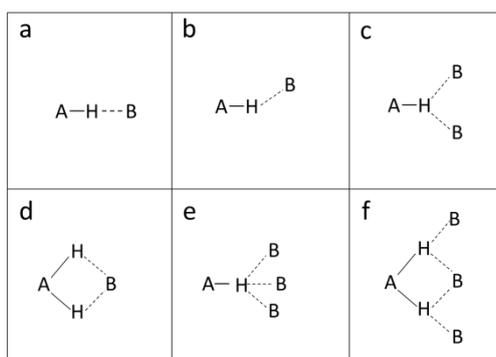


Figura 1.2: possibili geometrie assunte dai legami a idrogeno: (a) lineare, (b) piegato, (c) donatore biforcuto, (d) accettore biforcuto, (e) triforcuto e (f) biforcuto a tre centri.

La direzionalità dei legami a idrogeno li rende particolarmente adatti al raggiungimento della complementarietà nei sistemi supramolecolari. La maggior parte dei legami a idrogeno non è lineare, ma piegata, generando così differenti lunghezze e angoli che permettono di ampliare il *range* delle possibili interazioni fra specie molecolari.

Interazioni dipolo-dipolo indotto e forze di dispersione di London

Molecole polari e specie ioniche possono indurre un momento di dipolo in molecole che, se considerate isolatamente, sono apolari. Questo fenomeno di polarizzazione è dovuto ad una distorsione della nube elettronica della molecola apolare, e quindi uno sbilanciamento della distribuzione delle cariche determinando sempre una attrazione elettrostatica tra le due specie. L'entità del dipolo che viene indotto (μ_{ind}) dipende dal campo elettrico esercitato dalla molecola

polare/ione su quella apolare secondo una costante α definita polarizzabilità e che può essere vista come la facilità con cui la distribuzione elettronica in un atomo o molecola apolare può essere distorta (Equazione 1.6) ^[5]:

$$u_{ind} = \alpha E \quad \text{Eq. 1.6}$$

ed essa aumenta al crescere della massa molare, ovvero del numero di elettroni presenti nei gusci esterni e anche in funzione della libertà di movimento, ovvero dalla loro vicinanza rispetto al nucleo.

Grazie a questa interazione, oltre all'attrazione è possibile che si determini anche un orientamento preferenziale tra le due specie (interazioni dipolo permanente-dipolo indotto, definite anche interazione di Debye, o di induzione).

L'energia dell'interazione di Debye è data dall'equazione 1.7 ^[5], dove u_1 corrisponde al momento dipolare del dipolo permanente e α_2 alla polarizzabilità della molecola apolare.

$$w(r) = -\frac{1}{r^6} \frac{u_1 \alpha_2}{4\pi\epsilon_0} \quad \text{Eq. 1.7}$$

Infine esiste un ultimo tipo di interazione che agisce fra tutti gli atomi e tutte le molecole, anche fra quelle che sono totalmente neutre e apolari. Questo tipo di forze, chiamate forze di dispersione o di London, possono essere spiegate tenendo in considerazione che il momento dipolare medio per una molecola apolare è zero, ma istante per istante i moti elettronici possono generare piccoli dipoli istantanei che producono a loro volta campi elettrici che polarizzano le molecole vicine, inducendo anche in esse un dipolo istantaneo. In questo caso, i moti elettronici delle due molecole apolari vicine tendono a correlarsi così che i dipoli istantanei generati sono sempre favorevolmente orientati determinando una forza che è sempre attrattiva e la cui energia di interazione, per due molecole uguali, dipende dalla polarizzabilità α_0 e dall'energia di ionizzazione I della molecola e può essere calcolata con l'equazione 1.8 ^[5]:

$$w(r) = -\frac{3}{4} \frac{\alpha_0^2 I}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad \text{Eq. 1.8}$$

Le forze di dispersione di London insieme alle forze di Keesom e di Debye sono proporzionali a $1/r^6$ ovvero manifestano una forte diminuzione con l'aumentare della distanza e per questo sono indicate come interazioni a corto raggio. Nel totale costituiscono le cosiddette interazioni di Van der Waals che complessivamente hanno valori di energia di interazione compresi fra 5 e 50 kJ mol⁻¹.

Le forze di dispersione, essendo sempre presenti in tutti gli atomi e le molecole, rivestono un ruolo importante nei sistemi chimici e sono considerate responsabili di fenomeni di adesione, della tensione superficiale, dello stato liquido o solido di specie apolari e contribuiscono significativamente a determinare la struttura di proteine e polimeri.

E' importante notare che a distanze intermolecolari molto piccole, gli orbitali molecolari delle due molecole si sovrappongono apprezzabilmente e lo stato del sistema dovrebbe essere descritto mediante una funzione d'onda globale che tiene conto del principio di esclusione di Pauli (ponendo dei limiti alla possibilità di elettroni con spin parallelo di occupare la stessa regione di spazio). Ciò determina nella zona di sovrapposizione una riduzione della densità elettronica tale da rendere le cariche nucleari poco schermate generando così una forza repulsiva tra le due molecole che si oppone ad un loro ulteriore avvicinamento.

Interazioni π

Il benzene non possiede un dipolo netto in quanto i dipoli intramolecolari per effetto della simmetria si annullano, ma determinano un momento quadrupolare, con una zona a più alta densità elettronica associata all'orbitale π che si distribuisce sulle due facce dell'anello e una zona a bassa densità che si concentra sul bordo dell'anello, ovvero sugli idrogeni legati ai carboni aromatici. In virtù di questa struttura elettronica esistono differenti tipi di interazioni come l'interazione π - π , l'interazione catione- π , o le interazioni anioni- π , la cui natura si avvicina contemporaneamente a quella delle interazioni di Van der Waals, delle interazioni elettrostatiche e delle interazioni idrofobiche.

Nelle interazioni π - π prevale il contributo elettrostatico che si esplica fra zone a densità di carica positiva di un anello aromatico e il sistema π di un altro anello aromatico. Esistono differenti tipi di geometria che sono in ogni caso riconducibili a tre casi limite: "face-to-face", "edge-to-face" e la "offset-stacked": nel primo caso, anelli aromatici con momenti quadrupolari opposti si attraggono, disponendosi con le facce parallele. Il secondo caso, invece, può essere assimilato ad un legame idrogeno di tipo C-H \cdots π nel quale l'interazione avviene fra uno degli idrogeni legati ai carboni aromatici perpendicolarmente al piano dell'orbitale π di un altro anello aromatico, ed è tipicamente presente fra residui aromatici di amino acidi nelle strutture proteiche. L'ultimo tipo di geometria rappresenta il caso in cui le molecole aromatiche si dispongono parallelamente ma in maniera sfalsata, mantenendo una distanza di 3.5 Å l'uno dall'altro, in modo tale da ottimizzare le interazioni fra le zone a densità di carica positiva (idrogeni legati ai carboni aromatici) e le zone a densità di carica negative (orbitali π) e differentemente dalla geometria edge-to-face, l'interazione è principalmente dovuta ad un effetto di tipo Van der Waals e idrofobico. Quest'ultimo tipo di

interazione è ampiamente presente nel mondo biologico, infatti i legami non covalenti fra basi azotate adiacenti risultano particolarmente importanti nella stabilizzazione della conformazione del DNA^[7] e sono alla base dei meccanismi di intercalazione di farmaci antitumorali nella doppia elica del materiale genetico delle cellule neoplastiche.

Mentre le interazioni catione- π possono essere razionalizzate semplicemente mediante una forza elettrostatica di tipo attrattivo fra uno ione a carica positiva e la densità di carica negativa del sistema π di un anello aromatico, leggermente più complesso è il meccanismo di interazione che può avvenire nel caso di un anione. In questo caso è utile ricordare che un momento di quadrupolo sotto l'azione di un campo elettrico si distorce manifestando un momento di dipolo favorevolmente orientato. Pertanto, l'interazione anione- π è dovuta al contributo elettrostatico che nasce dall'interazione dell'anione con il momento di dipolo indotto per distorsione di quello di quadrupolo permanente dell'anello aromatico. L'energia delle interazioni tra gruppi aromatici è compresa fra 0 e 10 kJ mol⁻¹.

Interazioni idrofobiche

La forte propensione delle molecole di acqua a formare legami idrogeno con quelle circostanti influenza la loro interazione con le molecole apolari. Quando una specie apolare viene dispersa in acqua, le molecole circostanti si riorganizzano strutturandosi così che i legami ad idrogeno rotti per alloggiarla sono compensati da quelli formati. L'aumento di ordine locale però determina una significativa diminuzione di entropia tale da sfavorire il processo di solubilizzazione rendendo la sostanza apolare praticamente insolubile in acqua. Questo tipo di fenomeno viene definito come effetto idrofobico e l'entità della riorganizzazione dell'intorno acquoso dipende strettamente dalla forma e dalla dimensione della molecola apolare.

Una conseguenza dell'effetto idrofobico è l'interazione idrofobica, ovvero la tendenza di molecole apolari a formare aggregati così che la superficie apolare totale esposta alle molecole di acqua si riduce determinando un parziale ripristino della libertà di movimento delle molecole di acqua e quindi un aumento di entropia che favorisce il processo di aggregazione.

L'energia di questa interazione risulta essere inferiore ai 10 kJ mol⁻¹.

L'effetto idrofobico e l'interazione idrofobica sono ritenute responsabili della formazione di aggregati micellari o delle strutture secondarie di proteine in soluzione acquosa.

Dinamica molecolare per lo studio di interazioni intermolecolari in sistemi complessi

E' importante sottolineare che finora le interazioni tra molte molecole sono state considerate solo qualitativamente mentre una descrizione quantitativa è stata fornita solo per le interazioni tra due

specie isolate in specifiche conformazioni. In generale però, i sistemi reali contemplano la coesistenza di molte molecole dotate di moti dinamici interni. Per questi sistemi, una utile tecnica computazionale è la dinamica molecolare (MD) classica che è basata sulla soluzione delle equazioni del moto per un sistema di N atomi interagenti. La procedura prevede il calcolo (Equazione 1.9) della forza che agisce su ciascun atomo i come derivata del potenziale V che descrive le interazioni intramolecolari e intermolecolari in funzione dei vettori posizione degli atomi:

$$F_i = \frac{-\partial V(r_1, r_2, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad \text{Eq. 1.9}$$

Poi ciascun atomo i viene spostato in accordo alla legge di Newton (Equazione 1.10):

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \quad \text{Eq. 1.10}$$

Queste equazioni vengono risolte contemporaneamente considerando intervalli di tempo molto piccoli (dell'ordine dei femtosecondi) e, ogni volta, aggiornando le posizioni di tutti gli atomi. Il sistema di molecole in genere è mantenuto a pressione e temperatura costante e la sua evoluzione temporale viene seguita per un intervallo di tempo sufficientemente lungo finché non raggiunge uno stato di equilibrio caratterizzato da proprietà macroscopiche indipendenti dal tempo. Questa procedura permette di avere una rappresentazione dinamica del sistema di molecole (tempi di vita conformazionali, velocità di diffusione, cambiamenti di stato, etc.) e allo stesso tempo di calcolare importanti quantità mediate nel tempo quali energia intermolecolare, funzioni di distribuzione radiale, solubilità, costanti di binding.

Ovviamente la bontà dei risultati ottenuti dipende principalmente dall'equazione che descrive il potenziale di interazione ed in particolare dalla sua capacità di trattare in modo realistico le forze di attrazione e repulsione tra atomi. Inoltre, per contenere i tempi di calcolo, è necessario limitare il numero di molecole che compongono il sistema. Ciò implica che la frazione di molecole in superficie è molto più grande di quella di un sistema macroscopico. Poiché queste molecole hanno proprietà diverse da quelle all'interno, quando si vuole simulare un sistema macroscopico, per ridurre questo effetto vengono introdotte le cosiddette condizioni periodiche al contorno. Infine si deve osservare che se si vuole descrivere sistemi in cui hanno luogo processi reattivi che coinvolgono rottura e formazione di legami chimici è necessario utilizzare la dinamica molecolare quantistica che, se da una parte è più accurata dell'MD classica, dall'altra presenta un costo computazionale molto più elevato.

1.3 Aggregati supramolecolari di interesse biologico

Tutti i sistemi viventi, dal più semplice organismo procariota al più complesso, come l'uomo, sono costituiti da cellule. Ogni cellula rappresenta la più compiuta espressione di aggregati supramolecolari prodotti dal *self-assembly* di molecole organiche, in grado di effettuare compiti specifici di elevata complessità. Ciò che delimita ogni cellula è la membrana biologica, costituita da un doppio strato di fosfolipidi, molecole di natura anfipatica che si organizzano spontaneamente in modo che le teste polari siano rivolte verso l'ambiente acquoso e le code idrofobe protrudano verso l'interno del doppio strato, isolandosi dalle molecole di acqua. Una rappresentazione pittorica di una membrana biologica ideale è mostrata in Figura 1.3/a. Il processo di *self-assembly* scaturisce da un delicato equilibrio di interazioni idrofiliche e idrofobiche e la forma grossomodo cilindrica dei fosfolipidi contribuisce alla formazione della disposizione a doppio strato. Oltre ai fosfolipidi, presenti in maggiore quantità, nelle membrane biologiche si trovano anche molecole di colesterolo, glicolipidi e proteine. Le proteine anfipatiche interagiscono strettamente sia con i nanodomini polari sia apolari della membrana e possono essere rilasciate solo in seguito alla disgregazione della membrana e vengono per questo definite "integrali". Le proteine periferiche invece, avendo carattere prevalentemente polare sono debolmente associate con interazioni non covalenti alla superficie interna o esterna e possono essere facilmente rimosse. L'ordine locale dei fosfolipidi rende la membrana biologica un cristallo liquido, in cui però, le molecole possono muoversi parallelamente a se stesse e meno frequentemente trasferendosi da uno strato all'altro (flip-flop). La struttura risulta resistente e abbastanza fluida da consentire lo scambio di sostanze con l'ambiente esterno attraverso i processi di esocitosi ed endocitosi.

Le proteine presenti nelle cellule, oltre ad avere funzione strutturale, agiscono da agenti di trasporto, enzimi e ormoni. Lo scheletro delle proteine è costituito da un insieme di aminoacidi legati covalentemente e viene definito come "struttura primaria". Il materiale proteico però, non esiste nel corpo come semplice struttura lineare. La formazione di legami a idrogeno tra gli elementi dello scheletro aminoacidico determina il ripiegamento delle catene polipeptidiche generando una conformazione tridimensionale definita come "struttura secondaria". La conformazione tridimensionale assume poi una forma definita (struttura terziaria) tramite i legami idrogeno, i legami ionici e le interazioni idrofobiche che si instaurano tra le catene laterali degli aminoacidi. Infine, è importante notare che la forma biologicamente attiva della maggior parte delle proteine scaturisce dall'interazione fra più catene polipeptidiche (struttura quaternaria). Le strutture primaria, secondaria, terziaria e quaternaria sono raffigurate pittoricamente in figura 1.3/b.

Visto che ciascun dominio proteico può avere una funzione diversa come, per esempio, permettere l'ancoraggio alla membrana plasmatica o assolvere alla catalisi enzimatica, mutazioni della

sequenza aminoacidica e alterazioni della struttura tridimensionale in seguito a riscaldamento, variazioni di pH o trattamento chimico, possono determinare la perdita dell'attività biologica.

Fra i sistemi auto-assemblati di natura proteica non bisogna dimenticare l'interazione enzima-substrato, che rappresenta uno degli esempi più caratteristici di interazione *host-guest*, e che si rifà al concetto di chiave-serratura esposto da Emil Fisher, e al principio di riconoscimento molecolare di cui si è parlato nel primo paragrafo.

Anche la macromolecola su cui si fonda la vita e che è presente in tutte le cellule viventi, ovvero il DNA, deve alcune delle sue proprietà alla formazione di interazioni non-covalenti. Il modello strutturale elaborato da Watson e Crick prevede che ciascuna molecola di DNA sia costituita da due catene polinucleotidiche avvolte a costituire una doppia elica in cui lo scheletro zucchero-fosfato forma l'impalcatura esterna, mentre le basi azotate si dispongono all'interno. I due filamenti sono in grado di appaiarsi spontaneamente in modo altamente selettivo, mediante un processo di *self-assembly* in cui le basi adenina e timina interagiscono mediante due legami idrogeno e, citosina e guanina mediante tre legami idrogeno (la formazione dei legami a idrogeno fra basi azotate è mostrata in figura 1.3/c). L'accoppiamento è possibile solamente in questo modo perché permette di raggiungere una distanza ottimale dei legami. D'altro canto interazioni π - π che si instaurano tra gli anelli aromatici delle basi azotate adiacenti, contribuiscono a stabilizzare ulteriormente la struttura e a definire la conformazione tridimensionale.

Processi di *self-assembly* stanno alla base anche dei processi replicativi e di riparazione del DNA dal momento che essi prevedono l'intervento di strutture proteiche in grado di riconoscere ed interagire, mediante interazioni non covalenti, con le sequenze di materiale genetico. Anche il meccanismo d'azione dei farmaci antitumorali intercalanti si basa sulla formazione di interazioni *stacking* e idrofobiche: queste molecole aromatiche e planari, quindi con struttura simile a quella delle basi azotate, si sostituiscono ad esse o si interpongono tra le scanalature, impedendo il corretto appaiamento o ingannando i meccanismi replicativi.

Uno degli aspetti più affascinanti risiede nella possibilità di ottenere "in provetta" a partire dai componenti separati, le super-strutture del mondo biologico perfettamente funzionanti. Per esempio, il virus del mosaico del tabacco (TMV) è costituito da un capsido elicoidale di 2130 unità proteiche identiche, che si assemblano spontaneamente, sia in vivo che in vitro, attorno ad un filamento di RNA virale. Il processo di *self-assembly* replicato in laboratorio prevede che un iniziale piccolo numero di proteine di rivestimento si assemblino formando dischi cilindrici corrispondenti a due giri elicoidali. Uno di questi piccoli aggregati riconosce poi in maniera specifica l'RNA e solo in seguito all'interazione con il filamento di materiale genetico, avviene il completamento del rivestimento esterno per aggiunta sequenziale di ulteriori dischi proteici alla struttura preformata.

La formazione di ulteriori interazioni deboli fra le subunità assicura una modificazione dell'organizzazione spaziale dei dischi generando la struttura elicoidale del capsido e quindi il virus infettivo ^[8] (figura 1.3/d).

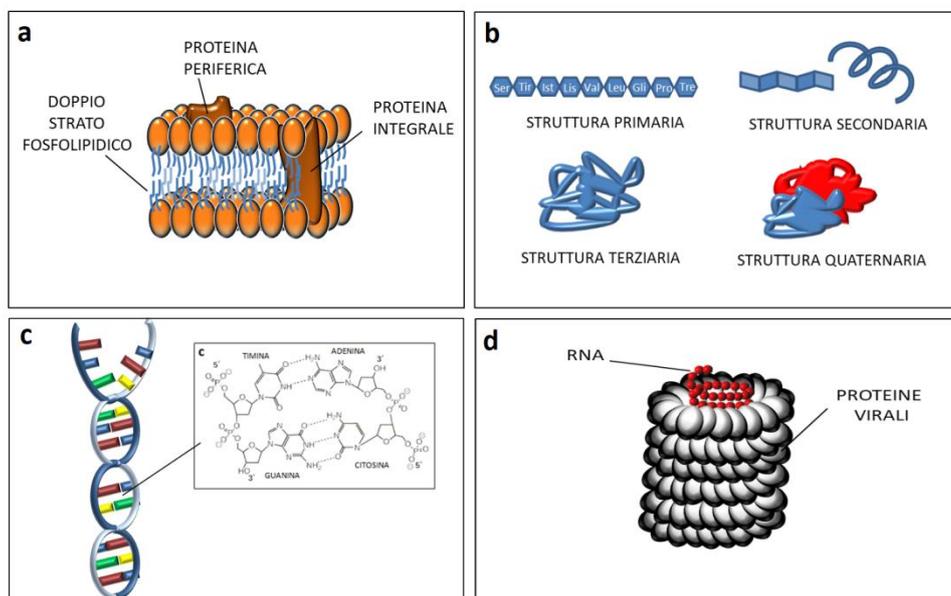


Figura 1.3: Rappresentazione pittorica dei principali aggregati supramolecolari di interesse biologico: a) membrana cellulare, rappresentata da un doppio strato fosfolipidico contenente glico-residui e proteine; b) struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria di una generica proteina; c) Dna e ponti a idrogeno fra le basi timina/adenina e citosina/guanina; d) Struttura del virus TMV.

Come si può notare quindi, il più alto livello di complessità si raggiunge proprio negli organismi viventi e una delle sfide della chimica supramolecolare consiste nello sviluppo di sistemi artificiali e abiotici, di completa o parziale immaginazione, che mimano le loro peculiari proprietà strutturali e dinamiche con l'obiettivo di ampliarne le capacità e l'efficienza.

1.3.1 Aggregati supramolecolari di tensioattivi

Nel precedente paragrafo è stata descritta la capacità dei fosfolipidi di auto-organizzarsi in doppi strati formando così l'impalcatura delle membrane cellulari. Queste molecole appartengono ad una categoria più ampia di specie di natura anfifilica in grado di organizzarsi autonomamente: i tensioattivi. Le super strutture ottenute possiedono una grande versatilità e si prestano ad applicazioni in ambito farmaceutico, chimico e biologico.

Nei tensioattivi, la parte apolare, definita comunemente "coda", può essere costituita da una o più catene idrocarburiche o fluorocarburiche lunghe e flessibili. La parte polare viene comunemente chiamata "testa", e può essere un gruppo non ionico, ionico a carica netta positiva o negativa, o,

infine, un gruppo zwitterionico. In fase condensata, a causa della bassa affinità delle catene apolari nei confronti di solventi polari e dell'alta idrofilia delle teste, le molecole di tensioattivo si organizzano formando aggregati supramolecolari di differente complessità.

In solventi di elevata costante dielettrica come l'acqua, i tensioattivi dispersi a basse concentrazioni, si trovano in un equilibrio fra la forma monomerica dissolta nel solvente *bulk* e quella accumulata all'interfaccia solvente/aria, e orientata con la teste a contatto con il solvente polare e la coda distesa sulla superficie del solvente rivolta verso la fase gassosa. Macroscopicamente questo fenomeno determina un abbassamento della tensione superficiale del solvente. Al progressivo crescere della concentrazione di tensioattivo, si assiste alla formazione di un monostrato superficiale sempre più compatto nel quale le code idrofobiche protrudono verso l'aria, e ciò si verifica fino al raggiungimento di un valore limite (definito concentrazione micellare critica, cmc), sistema-specifico e variabile in funzione delle condizioni sperimentali, superato il quale le molecole di tensioattivo, si organizzano formando nel corpo della soluzione aggregati sferoidali definite micelle dirette in equilibrio dinamico con le specie monomeriche. La forza trainante del processo è l'effetto idrofobico che tende ad allontanare dalla fase polare le code apolari dei tensioattivi. Queste sono quindi spinte a compattarsi all'interno della micella nel cosiddetto "core", mentre le teste polari formano uno strato esterno che interagisce con le molecole di solvente e con gli eventuali controioni.

In solventi apolari, anche per concentrazioni elevate, le molecole di tensioattivo non mostrano alcuna tendenza ad accumularsi all'interfaccia solvente/aria e l'equilibrio che si instaura coinvolge solamente la forma monomerica libera e strutture organizzate definite micelle inverse, anch'esse sferoidali e con organizzazione opposta a quella delle micelle dirette, ovvero un core centrale idrofilo, costituito dalle teste e nel caso di tensioattivi ionici dai controioni, e uno strato esterno formato dalle code idrofobe.

In realtà, micelle dirette ed inverse rappresentano le organizzazioni più semplici dei tensioattivi. Altri tipi di aggregati più complessi come doppi strati, microemulsioni, vescicole dirette ed inverse, cristalli liquidi e liposomi si possono formare in funzione delle caratteristiche chimiche del surfattante e delle condizioni di concentrazione, solvente, temperatura, presenza di additivi ecc.

Una rappresentazione schematica delle strutture organizzate formate da tensioattivi in varie condizioni è mostrata in figura 1.4:

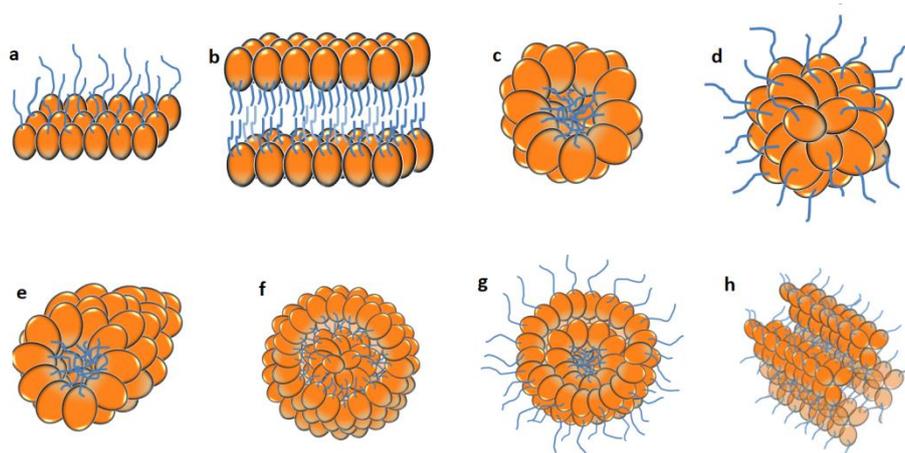


Figura 1.4: Aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase condensata. a) monostrato, b) doppio strato, c) micella diretta, d) micella inversa, e) micella cilindrica, f) vescicola diretta, g) vescicola inversa, h) cristalli liquidi.

La maggiore o minore propensione di un tensioattivo a formare certe strutture è descritta dal parametro di impacchettamento. Esso può essere calcolato come $V_c/l_c a_0$, dove V_c e l_c indicano rispettivamente il volume e la lunghezza della molecola di tensioattivo, mentre a_0 rappresenta l'area della testa polare.^[9,10] Quest'ultima dipende dalla struttura della testa idrofila del tensioattivo, ed è fortemente influenzata da parametri come la presenza di elettroliti, specie che interagiscono con la testa, o dal pH.

Valori del parametro di impacchettamento inferiori ad $\frac{1}{3}$ sono caratteristici di tensioattivi che tendono a formare preferibilmente micelle dirette in solventi acquosi. Se il valore del parametro è compreso fra $\frac{1}{3}$ e $\frac{1}{2}$, gli aggregati avranno forma cilindrica e saranno formati probabilmente da tensioattivi a singola catena con testa polare relativamente piccola. Micelle cilindriche possono derivare anche da alti valori di concentrazione del tensioattivo, o nel caso di un surfattante ionico per aggiunta di un elettrolita che, interagendo con le teste, riduce la repulsione reciproca e favorisce l'aggregazione. Quando il valore del parametro raggiunge l'unità, il tensioattivo si organizza nella formazione di strutture lamellari in soluzione acquosa e micelle inverse in solventi apolari. Questi ultimi assumono una forma tanto più simmetrica e sferica, quanto più il parametro di impacchettamento è maggiore ad 1.

Oltre a determinare un abbassamento della tensione superficiale dei solventi polari, uno degli effetti di maggiore interesse direttamente legato alla presenza di aggregati di tensioattivi, è la possibilità di solubilizzare opportune specie inglobandoli nella micella e di fungere quindi da trasportatori e/o da protettori. Questo processo consiste nell'intrappolamento spontaneo di una sostanza solida, liquida

o gassosa nella micella tramite la formazione di interazioni reversibili, e considerato che le micelle sono caratterizzate dalla presenza di nanodomini polari e apolari spazialmente separati, il sito di solubilizzazione, dipende strettamente dalla natura polare, apolare o anfifilica del materiale solubilizzato. Informazioni sui siti di solubilizzazione in micelle in fase condensata sono stati ottenuti mediante diffrazione ai raggi-X,^[11,12] risonanza magnetica nucleare^[13] (NMR), o spettroscopia di fluorescenza.^[14]

In particolare, risulta interessante valutare come avviene il processo di solubilizzazione in micelle inverse, visto che la loro organizzazione è analoga a quella che si osserva in fase gas. Nel caso di una micella inversa le molecole apolari si solubilizzano con uguale probabilità sia nel solvente apolare sia sullo strato superficiale della micella. Molecole anfifiliche si solubilizzano interagendo con la loro parte apolare a contatto con le catene idrofobe e con la loro parte polare a contatto con le teste idrofile. Le molecole con un carattere prevalentemente idrofilo come le molecole polari o ioniche, infine, vengono intrappolate nel core micellare interagendo con le teste dei tensioattivi. Una raffigurazione dei processi di solubilizzazione nei differenti siti in modelli di micelle inverse viene mostrato in figura 1.5.

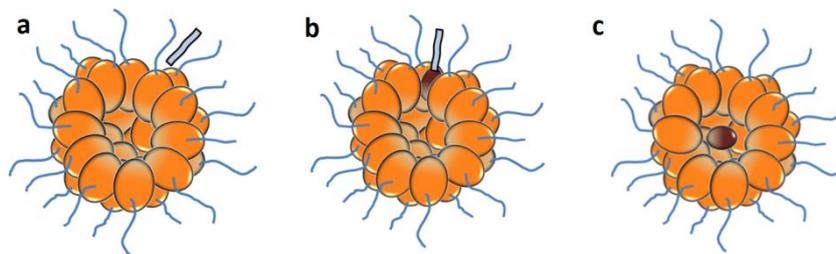


Figura 1.5: Possibili siti di solubilizzazione di a) molecole apolari, b) molecole anfifiliche e c) composti ionici o polari in micelle inverse.

Ovviamente un aumento della concentrazione di solubilizzato favorisce la formazione degli aggregati misti e l'aumento del rapporto ospite/ospitante. Oltretutto, in questi casi, l'insieme delle interazioni *host-guest*, *host-solvente*, *guest-solvente*, e dei moti molecolari, possono generare distribuzioni random o localizzate e fenomeni di clusterizzazione dell'ospite all'interno della micella (una rappresentazione pittorica di aggregati misti è mostrata in figura 1.6).

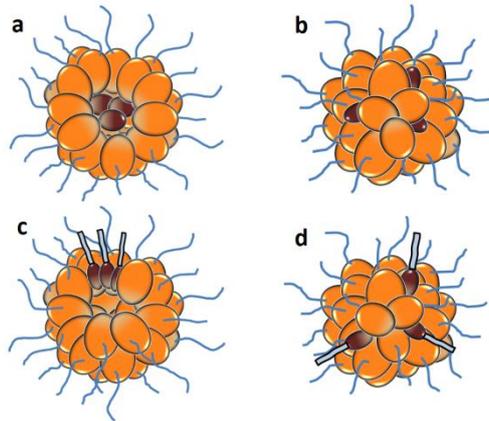


Figura 1.6: Aggregati misti formati nel processo di solubilizzazione in micelle inverse di quantità finite di molecole polari (a, b) e molecole anfifiliche (c, d). Fenomeni di clusterizzazione dell'ospite all'interno dell'aggregato sono mostrati in a e c.

In alcuni casi, in funzione della quantità, dimensione e forma delle molecole *host*, il processo di solubilizzazione richiede un cambio di forma dell'aggregato o la fusione di due o più micelle.

Infine, nel caso in cui l'ospite è una molecola di grandi dimensioni, come un polimero o una nanoparticella, l'identità dell'aggregato micellare viene parzialmente o totalmente persa. Nel caso estremo, le molecole di tensioattivo interagiscono singolarmente con i gruppi della macromolecola secondo la loro natura (Figura 1.7).

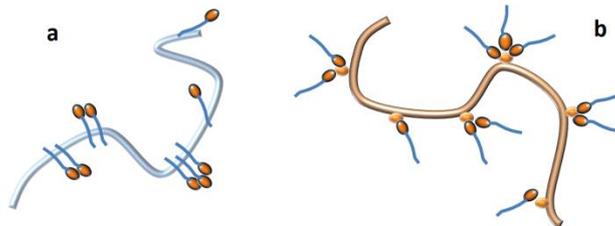


Figura 1.7: Rappresentazione schematica dell'interazione di un polimero con gruppi idrofobici (a) o idrofilici (b) in presenza degli aggregati di tensioattivo.

CAPITOLO II

Obiettivi della tesi e stato dell'arte

2.1 Scopo della tesi

Durante il triennio di dottorato, il mio interesse è stato rivolto allo studio dei processi di auto aggregazione di tensioattivi in fase gassosa e della loro capacità di solubilizzare aminoacidi, presi come molecole modello. Lo scopo principale è stato quello di caratterizzare questi sistemi in un ambiente inusuale: mentre in fase condensata la letteratura abbonda in studi, sia sul self-assembly di tensioattivi che sull'inglobamento di molecole ospite, di contro in fase gassosa sussiste una notevole carenza di informazioni sul comportamento e sulle loro proprietà chimico-fisiche. In secondo luogo, anche se non meno importante, lo studio in fase gassosa potrebbe essere di notevole aiuto nella progettazione di sistemi alternativi per il rilascio controllato di farmaci poco volatili sul tratto respiratorio o per il trasporto di agenti anti-inquinamento dell'atmosfera. Infine, questi studi possono essere di qualche utilità nella comprensione dei meccanismi molecolari responsabili dell'autoaggregazione, della nucleazione e del confinamento di specie in assenza di interazioni con l'ambiente esterno. In particolare, la ricerca è stata focalizzata su i seguenti obiettivi da raggiungere:

- Verificare la capacità di alcuni tensioattivi di auto-aggregarsi in fase gassosa, e in caso di esito positivo, stabilire l'abbondanza, la struttura e la stabilità delle varie popolazioni di aggregati. In particolare modo, è stato analizzato il comportamento di alcuni tensioattivi chirali.
- Studiare la fenomenologia che accompagna la solubilizzazione di piccole molecole come gli aminoacidi negli aggregati di tensioattivo. Particolare attenzione è stata dedicata alle possibili variazioni del comportamento degli aggregati micellari in presenza dei due enantiomeri (D- ed L-) della molecola ospite allo scopo di evidenziare fenomeni di selezione chirale e separazione enantiomerica in fase gassosa mediata da micelle chirali.

Lo studio di sistemi chirali è giustificato dal fatto che alcuni oggetti dell'universo ma soprattutto quelli del mondo biologico non sono sovrapponibili con la propria immagine speculare e che una molecola chirale si comporta diversamente dal suo enantiomero quando interagisce con un altro sistema chirale. Gli organismi viventi sono ricchi di strutture chirali fra cui anche tensioattivi, come i sali biliari sodio colato e sodio taurocolato o i surfattanti polmonari di natura fosfatidilcolinica. Le due specie enantiomeriche possiedono proprietà fisiologiche differenti, e nel caso di farmaci, proprietà farmacologiche diverse: solo uno dei due enantiomeri possiede l'effetto terapeutico, mentre l'altro può risultare inattivo, o addirittura tossico.

2.2 Aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa

Prima di discutere dei risultati conseguiti nel triennio di dottorato è importante effettuare un breve resoconto di ciò che in precedenza è stato scoperto nell'ambito degli aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa. Nei paragrafi che seguono viene rappresentato un quadro generale che mira a valutare come il processo di self-assembly dipenda sia dalle caratteristiche intrinseche del tensioattivo in esame, sia da una serie di fattori sperimentali, che rappresentano l'influenza dell'ambiente circostante.

2.2.1 Influenza della ionizzazione Elettrospray sul meccanismo di aggregazione dei tensioattivi in fase gassosa

I meccanismi molecolari che stanno alla base del processo di formazione degli aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa ne influenzano le caratteristiche e il comportamento, determinando alcune delle deviazioni rispetto a quelli in fase condensata.

Le tecniche di elezione per la produzione delle specie in fase gassosa sono le metodologie di ionizzazione soft, poiché consentono la formazione di complessi supramolecolari evitandone la frammentazione. Successivamente questi aggregati sono introdotti in uno spettrometro di massa che permette di separare ed analizzare gli ioni prodotti in funzione del loro rapporto massa su carica, m/z . Nel corso degli anni, alcune di queste tecniche si sono mostrate particolarmente adatte:

- Ionizzazione per bombardamento con atomi veloci (Fast Atom Bombardment, FAB), nel quale il campione viene miscelato ad una matrice liquida e poi bombardato con un fascio di atomi pesanti che, al momento dell'impatto, determinano un momentaneo aumento della temperatura. Questo non è sufficiente a rompere i legami chimici, ma è in grado di provocare la ionizzazione delle molecole dell'analita;
- Ionizzazione/desorbimento laser assistito da matrice (Matrix assisted Laser Desorption Ionization, MALDI), in cui il campione viene immobilizzato in una matrice cristallina in grado di assorbire radiazioni UV che, prodotte da un laser, inducono la ionizzazione delle molecole;
- Ionizzazione elettrospray (Electrospray Ionization, ESI), che di gran lunga rappresenta la tecnica più versatile ed utilizzata nello studio degli aggregati di tensioattivi in fase gassosa. Essa permette di analizzare molecole e strutture supramolecolari, di peso molecolare anche molto elevato, a partire da semplici dispersioni dell'analita in un solvente. In questo caso, oltre alla generazione di specie relativamente "fredde" e con una bassa tendenza a frammentare, la tecnica coniuga anche la facilità di preparazione dei campioni. L'apparato elettrospray è costituito da un capillare di acciaio inox alla cui estremità è applicato un voltaggio relativamente alto (2-6 kV), e attraverso il quale la soluzione

dell'analita viene nebulizzata con formazione di microgocce di solvente cariche contenenti le specie in forma ionizzata.

Il potenziale applicato determina la polarità delle microgocce, quindi se positivo, esso tende ad attrarre gli ioni negativi trattenendoli all'interno del capillare e ad allontanare gli ioni positivi, facendoli accumulare progressivamente nel solvente all'estremità del capillare. Quando le forze repulsive fra cariche uguali superano la tensione superficiale del liquido, questo si espande all'estremità assumendo la forma di un cono (cono di Taylor). Da esso si liberano le microgocce che vengono spinte in avanti grazie all'applicazione di un campo elettrico generato fra l'estremità del capillare e un contro-elettrodo costituito da un piatto contenente un orifizio in comunicazione con la zona ad alto vuoto dello spettrometro di massa (questa parte viene definita comunemente "skimmer"). Il campo elettrico nella punta del capillare può essere calcolato con la formula 2.1 elaborata da Loeb et al.^[15]

$$Ec = \frac{2V_c}{r_c \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right)} \quad \text{Eq. 2.1}$$

In cui V_c è il potenziale applicato al capillare, r_c è il raggio del capillare e d è la distanza tra l'estremità del capillare e il contro-elettrodo. Visto che, generalmente, il potenziale applicato è relativamente alto e che il diametro del capillare è molto piccolo (1 mm), gli aggregati prodotti vengono spinti sotto l'influenza di campi elettrici moderatamente elevati (circa 10^6 V/m).

Durante il tragitto verso lo spettrometro un flusso di gas inerte riscaldato (che può andare controcorrente o in corrente) provoca una rapida evaporazione del solvente. Questo fenomeno è agevolato da fluttuazioni di forma della micro-goccia che creano piccole estroflessioni dalle quali vaporizzano più facilmente le molecole volatili.^[16,17]

Si verifica quindi una progressiva riduzione del diametro delle gocce con aumento della concentrazione dell'analita e della sua densità di carica, fino a quando raggiunto un raggio limite, la repulsione supera la forza di coesione dovuta alla tensione superficiale. Questo valore è definito limite di Rayleigh, e una volta superato, le micro gocce subiscono fissione, formando goccioline cariche più piccole. Nonostante questo processo sia prevalente nella formazione degli aggregati supramolecolari non possono essere esclusi processi di fusione dovuti ad urti random tra specie solvate neutre e specie cariche. In questo caso, la collisione produce un'interazione e l'aumento delle dimensioni delle micro-gocce.

La formazione degli aggregati supramolecolari dipende quindi da un complesso equilibrio di processi di evaporazione di sostanze volatili, scissione delle goccioline, cambiamenti della

composizione e fenomeni di accomodamento della posizione relativa e dell'orientamento delle specie presenti. È importante notare che questi processi sono fortemente influenzati dalla tensione superficiale della soluzione, e nel caso dell'elettrospray di dispersioni di tensioattivo, i fenomeni di evaporazione del solvente e di riorganizzazione delle molecole mostrano dei comportamenti peculiari. Nella nebulizzazione neo-formata, ognuna delle micro-gocce può essere considerata una soluzione di tensioattivo monomero o di micelle. Ciò dipende dalla concentrazione iniziale della specie, dalla cmc del tensioattivo, ed infine, dalla polarità del solvente. Infatti, nelle micro-gocce di solventi polari, al di sotto della cmc, i tensioattivi sono presenti come monomeri liberi all'interno e alla sua superficie, mentre al di sopra della cmc anche come micelle dirette. Nelle micro-gocce di solventi apolari invece, non si ha la formazione del monostato superficiale e le micelle sono inverse. In ogni caso, l'intensa evaporazione del solvente durante il percorso in sorgente, determina uno spostamento dell'equilibrio monomeri-micelle verso la formazione di aggregati supramolecolari sempre più complessi influenzando così, la velocità di evaporazione e la densità di carica limite.^[18] Questi effetti sono responsabili del fatto che la ionizzazione elettrospray di tensioattivi permette di ottenere aggregati supramolecolari di notevole dimensioni e con carica elevata, anche partendo da soluzioni molto diluite.^[19]

Alla luce dei complessi meccanismi molecolari che stanno alla base del processo di formazione degli aggregati di tensioattivi in fase gassosa è facile prevedere quanto delicata sia la scelta delle corrette condizioni sperimentali in cui condurre l'elettrospray, visto che queste influenzano la quantità di aggregati prodotti, e la loro polidispersione in termini di dimensione e stato di carica. In particolare i parametri strumentali che influenzano il processo sono: il voltaggio applicato al capillare, il potenziale tra capillare e skimmer (definito come cone voltage o sampling cone), il flusso e la temperatura del gas di trasferimento. Per quanto riguarda le caratteristiche della soluzione, sono importanti: il tipo di solvente utilizzato, la concentrazione della soluzione di partenza e il flusso della soluzione introdotta dal capillare.

Il voltaggio applicato al capillare ha effetto prima di tutto sul tipo di carica che viene conferita alle micro-gocce (positiva o negativa) e quindi al tipo di aggregati che si formano, ma anche sull'intensità del segnale. Infatti, più alto è il voltaggio applicato, maggiore sarà la quantità di cariche conferite, maggiore sarà quindi l'accelerazione causata dal campo elettrico applicato. Tale valore, non deve essere né troppo basso, per evitare che la gocciolina in uscita dal capillare non abbia la velocità sufficiente per arrivare allo skimmer, né troppo alto, per evitare una eccessiva quantità di cariche superficiali e quindi un aumento della probabilità di esplosioni Coulombiane precoci che favoriscono la produzione di aggregati piccoli con carica bassa.

Il cone voltage rappresenta uno dei parametri più influenti, visto che, spingendo la nebulizzazione in uscita dal capillare verso l'ingresso nella zona ad alto vuoto determina la quantità e la velocità degli aggregati supramolecolari in arrivo allo spettrometro.

Potenziali elevati favoriscono il flusso delle specie e determinano un aumento dell'intensità degli aggregati prodotti, ma d'altro canto, favoriscono anche alcuni fenomeni di frammentazione in sorgente (In-Source Collision Induced Dissociation, IS-CID). Questi avvengono perché il cone voltage applicato, determina un'accelerazione delle micro-gocce aumentando la probabilità di collisioni con molecole di gas residuo in sorgente.^[20]

L'evidenza dell'impatto di questo parametro è stata comprovata già dai primi studi effettuati sui tensioattivi: soluzioni acquose di sodio taurocolato sono state nebulizzate a valori minimi e massimi di cone voltage. Per cone voltage pari a zero, gli spettri ottenuti mostravano la formazione di aggregati anche molto grandi e altamente carichi, contenenti fino a 80 molecole di tensioattivo e con stato di carica fino a +9. Al valore di voltaggio massimo, 200V, i processi di collisione in sorgente diventano predominanti e determinano la formazione di aggregati a carica singola e di più piccole dimensioni.^[21]

Un altro fattore molto importante della ionizzazione elettrospray è rappresentato dalla temperatura e dalla velocità del gas di desolvatazione. In generale viene utilizzato un flusso di azoto riscaldato che allontana le molecole di solvente facendole evaporare in maniera continua lungo tutto il tragitto fino all'ingresso nello spettrometro di massa. Ovviamente l'evaporazione del solvente avviene più facilmente quanto più esso è volatile e caratterizzato da una bassa viscosità, ed in questi casi valori di temperatura non troppo elevati possono contribuire a determinare un'evaporazione lenta che preserva l'integrità degli ioni fino all'arrivo nello skimmer. Valori di temperatura o flussi eccessivamente alti possono, invece, determinare una precoce e repentina evaporazione del solvente già negli stadi iniziali del percorso, con frammentazioni più estese e formazione di aggregati più piccoli e meno carichi. Anche la direzione del flusso di gas di desolvatazione è importante: quando il flusso è controcorrente, esso provoca un allontanamento più cospicuo delle molecole di solvente, mentre, flussi in corrente permettono un processo di evaporazione più contenuto, favorendo talvolta l'inglobamento di molecole di solvente all'interno degli aggregati carichi. Il processo di desolvatazione su aggregati di tensioattivi è stato studiato mediante simulazioni di dinamica molecolare: temperature elevate (maggiori di 500 K) inducono una frammentazione abbastanza estesa, mentre a temperature inferiori, i numeri di aggregazione delle architetture ottenute si trovano in accordo con quelli delle micro-gocce emesse inizialmente dall'apparato elettrospray simulato.^[18]

Anche il flusso della soluzione che passa attraverso il capillare ha una notevole importanza visto che, in maniera parallela alla concentrazione del tensioattivo, un aumento del flusso determina un

aumento del numero di aggregazione massimo osservato. Ciò è verosimilmente dovuto al fatto che a parità di tutte le altre condizioni sperimentali, all'estremità del capillare arriva una quantità di soluzione per unità di tempo maggiore.

Infine, non è da sottovalutare che anche la natura del solvente può influenzare gli spettri finali ottenuti. Infatti durante il processo di elettrospray entrano in gioco parametri come la tensione superficiale (γ), la viscosità e la volatilità del liquido. Nel caso di solventi polari la γ definisce il valore del potenziale necessario a permettere la fuoriuscita delle gocce dal capillare e, influenza processi di esplosione Coulombiana, una viscosità eccessivamente elevata può impedire il corretto scorrimento del solvente attraverso il capillare, mentre fluidi poco volatili o troppo volatili possono causare una scorretta generazione delle specie supramolecolari. È opportuno ricordare che, a causa della natura variegata dei tensioattivi, per ottenere il miglior risultato, tutti questi parametri devono essere adattati al tipo di sistema in esame e di aggregati che si vogliono ottenere.

2.2.2 Mirror Effect

I primi lavori che sono stati effettuati sui processi di self-assembly di tensioattivi in fase gassosa miravano ad ottenere informazioni sugli aggregati presenti nella soluzione di partenza. In realtà, come descritto nel paragrafo precedente, il processo di formazione degli aggregati in fase gassosa viene influenzato fortemente dalle condizioni sperimentali e in qualche modo dalle caratteristiche costruttive dello spettrometro di massa. Proprio per questo, piuttosto che cercare di replicare ciò che avviene in fase condensata, si è sempre di più preferito cercare una correlazione tra i risultati ottenuti in fase gassosa con quelli in soluzione (mirror effect).

Molti studi si sono concentrati sul confronto tra la massa degli aggregati in fase gassosa con quelli della soluzione di partenza, al fine di valutare se si ottenevano architetture della stessa grandezza o meno. Nohara et al. hanno riportato misure ESI/MS effettuate su aggregati ottenuti da soluzioni del tensioattivo octil-trimetil-ammonio bromuro in acqua pura ad una concentrazione di 0.5M, circa 4 volte la sua cmc.^[22,23]

La massa nominale degli aggregati ottenuti in fase gassosa si trovava in buon accordo con quella in soluzione acquosa. Gli autori hanno però riconosciuto che, a causa della marcata desolvatazione, non può essere confermato con sicurezza la presenza del mirror effect. In studi successivi, tentando di ottenere un quadro più chiaro della situazione, sono stati valutati i cambiamenti che si ottenevano in fase gassosa da soluzioni acquose del tensioattivo sodio colato contenenti una concentrazione progressivamente crescente di etanolo. Il risultato ha mostrato una dipendenza lineare della distribuzione degli aggregati del tensioattivo, dal contenuto di etanolo, portando alla conferma che il processo elettrospray può rappresentare un metodo efficace per determinare la massa delle

micelle nella fase acquosa iniziale, anche nel caso di miscele di solventi, visto che i numeri di aggregazione medi calcolati si trovavano in accordo con quelli riportati in letteratura.^[24]

Studi effettuati sul tensioattivo bis (2-etil-esil)-solfosuccinato di sodio (NaAOT) sembrano però andare in senso opposto, contraddicendo la possibilità di un effetto “specchio” della soluzione di partenza. Infatti, tenendo in considerazione che in fase condensata questo tensioattivo forma micelle dirette in solventi polari e micelle inverse in solventi apolari, si era previsto che, partendo dalle soluzioni a differente polarità (rispettivamente acqua, acqua/metanolo, metanolo ed n-esano), anche in fase gassosa dovessero scaturire delle differenze nel tipo di aggregati prodotti. In realtà, indipendentemente dalle caratteristiche della solvente di partenza e della concentrazione del tensioattivo, anche al di sotto del valore di cmc del tensioattivo, gli aggregati ottenuti hanno mostrato una piena corrispondenza, principalmente riguardo la loro distribuzione: in tutti i casi, si formavano aggregati con numero di aggregazione (N_{agg}) fino a 22. Per avere una ulteriore conferma dell'assenza del “mirror effect”, è stata indotta la frammentazione di alcuni aggregati del tensioattivo con uguale rapporto m/z, ottenuti a partire dalle soluzioni in solventi a polarità differente. Tutte le curve che descrivevano il processo di dissociazione di aggregati con $N_{agg}=3-6$ e le curve di formazione degli ioni frammento coincidevano, evidenziando chiaramente che gli aggregati del tensioattivo in fase gassosa hanno una identità strutturale ben definita indipendente dal solvente utilizzato.^[25]

Una ulteriore conferma sulla mancanza di mirror effect per il tensioattivo NaAOT, è stata ottenuta grazie ad esperimenti Infrared Multi Photon dissociation (IRMPD-MS). Dal confronto degli spettri IRMP-MS con quelli nell'infrarosso relativi a micelle inverse del tensioattivo NaAOT in tetracloruro di carbonio, ovvero in fase condensata apolare, si è dimostrato che, indipendentemente dalla polarità del solvente di partenza, gli aggregati del tensioattivo NaAOT si organizzano in fase gassosa formando strutture simili a micelle inverse.^[26]

Discordanze tra il comportamento in fase gassosa e in quella condensata riguardano anche la geometria degli aggregati. Per esempio, Borysik e Robinson hanno riscontrato una deviazione della geometria dei cluster del tensioattivo n-esil-trimetil-ammonio bromuro (6TAB) misurata sperimentalmente nel vuoto dello spettrometro di massa rispetto a quella che teoricamente si dovrebbe ottenere in fase condensata. In particolar modo, gli aggregati ottenuti nel vuoto sono risultati altamente polidispersi e caratterizzati dalla presenza di specie con diverso stato di carica e massa. Le sezioni d'urto sperimentali di questi aggregati sono state confrontate con i valori ottenuti mediante calcoli teorici relativi ad un modello di crescita isotropica sferoidale, oblata e prolata, ed è stato concluso che tutti gli aggregati del tensioattivo formati nel vuoto dello spettrometro avevano

verosimilmente geometria sferoidale, anche quando il numero di aggregazione superava di 10 volte quello previsto per una micella sferica.^[27]

Probabilmente, il modello di crescita osservato può essere razionalizzato ipotizzando che i monomeri di tensioattivo si associano formando domini polari e apolari spazialmente separati che complessivamente si arrangiano formando un aggregato sferico.^[28] Infatti, il raggio di un aggregato del 6TAB con 180 unità è risultato circa il doppio rispetto alla lunghezza del tensioattivo, presupponendo inverosimilmente, la formazione di una cavità interna vuota nella micella. Sembra quindi più ragionevole sostenere che si creino domini polari e apolari interconnessi.

Discordanze sul mirror effect sono presenti anche quando si considera la composizione degli aggregati in funzione della concentrazione nella soluzione di partenza. Studi effettuati su specie cariche contenenti una miscela di sali biliari hanno mostrato che il rapporto glicosilato/glicolato negli aggregati misti non dipende solamente dal rapporto molare delle due specie nella soluzione di partenza, ma anche da un altro importante fattore, ovvero dall'energia di Gibbs del trasferimento dei due anioni dal bulk, all'aggregato in fase gassosa: in particolare, il valore di energia libera per la ionizzazione del glicosilato è inferiore rispetto a quella del glicolato, giustificando quindi, una maggiore facilità di aggregazione.^[29]

In conclusione, sembra ormai ampiamente riconosciuto che indipendentemente dalla polarità del solvente in cui è inizialmente disperso il tensioattivo, si abbia la formazione di aggregati con struttura simile a micelle inverse.

Per i tensioattivi cetil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB) e NaAOT, è stato calcolato che l'inversione da micelle dirette in solventi polari a micelle inverse in fase gas avviene entro un intervallo di tempo dell'ordine di 1-3nsec, mentre per il tensioattivo zwitterionico fosfatidilcolina (DPC) il processo è più lento (dell'ordine delle centinaia di nanosecondi).^[30] In ogni caso però questi tempi sono molto più brevi di quelli di residenza degli aggregati nella sorgente ESI (nell'ordine dei msec) e all'interno dello spettrometro di massa (anche esso dell'ordine dei msec).

È importante ricordare che il vuoto dello spettrometro o la fase gassosa rappresentano degli ambienti apolari e che, in assenza di altre molecole circostanti, la forza trainante del self-assembly è rappresentata dalle forze elettrostatiche che si instaurano tra le teste polari dei tensioattivi, consolidando ancora una volta l'ipotesi dell'esistenza di aggregati orientati, simili alle micelle inverse che si formano in fase apolare condensata. Simulazioni di dinamica molecolare hanno evidenziato che non vi sono differenze significative per quanto riguarda il core polare della micella, mentre l'esterno costituito dalle catene alchiliche dei tensioattivi differisce sostanzialmente: in decano le catene idrofobiche protrudono nel mezzo apolare mentre in fase gassosa esse sono

collassate sulla superficie micellare, verosimilmente a causa del fatto che nel vuoto vengono meno anche le deboli interazioni tra le molecole del solvente e le catene alchiliche.^[31]

Si noti anche che le micelle inverse appaiono dall'esterno come oggetti apolari, e come tali dovrebbero avere già una bassa tendenza a coalescere. In fase gassosa questa stabilità viene coadiuvata dalla presenza di extra cariche superficiali che generano forze di repulsione elettrostatica fra aggregati, allontanandoli reciprocamente. Alcune deviazioni possono derivare dal fatto che in fase condensata gli aggregati si trovano in equilibrio termodinamico, mentre durante gli esperimenti di spettrometria essi sono in uno stato lontano da quello di equilibrio.

Come si evince da quanto detto, il processo di formazione di aggregati di tensioattivi in fase gas risulta particolarmente articolato e fenomenologicamente ricco. Esistono delle costanti comportamentali dipendenti dalle caratteristiche chimiche del tensioattivo in questione e fra queste particolare interesse rivestono la natura della testa polare, quella dell'eventuale contro ione del tensioattivo, l'ingombro sterico della catena alchilica.

2.2.3 Natura del controione ed effetto sulla struttura e sulla stabilità dell'aggregato supramolecolare in fase gassosa

Considerando che in fase gassosa la forza trainante del processo di autoaggregazione dei tensioattivi ionici è rappresentato dalle forze elettrostatiche che si instaurano fra le teste polari e i controioni, la natura di questi ultimi influenza notevolmente la stabilità e le proprietà strutturali delle specie prodotte.

Per effettuare una stima delle modificazioni derivanti dal cambio del controione sono stati analizzati i fenomeni di autoaggregazione e la frammentazione del tensioattivo NaAOT in presenza di un eccesso di sali di metalli (Me) monovalenti ($Me^I = Li, K, Rb$ e Cs), bivalenti ($Me^{II} = Ca, Mg, Ni$ e Mn) e sali di lantanidi ($Me^{III} = Er, Yb$), al fine di indurre lo scambio completo del controione sodio. Nel primo caso, gli spettri ESI full scan, rappresentanti tutte le specie separate in funzione al rapporto m/z , hanno mostrato picchi corrispondenti ad aggregati con controione totalmente o parzialmente sostituiti e ad aggregati del tensioattivo contenenti nel core piccoli cluster del sale presente nella soluzione di partenza. Le variazioni di stabilità sono state evidenziate provocando la perdita di una molecola neutra AOTMe dagli aggregati con diverso controione e confrontando il valore di energia di collisione necessario a provocare la frammentazione del 50% dello ione precursore ($CE_{50\%}$). Per gli aggregati a carica positiva la scala di stabilità ottenuta è $Li \sim Na > K > Rb > Cs$ e risulta in accordo con quella ottenuta per gli aggregati a carica negativa di tipo $[AOT_2Me]^-$ ($Na > Li > K > Rb > Cs$). Questa scala di stabilità può essere razionalizzata considerando

che controioni meno voluminosi caratterizzati da una densità di carica più alta riescono ad interagire più fortemente con le teste dei tensioattivi determinando una stabilità complessiva maggiore.^[32,33]

Allo stesso modo si è proceduto per valutare la stabilità degli aggregati del tensioattivo in presenza degli ioni bivalenti (Me^{II}) Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} e Mn^{2+} . In questo caso gli spettri ESI full scan in modalità ioni positivi, hanno mostrato picchi relativi ad aggregati che inglobavano molecole di solvente, metanolo o acqua, in modo tale da portare al completamento della sfera di coordinazione dello ione metallico. Sono state inoltre evidenziate delle significative deviazioni della stabilità rispetto agli aggregati con metalli monovalenti. Questo perché un controione con una carica maggiore esercita una forza elettrostatica più grande e un maggiore effetto di chelazione con la testa anionica del tensioattivo. La frammentazione caratteristica non consiste nella perdita di una molecola neutra AOTMe, ma nel rilascio di CO_2 in seguito alla rottura del legame $\text{H}_2\text{C}-\text{O}$ di una molecola di tensioattivo.^[34]

In modalità ioni negativi si assiste alla formazione di differenti specie monocarica. Aggregati in cui non è avvenuto scambio di controione $[\text{AOT}_n\text{Na}_{(n-1)}]^-$, aggregati contenenti solo il metallo bivalente $[\text{AOT}_{(2n+1)}\text{Me}^{\text{II}}_n]^-$ tra i quali la specie più abbondante è risultato il trimero $[\text{AOT}_3\text{Me}^{\text{II}}]^-$, aggregati misti del tensioattivo contenenti sia Na che Me^{II} , ed infine, aggregati che oltre a scambiare con il catione bivalente, inglobano anche l'anione del sale. Fra questi ultimi, la specie $[\text{AOTMe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]^-$ è stata selezionata per confrontare la differente stabilità di uno stesso aggregato in presenza di metalli bivalenti diversi. I valori delle $\text{CE}_{50\%}$ misurati sono stati $\text{Ca}=1.68\text{V}$, $\text{Mn}=1.63\text{V}$, $\text{Mg}=1.53\text{V}$ e $\text{Ni}=1.42\text{V}$, dimostrando una maggiore stabilità degli aggregati quando Me^{II} è il Ca o il Mn, e la minore stabilità degli aggregati con il Ni.

Oltretutto, il comportamento delle specie $[\text{AOTMe}^{\text{II}}\text{Cl}_2]^-$ è stato confrontato con quello degli analoghi contenenti metalli monovalenti del tipo $[\text{AOTMe}^{\text{I}}\text{X}]^-$ ($\text{Me}^{\text{I}}=\text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Cs}, \text{Rb}$; $\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$). Gli ultimi si decompongono principalmente mediante l'eliminazione di specie neutre AOTMe^IX o di frammenti 2-etil-1-esene, mentre gli aggregati del tipo $[\text{AOTMe}^{\text{II}}\text{X}]^-$ si frammentano, per energie di collisione fino a 1.7eV, perdendo la specie HX, e ad energie di collisione maggiori, con un'ulteriore perdita di $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ e formazione di un anione radicalico $[\text{C}_4\text{HO}_6\text{SMe}^{\text{II}}\text{Cl}]^{\cdot-}$ (particolarmente favorita nel caso in cui il metallo divalente è il Ca). In generale, l'energia richiesta per la dissociazione degli aggregati di tipo $[\text{AOTMe}^{\text{I}}\text{Cl}]^-$ è risultata inferiore rispetto a quella degli aggregati con metalli bivalenti, confermandone una minore stabilità.^[35]

Infine, gli esperimenti effettuati con soluzioni di $(\text{AOT})_3\text{Yb}$ e di $(\text{AOT})_3\text{Er}$ hanno dimostrato che la presenza di un controione lantanide influenza nettamente la reattività degli aggregati del tensioattivo, favorendo processi di trasposizione e reazioni intra-cluster. Per gli aggregati carichi positivamente, a bassa energia di collisione, si verificano tre possibili frammentazioni, una delle

quali consiste nella perdita di frammenti neutri $(\text{AOT})_3\text{Me}^{\text{III}}$ dallo ione precursore. Le altre due vie di frammentazione sono competitive e implicano uno la perdita di un frammento di 112 Da corrispondente ad una delle code del tensioattivo (C_8H_{16} , 2-etil-1-esene), e l'altro la perdita di un frammento di massa nominale pari a 534 Da, identificato come $\text{AOT-C}_8\text{H}_{17}$. Quest'ultima specie probabilmente si forma in seguito ad un attacco nucleofilo intra-cluster del gruppo SO_3^- di una molecola di AOT^- sulla catena laterale di un'altra molecola di tensioattivo adiacente. Alla base di questo meccanismo è plausibile che ci siano diversi fattori concomitanti, fra i quali, oltre al fattore strutturale di vicinanza delle teste polari delle molecole di tensioattivo, anche una probabilità maggiore di attacco nucleofilo del carbonio estereo dovuto ad una deficienza elettronica pronunciata, derivante dalla coordinazione dell'ossigeno carbonilico della catena β con il lantanide. Le stesse ragioni stanno alla base di un altro meccanismo che spiega la formazione della specie $\text{AOT-C}_8\text{H}_{17}$, ovvero una reazione concertata con formazione di AOT-H ed eliminazione di un alchene.^[36]

2.2.4 Influenza della porzione idrofoba sul processo di autoaggregazione e sulla stabilità

L'influenza della coda idrofoba sul processo di autoaggregazione in fase gassosa è stata valutata effettuando degli studi su una serie di composti anfifilici (sodio metan-sulfonato, sodio butan-sulfonato, sodio octan-sulfonato) caratterizzati dalla stessa testa polare del tensioattivo NaAOT di cui era nota la fenomenologia e da una singola catena alchilica di lunghezza variabile. Gli spettri full scan acquisiti nelle stesse identiche condizioni strumentali hanno mostrato andamento simile per tutte le sostanze, con presenza di picchi relativi ad aggregati monocarica con N_{agg} fino a 25. In fase gassosa, le piccole specie anfifiliche hanno mostrato una capacità di autoaggregazione simile a quella dei tensioattivi più complessi, evidenziando la scarsa influenza della lunghezza della parte apolare nel processo di self-assembly. Ciò è stato confermato dall'evidenza che gli aggregati dei tensioattivi analizzati tendevano a frammentarsi in modo analogo, perdendo unità monomeriche. Solamente negli aggregati del tensioattivo NaAOT , ad alti valori di energia di collisione, si osservano meccanismi di frammentazione con rottura di legami covalenti, come la perdita di una delle due catene alchiliche ramificate (C_8H_{16}).^[37,38]

Dal confronto dei valori di $\text{KE}_{\text{com}50\%}$ (energia di collisione normalizzata al centro di massa, ovvero alla quantità di energia interna che viene trasferita ad un aggregato nel caso di un urto totalmente anelastico con le molecole del gas di collisione) analizzati in funzione del numero di aggregazione, è stata evidenziata la loro tendenza a convergere verso un valore costante per $N_{\text{agg}} > 6$, confermando ancora una volta l'ipotesi di una limitata influenza della lunghezza della catena alchilica sulla stabilità degli aggregati più piccoli, e quasi nulla sulla stabilità degli aggregati supramolecolari più

voluminosi. La ragione di questo comportamento è da ricondursi all'idea che in fase gassosa il processo di auto-organizzazione dipende essenzialmente dalle interazioni elettrostatiche fra le teste e i controioni. Calcoli teorici effettuati sui tetrameri di metan-, butan-, octan-sulfonato e di NaAOT hanno confermato una forte preferenza per una organizzazione strutturale simile a quella di una micella inversa con un core idrofilo costituito dalle teste e dai controioni Na^+ .

D'altra parte, confrontando il comportamento di tensioattivi a singola e a doppia catena è stata evidenziata una certa influenza delle code sulla struttura dell'aggregato, in virtù del loro ingombro sterico. La presenza di due porzioni idrofobe, soprattutto se ramificate, sembra avere un effetto marcato sulla polidispersione delle specie, inibendo l'accrescimento micellare. Gli aggregati del tensioattivo NaAOT raggiungono infatti, per ogni stato di carica, un numero di aggregazione inferiore rispetto a quello degli aggregati di alchilsulfonati di sodio.^[39]

Capitolo III

Parte sperimentale

Nell'ambito del progetto di dottorato ho scelto come oggetto di studio il tensioattivo chirale (1R,2S)-dodecil(2-idrossy-1-metil-2-feniletil) dimetilammonio bromuro (DMEB) caratterizzato da biocompatibilità e il cui comportamento è stato ampiamente studiato in fase condensata sia polare che apolare^[40-42].

In acqua esso ha mostrato la capacità di formare, a concentrazioni superiori alla cmc (cmc=4mM), piccole micelle a temperature relativamente basse ($T < 28^{\circ}\text{C}$) e vescicole di grandi dimensioni o bi-layer a $T > 28^{\circ}\text{C}$.^[40] Oltretutto gli aggregati ottenuti in fase condensata sono stati utilizzati nella sintesi asimmetrica come catalizzatori a trasferimento di fase^[43] o per la risoluzione racemica attraverso cromatografia elettrocinetica micellare.^[44] Tale tensioattivo unisce facile reperibilità e costo ridotto a promettenti capacità di riconoscimento chirale.

In quest'ottica gli studi da me effettuati mirano anche alla scoperta di eventuali fenomeni di selezione fra due enantiomeri in fase gassosa, mediati da micelle.

A causa della carenza in letteratura di informazioni relative al *self-assembly* di tensioattivi in fase gassosa la caratterizzazione dei fenomeni di autoaggregazione del tensioattivo DMEB e della stabilità degli aggregati prodotti ha richiesto lo studio di altri due tensioattivi: il bis(2-etilesil)-solfosuccinato di sodio (NaAOT) e l'octansulfonato di sodio (NaOS). L'analisi effettuata con lo stesso apparato sperimentale ha permesso il loro utilizzo come sistemi di confronto. I tensioattivi decil-trimetil-ammonio bromuro (10TAB) e cetil-trimetil-ammonio bromuro (16TAB) sono stati utilizzati per la calibrazione dello spettrometro di massa.

3.1 Materiali e preparazione dei campioni

Il tensioattivo DMEB, PM=428.49 uma, formula molecolare $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{NOBr}$, è un tensioattivo cationico in cui la porzione idrofoba è una singola catena alchilica a 12 atomi di carbonio e la testa idrofila è rappresentata da un gruppo efedrinio ammonico quaternario carico, legato elettrostaticamente ad un controione bromuro. Grazie alla presenza di due stereocentri possiede caratteristiche chirali. Il prodotto utilizzato nella forma enantiomericamente arricchita con grado di purezza del 99%, è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich-Fluka (Milano) ed utilizzato senza ulteriore purificazione.

Il tensioattivo NaAOT, PM=444.56 uma, formula molecolare $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{SNa}$, è un tensioattivo anionico costituito da due catene alchiliche ramificate e una testa costituita da un gruppo solfosuccinato ed un controione sodio. Anche questo tensioattivo presenta dei centri chirali, ma in

tutti gli esperimenti è stata utilizzato il prodotto racemico con grado di purezza 98% acquistato dalla Sigma-Aldrich-Fluka (Milano).

I tensioattivi NaOS, tensioattivo anionico a singola catena puro al 99% e con PM=; 10TAB (puro al 99%) e il 16TAB (puro al 99%) sono stati prodotti dalla Sigma-Aldrich-Fluka (Milano).

In figura 3.1 sono riportate le formule di struttura dei tensioattivi utilizzati per effettuare gli esperimenti.

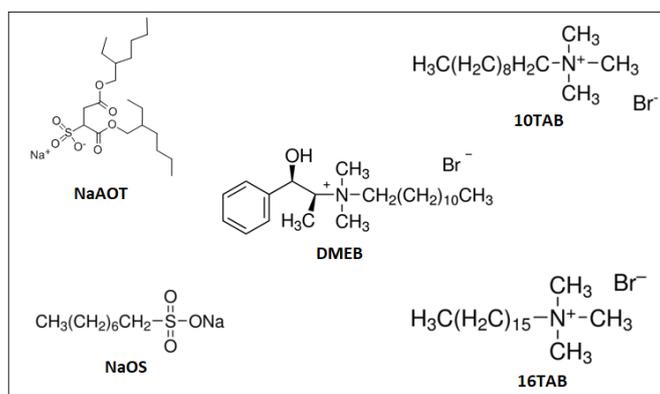


Figura 3.1: Formula di struttura dei tensioattivi NaAOT, DMEB, NaOS, 10TAB e 16TAB.

D- ed L-triptofano (Figura 3.2), PM=204.22 uma, formula molecolare $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (grado di purezza 99% e 98%, rispettivamente) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich-Fluka (Milano, Italia).

La L-serina (grado di purezza $\geq 99\%$, CELLPURE[®] e prodotta dalla Carl Roth GmbH, Germania) e la D-serina (grado di purezza 98% prodotta dalla J&K Scientific GmbH, Germania) hanno peso molecolare di 105.09 uma e formula molecolare $C_3H_7NO_3$. La loro formula di struttura è mostrata in figura 3.2.

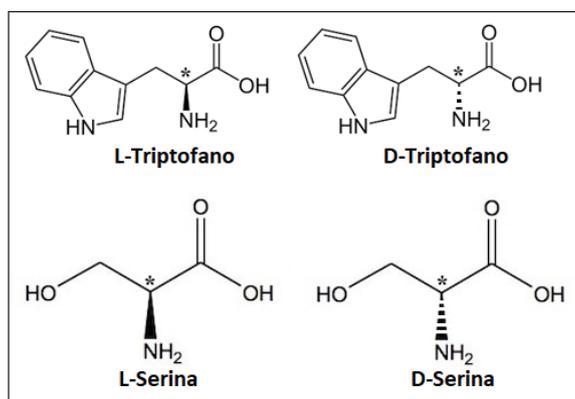


Figura 3.2: Formule di struttura degli aminoacidi D- ed L-triptofano e D- ed L-serina. I centri chirali sono stati marcati con un asterisco.

Tutti i solventi utilizzati (H_2O e MeOH) hanno un grado di purezza adatto agli esperimenti LC-MS e sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich (Germania).

Le soluzioni di tensioattivo (concentrazione 1mg/mL) utilizzate per le misure di MS e ER/MS sono state ottenute per pesata usando come solvente una miscela $H_2O/MeOH$ (50:50 v/v). Le soluzioni sono state sonicate e riscaldate leggermente per 30 min e infine lasciate equilibrare per 24h prima di effettuare le misure.

Per la preparazione delle soluzioni di DMEB in presenza di triptofano le sostanze sono state solubilizzate in una miscela acqua/metanolo (1:1 v/v), e preparate mantenendo costante il rapporto molare triptofano/DMEB (1:5) e costante la concentrazione del tensioattivo ([DMEB]= 0.00234M). Da queste soluzioni per addizione di una quantità fissata di acido formico (10 μ l in 10ml di soluzione) è stato preparato il campione acido a pH=5 e per aggiunta di una quantità fissata di trietilamina (10 μ l in 10ml di soluzione) il campione basico a pH=10. Le soluzioni contenenti meramente D- o L-triptofano e il DMEB iniziali, invece, sono stati utilizzati come campioni a pH neutro (pH=7). Anche in questo caso le soluzioni sono state sonicate e riscaldate per 30 min e lasciate equilibrare per 24 h prima di effettuare le misure di massa. I valori di pH dei campioni prodotti sono stati testati mediante strips Macherey-Nagel, ref. 92120.

La preparazione delle soluzioni di DMEB in presenza di D- ed L-serina è stata effettuata in maniera analoga, mantenendo costante il rapporto molare serina/DMEB (1:5) con una concentrazione di tensioattivo pari a 0.00234M. In questo caso sono state preparate solamente le soluzioni a pH basico (mediante aggiunta di NaOH).

3.2 Apparecchiature e metodi

3.2.1 Misure di spettrometria di massa in mobilità ionica e mediante spettrometro a quadrupolo-tempo di volo. Condizioni sperimentali utilizzate.

La ionizzazione elettrospray si è dimostrata fin da subito un ottimo metodo per la generazione degli aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa. L'interfacciamento con uno spettrometro di massa permette poi la separazione delle specie prodotte in funzione del loro rapporto m/z e infine la loro identificazione. Considerando aggregati che hanno tutti lo stesso stato di carica z, la separazione avviene sulla base della differente massa m, e quindi in funzione del numero di aggregazione. Le specie che hanno diverso stato di carica z, ma uguale rapporto m/z non possono essere risolte dai comuni apparati spettrometrici e si sovrappongono negli spettri ottenuti, rendendo difficile la relativa analisi.

Dagli anni '60 è stata sviluppata una nuova tecnica che si basa sugli stessi principi della separazione elettroforetica, ovvero la spettrometria di mobilità ionica (IMS). Essa consiste nella separazione

delle specie ioniche che si muovono attraverso un gas target, sotto l'influenza di un campo elettrico. La velocità di migrazione dipende dal campo elettrico applicato, dalla massa e carica dello ione, e dalla sezione d'urto Ω legata alle sue caratteristiche strutturali come la forma e la dimensione: uno ione con una conformazione arrotolata avrà una mobilità maggiore e un tempo di attraversamento (drift time, t_D) minore, dello stesso ione in una conformazione allungata. L'accoppiamento di una cella di drift con uno spettrometro di massa (IM-MS) permette una serie di vantaggi come poter effettuare la separazione di isomeri e isobari, conoscere la sezione d'urto delle specie e quindi la loro geometria e permettere la separazione delle specie con uguale m/z .

La maggior parte degli studi effettuati nell'ambito dei tre anni di dottorato sono stati condotti utilizzando uno spettrometro di massa in mobilità ionica Synapt G2-Si HDMS[®] prodotto dalla Waters (Manchester, UK), interfacciato ad una sorgente elettrospray. In figura 3.3 è mostrata una sezione trasversale dello spettrometro che permette di individuare la posizione delle varie celle. L'utilizzo di questo spettrometro ha reso possibile un'analisi completa degli aggregati supramolecolari dei tensioattivi studiati con particolare riferimento alle specie multicarica e ad eventuali variazioni di sezione d'urto derivanti dall'inglobamento delle specie.

La cella di mobilità ionica è inserita in una zona particolare dello strumento chiamata TRIWAVE[™] che comprende 4 sezioni principali:

- Una cella di intrappolamento (Trap Cell), contenente Argon ad una pressione di 10^{-2} mbar e che può fungere, o semplicemente da sistema di passaggio e raccolta degli ioni diretti verso la cella di mobilità, o tramite applicazione di un potenziale elettrico variabile, da cella di frammentazione.
- Una cella di mobilità ionica vera e propria (IMS cell), che è strutturalmente simile alle celle IMS tradizionali ma che possiede una tecnologia di propagazione del campo elettrico, brevettata dalla Waters, chiamata "travelling wave" (sistema TWIMS[™]) grazie alla quale viene applicato un campo elettrico ad un singolo segmento iniziale della cella, e poi questo viene propagato sequenzialmente nei segmenti successivi, nella direzione della migrazione degli ioni. Quindi gli ioni vengono trascinati lungo la cella ogni volta che il campo elettrico passa attraverso essi. In questo modo è possibile applicare campi elettrici elevati ed ottenere una buona risoluzione dei picchi.^[45] Il gas buffer utilizzato per effettuare la separazione in funzione della sezione d'urto è l'azoto, ad una pressione di circa 2-3mbar.
- Una cella riempita di elio (Helium Cell) posta prima della IMS cell e direttamente comunicante con essa, permette di mantenere una elevata pressione di N_2 nella cella di mobilità impedendo al gas di fluire fuori trascinando le specie.^[46]
- Una cella di trasferimento (Transfer Cell) posta dopo la cella di mobilità ionica e contenente gas argon alla pressione di 10^{-2} mbar e che può essere utilizzata come una seconda cella di collisione.

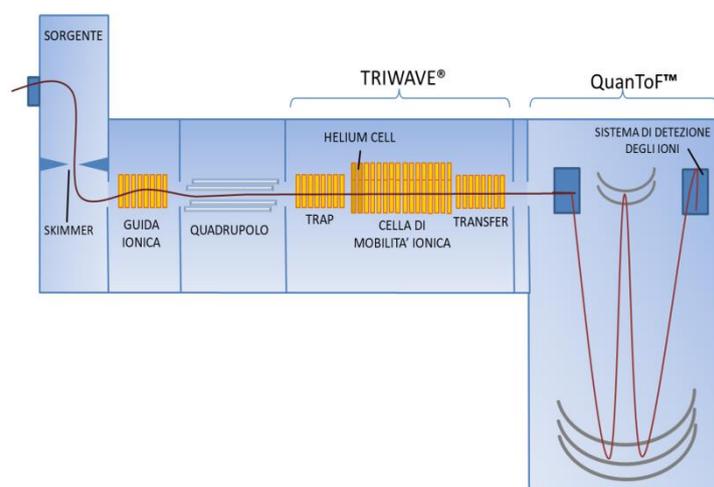


Figura 3.3: Sezione trasversale dello spettrometro di massa in mobilità ionica Synapt G2-Si HDMS®.

In figura 3.3 può essere anche osservato il comune quadrupolo seguito dalla TRIWAVE™ contenente la zona di mobilità ionica. Le specie in uscita separate secondo la loro massa, carica e sezione d'urto entrano infine in una cella definita QuanToF™ nella quale le specie vengono focalizzate e spinte verso il sistema di detenzione rappresentato da un sistema ibrido fotomoltiplicatore di elettroni e detector elettronico ADC (analogic-digital converter).

Ogni esperimento termina quindi con l'acquisizione di un grafico contenente i drift time in funzione del rapporto m/z o del tempo di ritenzione della specie, definito comunemente come mobilogramma che viene analizzato tramite il software Driftscope™ (versione utilizzata 2.8). Mediante l'opportuno strumento di selezione, sono stati isolate le parti di mobilogramma contenenti tutte le specie con uno stesso stato di carica ed esportate su MassLynx™, ottenendo così lo spettro di massa full scan di aggregati con uno stesso stato di carica. L'abbondanza di ogni specie è stata calcolata, effettuando la centratura dei picchi, utilizzando l'apposito strumento fornito dal programma, esportando la lista delle abbondanze relative ai picchi isotopici di ogni specie su file Microsoft Excel, ed effettuando la somma dei picchi, calcolati come area.

Spesso i mobilogrammi presentano delle lunghe strisce verticali di colore blu che si estendono verso valori di m/z maggiori e che sono, dovute a fenomeni di condensazione degli ioni a durante la loro espansione libera. La presenza di linee rosse verticali che si estendono verso il basso, invece, sono attribuite all'evaporazione di specie neutre.^[47,48]

Per quanto riguarda la scelta delle condizioni sperimentali, prima dell'acquisizione degli spettri definitivi, sono state effettuate delle misure preliminari in modo tale da trovare la corretta

combinazione dei parametri strumentali per ottimizzare il processo di elettrospray, la separazione in mobilità ionica ed infine la rivelazione delle specie.

Gli spettri ESI full scan in modalità ioni positivi e negativi delle soluzioni di DMEB, NaAOT e del tensioattivo NaOS sono stati registrati sotto le seguenti condizioni operative: temperatura in sorgente 80°C, voltaggio applicato al capillare 3kV, voltaggio applicato al sampling cone 45V, temperatura di desolvatazione 150°C, flusso del gas di desolvatazione 600.0 L/h. La cella di mobilità è stata regolata in modo che il flusso di Argon nella Trap Cell fosse pari a 0.4 mL/min, il flusso del gas nella Helium Cell di 197.5 mL/min e il flusso di gas Argon nella cella di mobilità pari a 60 mL/min.

Per l'acquisizione degli spettri full scan del sistema DMEB/Triptofano (D- ed L-), prima di ogni acquisizione, lo strumento è stato accuratamente pulito con una soluzione metanolo/acqua (1:1 v/v) in modo da evitare miscelamenti in-line fra le soluzioni contenenti D-triptofano ed L-triptofano e ogni soluzione DMEB/triptofano è stata infusa durante l'elettrospray con una velocità di flusso di 10µL/min per un tempo sufficiente ad ottenere uno spettro costante. In questo caso sono stati acquisiti solamente gli spettri in modalità ESI (+) sotto le seguenti condizioni operative: temperatura della sorgente 70 °C, voltaggio applicato al capillare 3.5 kV, voltaggio di cono 35 V, temperatura del gas di desolvatazione 70 °C, flusso del gas in sorgente 0.0 L/hr, flusso del gas del cono 50.0 L/hr, flusso del gas di desolvatazione 600.0 L/hr. Per quanto riguarda le condizioni operative della TRIWAVE, il flusso di gas (Argon) presente nella Trap cell e nella Transfer cell è stato 0.4 mL/min, il flusso di gas nella Helium cell a 200 mL/min, e il flusso del gas (azoto) nella cella di mobilità a 45 mL/min. Dai mobilogrammi ottenuti sono stati estratti cromatogrammi di 118 scansioni ciascuno. Visto che gli studi sul sistema DMEB-Triptofano miravano a valutare la presenza o meno di fenomeni di selezione chirale in fase gassosa tramite il confronto delle abbondanze delle specie ottenute, in questo caso sono state calcolate le deviazioni standard relative all'abbondanza degli aggregati. Tale valore è compreso fra l'1% per le specie più abbondanti (abbondanza > 5*10⁵ conteggi) e il 7% per le specie meno abbondanti (abbondanza di circa 2*10³ conteggi).

3.2.2 Misure di stabilità degli aggregati: costruzione delle curve di frammentazione e di comparsa e condizioni sperimentali utilizzate.

Le tecniche di ionizzazione soft coinvolgono processi a bassa energia che permettono la formazione di complessi non covalenti riducendo al minimo la frammentazione degli ioni precursori. Dagli spettri full scan è poi possibile avere informazioni sulla composizione e abbondanza delle varie popolazioni di aggregati formati in sorgente. Informazioni sulla stabilità degli aggregati vengono

ottenuti con esperimenti di massa tandem (definiti anche di dissociazione indotta dalla collisione, CID). Una specie prodotta durante l'elettrospray (ione precursore) viene selezionata mediante l'analizzatore, soggetta ad un potenziale di accelerazione (V) e inviata nella cella di collisione che contiene un gas inerte (Argon). In funzione dell'energia di collisione (CE, $CE=V*z$, dove z è la carica dello ione) e in seguito ad urti con le molecole del gas, la specie selezionata subisce una frammentazione più o meno marcata. Maggiore è l'energia della collisione, più estesa sarà la frammentazione della specie selezionata. Gli esperimenti di spettrometria di massa risolta in energia (ER-MS) che si effettuano variando progressivamente la CE applicata, partendo da un valore minimo che attiva pochi canali di frammentazione ad un valore massimo per il quale lo ione precursore è completamente frammentato. In questo modo si possono ottenere delle informazioni dettagliate riguardanti la stabilità della specie. La frammentazione di specie con uguale rapporto m/z e carica differente può essere effettuata nella Transfer Cell, previa separazione nella cella di mobilità ionica.

Per l'analisi dei dati, sono state selezionate le zone del mobilogramma relative alla frammentazione dello ione precursore con lo stato di carica desiderato e ottenuti i cromatogrammi nei quali ogni intervallo di tempo corrisponde all'applicazione di un valore di CE. L'abbondanza delle specie è stata ottenuta mediando un uguale numero di scansioni per ogni valore di energia di collisione ed effettuando la centratura dei picchi e sommando l'intensità di ogni picco isotopico della specie. Infine, per ogni valore della CE, è stata calcolata la percentuale dello ione precursore e degli ioni figlio dividendo l'abbondanza dell'aggregato sull'abbondanza totale delle specie compreso lo ione precursore. Sono state quindi costruite le curve di sopravvivenza dello ione precursore (SY), e le curve di formazione degli ioni figlio (Y), ovvero i grafici delle abbondanze relative del precursore e degli ioni frammento in funzione della CE, applicando rispettivamente le equazioni 3.1 e 3.2.

$$SY = \frac{I_M}{I_M + \sum I_F} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$Y = \frac{I_F}{I_M + \sum I_F} \quad \text{Eq. 3.2}$$

Nel caso delle specie multicarica, i valori delle energie di collisione sono stati moltiplicati per lo stato di carica z dello ione precursore.

La frammentazione di aggregati con carica maggiore di 1 può generare ioni figlio con uguale rapporto m/z e differente stato di carica. Visto che la frammentazione viene effettuata nella Transfer Cell non si ha più la possibilità di separarli per mobilità ionica e la loro sovrapposizione rende più

complesso il calcolo dell'abbondanza. È stato quindi sviluppato un software di deconvoluzione basato sul principio che le specie singola carica mostrano un andamento del pattern isotopico con picchi che si distanziano di una unità di massa e le specie multicarica di valori frazionari (per esempio 0.5 per i doppia carica, 0.33 per i tripla carica, 0.25 per i quadrupla carica, e così via), e che l'altezza di ogni picco isotopico rappresenta la somma delle abbondanze di specie sovrapposte. Questo contributo è stato simulato utilizzando uno strumento del software MassLynx™ 4.1. Il programma ha permesso di automatizzare la seguente procedura:

- Il pattern isotopico del frammento con il più alto stato di carica è stato moltiplicato per un fattore di riduzione (RF) ottenuto dal rapporto fra le abbondanze sperimentali e le abbondanze teoriche relative ai picchi isotopici liberi da interferenze degli altri stati di carica. Nel caso di un picco in cui si sovrappongono le specie 3^{1+} , 6^{2+} e 9^{3+} , il primo picco libero da interferenze per la specie tripla carica si trova a $P+0.33$, e per la specie doppia carica a $P+0.5$. In questo modo si sono ottenute le abbondanze dei picchi isotopici relativi alla specie a più alto stato di carica.

- A questo è stata sottratta l'abbondanza sperimentale dei picchi su cui avviene la sovrapposizione.

- Il processo viene ripetuto sequenzialmente considerando i contributi di tutti gli stati di carica fino al più basso. L'accuratezza del processo di deconvoluzione è stata calcolata come media dei rapporti fra le abbondanze sperimentali e quelle ottenute sommando i contributi teorici dei vari frammenti. Tale valore si è mantenuto tra 0.9 e 1.1.

Gli esperimenti ER-MS effettuati sugli aggregati del tensioattivo NaAOT sono stati acquisiti nelle seguenti condizioni sperimentali: temperatura in sorgente 80°C, voltaggio applicato al capillare 3 kV, cone voltage 35 V, temperatura di desolvatazione 70°C, flusso del gas in sorgente 0.0 L/hr, flusso del gas di cono 50.0 L/hr, flusso del gas di desolvatazione 600.0 L/hr.

Le condizioni relative al sistema TRIWAVE™: flusso di gas (Ar) nella Trap cell pari a 0.4 mL/min, flusso nella Helium cell 180 mL/min, flusso di gas nella IMS cell pari a 40 mL/min. Pressione nella Trap cell pari a $1.55 \cdot 10^{-2}$ mbar, nella cella di mobilità ionica di 2.13 mbar e nella Transfer cell pari a $1.63 \cdot 10^{-2}$ mbar. Altezza e velocità dell'onda nella Trap cell rispettivamente pari a 4.0 V and 311 m/s, nella IMS pari a 40.0V e 1000 m/s, e infine, nella Transfer cell rispettivamente di 4.0 V e 85 m/s. La corrente DC in entrata ed in uscita alla Trap cell pari a 0.0 V and 3.0 V.

Gli esperimenti di spettrometria di massa risolta in energia (ER-MS) effettuati per la costruzione delle curve di frammentazione e di comparsa degli aggregati di DMEB sono stati effettuati utilizzando le seguenti condizioni: temperatura della sorgente 80°C, voltaggio applicato al capillare 3 kV, cone voltage 35 V, temperatura di desolvatazione 70°C, flusso del gas in sorgente 0.0 L/h, flusso del gas di cono 50.0 L/h, flusso del gas di desolvatazione 600.0 L/h. Per la TRIWAVE™ i parametri utilizzati sono stati: flusso di gas nella Trap Cell 0.4 mL/min, flusso di gas nella Helium

cell 180 mL/min e flusso di gas nella cella IM 40 mL/min, pressione del gas nella trap cell $1.55 \cdot 10^{-2}$ mbar, pressione nella cella IMS 2.13 mbar, pressione nella Transfer cell $1.63 \cdot 10^{-2}$ mbar. Altezza e velocità dell'onda nella Trap cell rispettivamente 4.0 V e 311 m/s. Altezza e velocità dell'onda nella cella IMS rispettivamente 40.0 V e 1000 m/s. Tali parametri nella Transfer cell rispettivamente di 4.0 V and 85 m/s. I voltaggi in entrata e in uscita nella Trap cell sono stati settati rispettivamente a 0.0 V and 3.0 V. Le risoluzioni LM (low mass) e HM (high mass) del quadrupolo sono state regolate a 4.9 e 15. Il voltaggio di collisione della Trap Cell, pari a 4 V, corrisponde al valore di default dello strumento. I valori del voltaggio di collisione della Transfer Cell sono stati variati da 5 V a 180 V.

3.2.3 Misura delle sezioni d'urto (Ω) degli aggregati e condizioni sperimentali utilizzate.

La cella di mobilità ionica permette di effettuare la separazione delle specie non solo in funzione del rapporto m/z , ma anche della loro sezione d'urto. In relazione alle caratteristiche costruttive della cella di mobilità ionica non sempre è possibile ricavare direttamente i valori delle Ω ma diventa necessaria una calibrazione dello strumento. Essa può essere effettuata mediante l'acquisizione dei valori di drift time di specie con sezione d'urto nota.

Il sistema TWIMS del Synapt G2-Si in cui il campo elettrico che determina la migrazione degli aggregati carichi è poco uniforme, rientra in questo caso. La relazione che collega i valori delle Ω e quelli dei drift time è (equazione 3.3):

$$\Omega = z \left(\frac{1}{M_I} + \frac{1}{M_N} \right)^{0.5} A t_D^B \quad \text{Eq. 3.3}$$

in cui z è lo stato di carica dello ione, M_I e M_N sono rispettivamente la massa dello ione e del gas di collisione (N_2), A una costante che dipende dalle condizioni sperimentali (temperatura, pressione, campo elettrico), e B è il fattore che tiene in considerazione gli effetti di non-linearità dell'onda di trasmissione.

Ponendo (equazione 3.4):

$$\Omega^* = \frac{\Omega}{z \left(\frac{1}{M_I} + \frac{1}{M_N} \right)^{0.5}} \quad \text{Eq. 3.4}$$

L'equazione 3.4 può essere espressa in una forma indipendente dalla massa e dallo stato di carica (equazione 3.5):

$$\Omega^* = At_D^B \quad \text{Eq. 3.5}$$

Diagrammando il logaritmo di Ω^* in funzione del t_D infine si ottiene un andamento lineare, ovvero la retta di calibrazione, in cui le specie cariche con stesso valore di drift time hanno lo stesso valore di Ω^* .

I valori di Ω nota dei calibranti 10TAB e 16TAB sono stati gentilmente forniti dal Prof. Antoni Borysik (Dipartimento di Chimica, King's College London). Sono stati acquisiti i mobilogrammi degli aggregati calibranti, ed estrapolato mediante il software DriftscopeTM, i valori sperimentali dei loro drift time. Questi sono poi stati utilizzati nella costruzione delle rette di calibrazione per specie mono- e multicarica. Nelle stesse condizioni della cella di mobilità ionica, si sono poi ottenuti i valori dei drift time degli aggregati di DMEB che per estrapolazione sulle rette di calibrazione hanno permesso di risalire ai relativi valori delle Ω . Misure replicate effettuate sui valori dei tempi di deriva concordando con uno scarto di ± 0.2 ms.

Gli aggregati del tensioattivo DMEB di cui è stata ottenuta la sezione d'urto, sono stati utilizzati a loro volta come sostanze calibranti nel calcolo delle Ω delle specie miste DMEB/triptofano.

Le condizioni della cella di mobilità ionica utilizzate per l'acquisizione degli spettri del DMEB e dei due calibranti 10TAB e 16TAB sono: ampiezza e velocità dell'onda nella Trap cell rispettivamente di 4.0 V 311 m/s, nella IMS rispettivamente di 40.0V e 800 m/s, e nella Trasfer cell rispettivamente 4.0 V e 85 m/s. La corrente DC in entrata e in uscita dalla Trap Cell pari a 0.0 V e 3.0 V. Le soluzioni dei tensioattivi 10TAB e 16TAB sono stati nebulizzate mediante una sorgente nano-spray, costruttivamente simile ad una sorgente elettrospray e che permette di utilizzare condizioni più delicate e aumentare il segnale degli aggregati prodotti. I parametri utilizzati sono stati: flusso di 800 nL/min, pressione del flusso 0.4 bar e temperatura di desolvatazione 25°C.

Per le l'ottenimento delle sezioni d'urto degli aggregati misti DMEB/Triptofano sono state utilizzate le seguenti condizioni sperimentali: altezza e velocità dell'onda nella Trap Cell rispettivamente 4.0 V e 311 m/s. L'altezza e la velocità dell'onda della cella IMS rispettivamente 40.0 V e 800 m/s e nella Transfer cell, rispettivamente di 4.0 V e 85 m/s. Il voltaggio DC in entrata e in uscita alla Trap Cell pari a 3.0 V e 0.0 V.

Capitolo IV

Risultati e discussione

4.1 Caratterizzazione degli aggregati di tensioattivi in fase gassosa

Il primo obiettivo del mio dottorato di ricerca è consistito nel verificare se i tensioattivi scelti avessero effettivamente la capacità di autoaggregarsi in seguito al processo di elettrospray e, in caso di esito positivo, effettuare una caratterizzazione delle specie ottenute.

4.1.1 Fenomeni di autoaggregazione del tensioattivo (1R,2S)-(-)-N-dodecil-N-dimetil-efedrinio bromuro (DMEB).

Il mobilogramma ottenuto dall'elettrospray del tensioattivo DMEB, mostrato in figura 4.1, conferma la capacità di questa molecola di autoaggregarsi in fase gassosa e produrre specie a differente stato di carica (z).

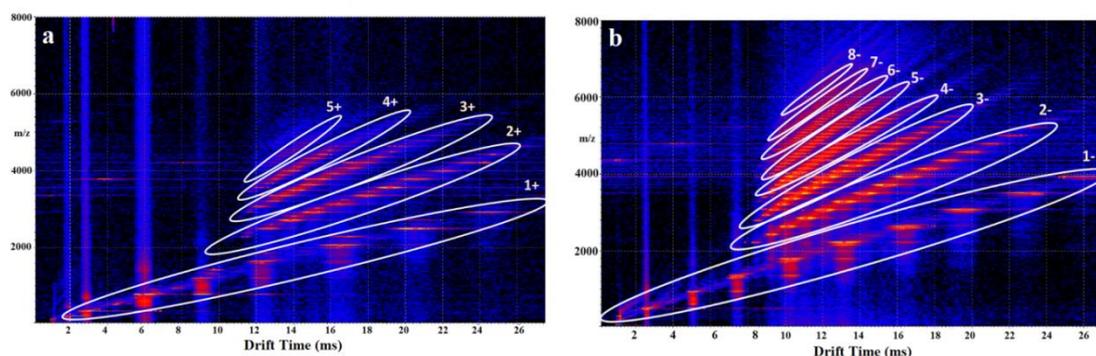


Figura 4.1: Mobilogrammi HDMS, ottenuti mediante il software DriftScope, degli aggregati con carica positiva (a) e negativa (b).

Per ciascun aggregato di DMEB la carica è dovuta ad un eccesso (per aggregati carichi negativamente) o ad un difetto (per quelli carichi positivamente) di ioni bromuro. Come si può osservare lo stato di carica massimo (z_{\max}) raggiunto dagli aggregati a carica negativa è $z_{\max} = -8$ e per gli aggregati a carica positiva pari a $z_{\max} = +5$. Per comprendere il motivo di questa differenza è stato studiato il comportamento dell'NaAOT, e dell'octansulfonato di sodio, entrambi tensioattivi anionici. I mobilogrammi (Figura 4.2) acquisiti nelle stesse condizioni sperimentali hanno mostrato per le due specie anioniche un comportamento opposto rispetto a quello del tensioattivo cationico DMEB. Infatti, lo stato di carica più alto per il tensioattivo NaAOT è $z_{\max} = +4$ in ESI (+) e $z_{\max} = -2$ in ESI (-), mentre per il tensioattivo NaOS $z_{\max} = +8$ in ESI (+) e $z_{\max} = -7$ in ESI (-).

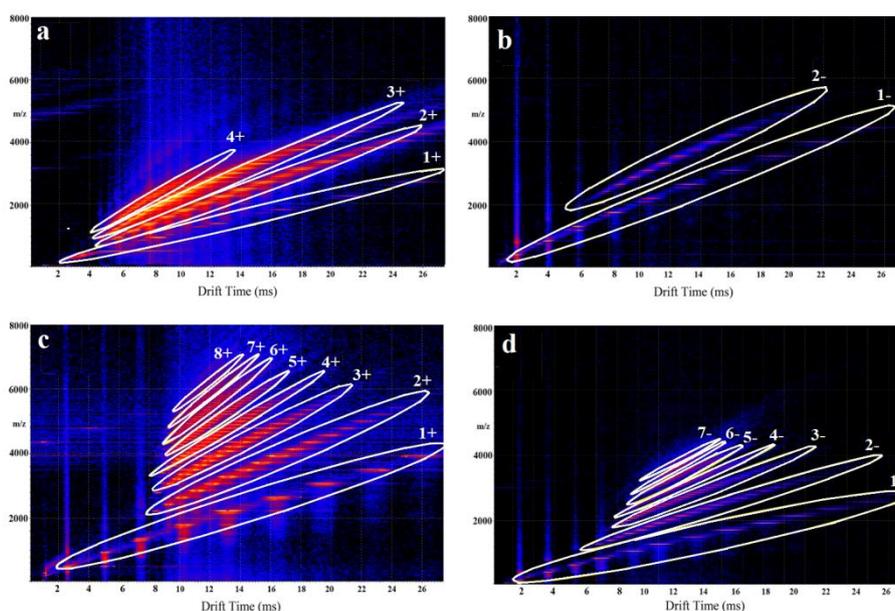


Figura 4.2: Mobilogramma HDMS estratto dal software DriftScope per gli aggregati carichi di NaAOT in modalità ioni positivi (a) e negativi (b); e per gli aggregati carichi di NaOS in modalità ioni positivi (c) e negativi (d)

Questo risultato mette in evidenza che la forza trainante del processo di autoaggregazione in fase gassosa è rappresentata dalle interazioni elettrostatiche tra le teste del tensioattivo e i controioni, per cui un eccesso di questi ultimi ha un effetto stabilizzante mentre una loro carenza ha un effetto destabilizzante.

In figura 4.3 viene mostrato lo spettro di massa degli aggregati a carica positiva e negativa di DMEB a diverso stato di carica. Differenti picchi scaturiscono dalla sovrapposizione di specie con uguale rapporto m/z e diverso stato di carica.

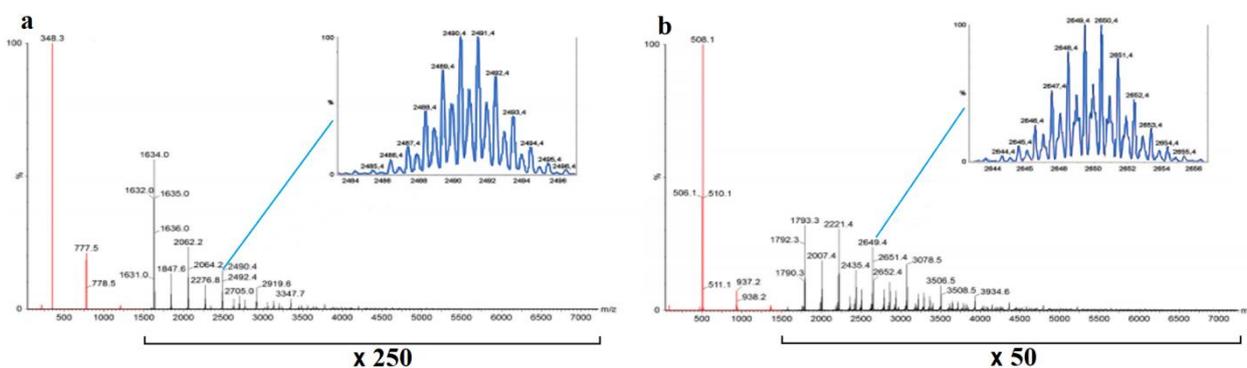


Figura 4.3: Spettro ESI full scan del DMEB in modalità ioni positivi (a) e negativi (b). L'inserto mostra l'ingrandimento dei picchi a m/z 2490 e m/z 2694 rispettivamente in modalità ESI (+) ed ESI (-)

(-) evidenziando la sovrapposizione dei picchi dovuti agli aggregati a diverso stato di carica. Per esempio $N_{agg}=6$ $z=1$; $N_{agg}=12$ $z=2$; $N_{agg}=18$ $z=3$.

Questa sovrapposizione è stata eliminata selezionando, mediante l'apposito tool, le diverse zone del mobilogramma contenenti gli aggregati con uguale stato di carica e ottenendo così spettri di massa contenenti picchi corrispondenti a singole specie. Si è proceduto quindi all'assegnazione della composizione dell'aggregato e del numero di aggregazione sulla base del rapporto m/z e della forma del picco isotopico.

I dati sperimentali hanno mostrato l'assenza di specie deprotonate fra gli aggregati carichi negativamente indicando la mancanza di protoni fortemente acidi. D'altra parte, l'assenza di aggregati protonati fra quelli carichi positivamente suggerisce che non vi sono siti fortemente basici nel tensioattivo. Inoltre dall'analisi dei picchi, non compaiono nemmeno specie solvate, avvalorando l'ipotesi che le interazioni solvente-tensioattivo sono più deboli rispetto a quelle tensioattivo-tensioattivo.

Una volta definite le composizioni dei vari aggregati e il loro stato di carica, sono stati ricavati i valori della loro abbondanza. Questi dati sono mostrati in funzione del numero di aggregazione, ovvero del numero di molecole di tensioattivo presenti nell'aggregato, in figura 4.4.

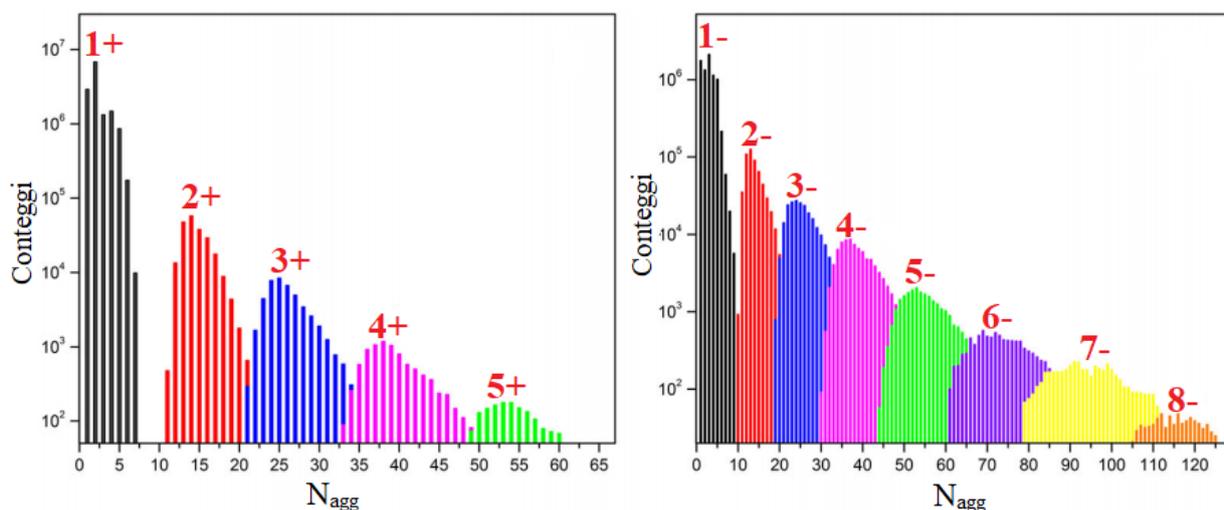


Figura 4.4: Abbondanza degli aggregati di DMEB in funzione del numero di aggregazione in modalità ioni positivi (a) e ioni negativi (b).

Come si può notare, all'aumentare dello stato di carica l'abbondanza complessiva degli aggregati diminuisce, comportamento che si trova in accordo con precedenti simulazioni di dinamica molecolare che confermano una maggiore probabilità dell'insorgenza di processi di frammentazione

in sorgente all'aumentare dello stato di carica posseduto dall'aggregato, come conseguenza della loro minore stabilità.^[49]

La cosa più interessante da notare è che, per ogni stato di carica, l'abbondanza delle specie aumenta all'aumentare del numero di aggregazione fino a raggiungere un valore massimo, oltre il quale diminuisce. Si osserva quindi un campo di esistenza degli aggregati per ogni stato di carica z e solo una limitata sovrapposizione fra la fine del campo di esistenza di un determinato stato di carica e l'inizio dello stato di carica successivo. Analogo comportamento è stato evidenziato negli spettri di massa di bromuri di alchil trimetil ammonio ottenuti da Borysik e Robinson (tabella 4.1).

Tabella 4.1: Numero di aggregazione minimo e massimo per ogni stato di carica in modalità ioni positivi e negativi degli aggregati del tensioattivo DMEB.

z	$N_{agg,min}$	$N_{agg,max}$	z	$N_{agg,min}$	$N_{agg,min}$
1+	1	7	1-	1	9
2+	11	22	2-	10	25
3+	20	39	3-	19	42
4+	33	51	4-	30	58
5+	47	65	5-	44	74
			6-	61	92
			7-	79	111
			8-	101	128

Il limite inferiore di ogni campo di esistenza, ovvero il numero di aggregazione più piccolo per uno stato di carica z (maggiore di 1) può essere facilmente razionalizzato considerando che al di sotto di una dimensione limite la repulsione fra cariche di segno uguale è così grande da rendere instabile l'aggregato. Al contrario risulta meno intuitiva l'esistenza di un limite superiore, tenendo soprattutto in considerazione che per ogni stato di carica, all'aumentare del numero di aggregazione la probabilità di processi di emissione di ioni o di esplosioni Coulombiane dovrebbe diminuire.

Una spiegazione plausibile riguardo l'esistenza di un limite superiore per ogni stato di carica è stata proposta da De La Mora e prende in considerazione i processi con cui gli aggregati vengono prodotti in sorgente.^[50,51] Infatti, durante la ionizzazione elettrospray, la popolazione di specie cariche si forma attraverso una serie di processi a cascata a partire da un progenitore di carica e massa elevata: la sua decomposizione porta alla formazione di specie con uno stato di carica più basso e/o un numero di aggregazione più piccolo. I processi di decomposizione in sorgente possono avvenire in due modi differenti: tramite un "meccanismo ad emissione di ioni" (IEM), ovvero attraverso l'eiezione sequenziale di singoli ioni che si allontanano dall'aggregato, o tramite un

“meccanismo di carica residua” (CRM) che corrisponde ad una esplosione Coulombiana ovvero all’espulsione contemporanea di diversi frammenti carichi e/o neutri.^[52-55]

Secondo il meccanismo IEM, un aggregato progenitore con carica z^* e numero di aggregazione N_{agg}^* vicini al limite di Rayleigh può decomporsi emettendo un controione e portando alla formazione di un aggregato con stato di carica z^*-1 e uguale numero di aggregazione. Questa specie rappresenterebbe il limite massimo del campo di esistenza degli aggregati con stato di carica z^*-1 . L’emissione di una molecola di tensioattivo ionico produrrebbe invece un aggregato con carica pari a z^*-1 e numero di aggregazione N_{agg}^*-1 .

Verosimilmente, avvicinandosi sempre di più al limite di Rayleigh, a causa dell’aumento della densità di carica diventa maggiore la probabilità di decomposizione tramite emissione di uno ione, con aumento dell’abbondanza di specie con $N_{agg} < N_{agg,max}$ e stato di carica z^*-1 . Queste considerazioni spiegano non solo l’esistenza del limite inferiore e superiore di ogni campo di esistenza, ma anche l’andamento delle intensità degli aggregati con stesso stato di carica e la limitata sovrapposizione fra stati di carica adiacenti. Infine, l’espulsione di piccoli aggregati singola carica genera tutte le altre specie con stato di carica z^*-1 e N_{agg} compreso nel range $N_{agg,max} > N_{agg} > N_{agg,min}$.

Il meccanismo CRM prevede una drastica frammentazione degli aggregati con formazione di una popolazione di specie cariche a diverso numero di aggregazione e stato di carica. Per un progenitore vicino al limite di Rayleigh questo processo dovrebbe generare sempre una specie a minore stato di carica e numero di aggregazione. Risulta verosimile quindi che la popolazione di aggregati carichi di tensioattivi con diverso stato di carica e numero di aggregazione ottenuta mediante elettrospray riflette l’azione combinata di meccanismi IEM e CRM.

Da un confronto tra il comportamento degli aggregati del tensioattivo DMEB e quelli dei tensioattivi NaAOT e NaOS si nota che il massimo numero di aggregazione per ogni stato di carica è influenzato dall’ingombro sterico della catena alchilica (vedi Tabella 4.2).

Tabella 4.2: Valori massimi del numero di aggregazione ($N_{agg,max}$) e dello stato di carica (Z_{max}) dei tensioattivi DMEB, NaAOT e NaOS.

	DMEB	NaAOT	NaOS
$Z_{max} (+)$	+5	+4	+8
$N_{agg, max} (+)$	65	22	119
$Z_{max} (-)$	-8	-2	-7
$N_{agg, max} (-)$	128	21	141

I tensioattivi a singola catena DMEB e NaOS raggiungono infatti un numero di aggregazione massimo maggiore rispetto al tensioattivo con due code NaAOT.^[56] Infine, i valori del $N_{\text{agg,max}}$ raggiunti da tensioattivi a singola catena per uno stesso stato di carica sembrano dipendere principalmente dalla natura della testa polare e poco dalla lunghezza della catena alchilica.

4.1.2 Pattern di frammentazione e stabilità in fase gassosa degli aggregati supramolecolari del tensioattivo NaAOT

La caratterizzazione degli aggregati di tensioattivi in fase gas è proseguita ottenendo informazioni riguardo la loro stabilità rispetto sia ai processi di rottura delle interazioni intermolecolari sia a possibili reazioni intra-cluster.

La stabilità degli aggregati multipla carica di NaAOT è stata studiata mediante simulazioni di dinamica molecolare,^[49,57] e la frammentazione di specie a singola carica positiva e negativa mediante esperimenti ER-MS su uno spettrometro a quadrupolo-TOF.^[37,38] Sia in modalità ESI (-) che ESI (+) la frammentazione preferenziale degli aggregati singola carica consiste nella perdita consecutiva di monomeri del tensioattivo neutro (o l'eiezione in un unico step di n-meri neutri). Per alti valori della energia di collisione, in modalità ioni negativi, si osservano processi di trasposizione all'interno di un singolo cluster che coinvolgono il gruppo carbonilico e che determinano la perdita di octene (112 Da).

Per lo studio delle specie a carica multipla positiva, sono stati scelti come rappresentativi gli aggregati 5^{2+} , 7^{2+} , 9^{2+} , 11^{2+} , 13^{2+} , 15^{2+} per i doppia carica, 8^{3+} , 11^{3+} , 13^{3+} , 15^{3+} , 17^{3+} e 19^{3+} per i tripla carica e 13^{4+} , 14^{4+} e 15^{4+} per i quadrupla carica.

Gli aggregati doppia carica di NaAOT hanno mostrato, per bassi valori di CE, perdita di molecole di tensioattivo neutro, mentre, ad alti valori dell'energia di collisione, processi di frammentazione con separazione di carica. Lo spettro medio dell'aggregato 5^{2+} (m/z 1133), mostrato come inserto in figura 4.5, presenta picchi relativi a ioni figlio con rapporto m/z 467 (1^{1+}), 911 (2^{1+} e 4^{2+}), 1355 (3^{1+}) e 1799 (4^{1+}). Per CE pari a 30 eV la deconvoluzione del picco a m/z 911, attribuibile alla sovrapposizione delle specie 2^{1+} e 4^{2+} , evidenzia che il contributo della specie 4^{2+} è del 75% e quello del 2^{1+} del 25%.

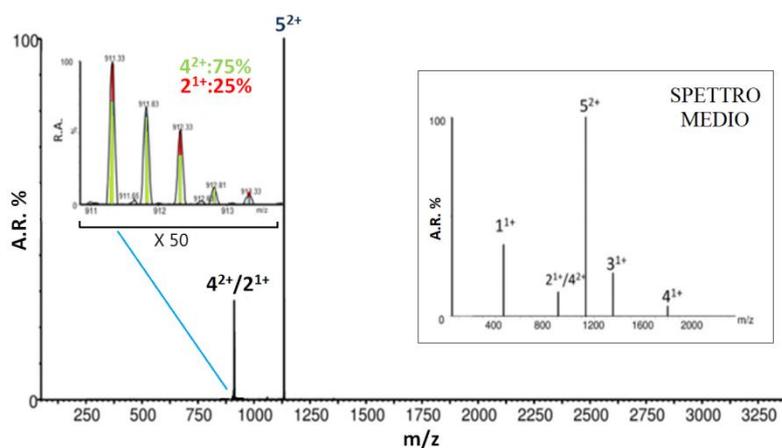


Figura 4.5: Spettro MS-MS relativo alla frammentazione dell'aggregato 5^{2+} dell'NaAOT ottenuto per la CE di 30 eV. Negli inserti è mostrato il pattern isotopico del picco a m/z 911 corrispondente alla sovrapposizione delle specie 2^{1+} e 4^{2+} e lo spettro medio (30–90 eV).

La formazione preferenziale del frammento 4^{2+} risulta abbastanza sorprendente visto che esso possiede una elevata densità di carica. In realtà, la sua esistenza è stata confermata mediante calcoli teorici ed esperimenti IRMPD.^[49] Per valori più elevati di CE (60-70 eV) i processi di frammentazione con separazione di carica e formazione di specie complementari ($4^{1+}/1^{1+}$ e $3^{1+}/2^{1+}$) diventano predominanti.

Anche l'aggregato 7^{2+} mostra un comportamento simile a quello del 5^{2+} . La deconvoluzione del picco a m/z 1355 corrispondente alla sovrapposizione delle specie 3^{1+} e 6^{2+} rivela che il contributo del doppia carica, alla CE di 30 eV, è pari all'85%.

Nel caso della specie 9^{2+} l'unico canale di frammentazione a bassa CE è la perdita di consecutiva di neutri NaAOT con formazione degli ioni figlio 8^{2+} , 7^{2+} e in piccola quantità, 6^{2+} . Ad alte energie di collisione prevalgono i processi con separazione di carica che generano 5^{1+} e 4^{1+} e, in seguito a frammentazioni consecutive anche 3^{1+} e 1^{1+} . Proseguendo con gli aggregati 11^{2+} , 13^{2+} e 15^{2+} si denota un progressivo aumento della tendenza a frammentarsi per rilascio di molecole neutre divenendo l'unico canale di dissociazione a basse CE.

Nel caso degli aggregati tripla carica più piccoli, la frammentazione con separazione di carica è favorita anche per valori relativamente bassi di CE. In particolare gli aggregati 8^{3+} , 11^{3+} e 13^{3+} generano un frammento doppia carica più voluminoso e un frammento singola carica più piccolo. Eccetto per la specie 8^{3+} , la perdita di neutri dallo ione precursore è comunque osservata in quantità limitata.

A bassa CE (15eV) lo spettro MS-MS relativo alla specie 17^{3+} (rappresentato in figura 4.6) mostra come la frammentazione caratteristica sia la perdita di neutri con formazione degli ioni figlio 16^{3+} , 15^{3+} e 14^{3+} . Ad elevate energie di collisione la dissociazione per separazione di carica diventa più

efficiente con produzione di specie singola carica a basso numero di aggregazione. Un comportamento simile è stato osservato anche per le specie 15^{3+} e 19^{3+} . L'abbondanza dei frammenti tripla carica $(n-1)^{3+}$ aumenta con la dimensione dell'aggregato precursore probabilmente grazie ad un aumento della distanza tra cariche di segno uguale e quindi a minori repulsioni elettrostatiche.

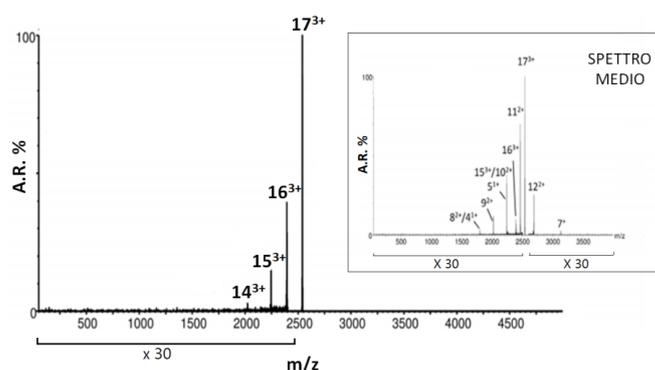


Figura 4.6: Spettro MS-MS a 15 eV relative alla frammentazione dell'aggregato 17^{3+} . Nell'inserto è mostrato lo spettro medio (15-180 eV).

Le specie quadrupla carica sono risultate quasi totalmente frammentate già al più basso valore di energia di collisione applicato (16 eV, corrispondente ad un valore del voltaggio di collisione di 4 V), e per questo motivo la frammentazione delle specie 13^{4+} , 14^{4+} e 15^{4+} è stata analizzata solo tramite lo spettro medio. Non avvengono più perdite di molecole neutre, e si verificano solamente frammentazioni con separazione di carica. Oltretutto, al contrario di quanto avviene per le specie tripla carica, si producono specie doppia carica abbastanza simmetriche (ovvero di simile grandezza): per la specie 13^{4+} si formano principalmente il 6^{2+} e il 7^{2+} (lo spettro medio viene mostrato in figura 4.7); per la specie 14^{4+} il 7^{2+} , $1^{8^{2+}}$ e il 6^{2+} , mentre per la specie 15^{4+} si formano gli ioni figlio 9^{2+} e 8^{2+} .

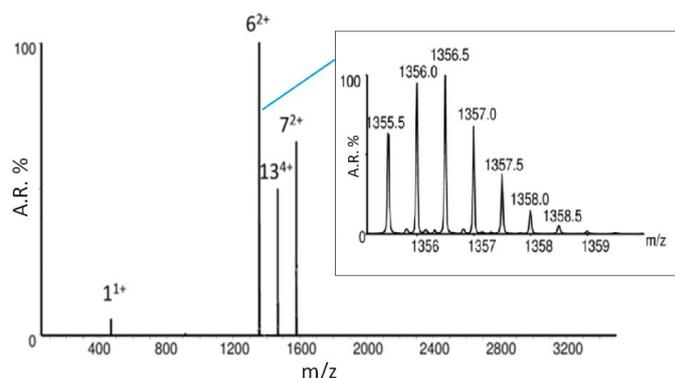


Figura 4.7: Spettro medio relativo alla frammentazione della specie 13^{4+} .

La formazione di specie simmetriche suggerisce che i controioni in eccesso sono distribuiti equamente nel core idrofilico in modo da minimizzare le repulsioni Coulombiane.

Gli aggregati supramolecolari del tensioattivo NaAOT in modalità ioni negativi esistono fino allo stato di carica $z = -2$. Gli esperimenti ER-MS sono stati quindi effettuati sulle specie doppia carica 11^{2-} , 13^{2-} , 15^{2-} e 17^{2-} . Al contrario di quanto avviene per gli aggregati multicarica positivi, la frammentazione delle specie negative è sempre caratterizzata da un collasso strutturale dell'architettura supramolecolare che porta alla formazione di piccoli frammenti monocarica (principalmente 1^{1-} e 2^{1-}) e in quantità minore alle specie $(n-1)^{1-}$ e $(n-1)^{2-}$. La formazione di monomero e dimero monocarica avviene probabilmente tramite una simultanea perdita molecole di tensioattivo neutro NaAOT, oppure, in accordo con le simulazioni di dinamica molecolare^[57] attraverso la formazione di frammenti complementari singola carica che decompongono ulteriormente portando alla formazione di monomeri e dimeri monocarica. Il comportamento mostrato risulta analogo a quello delle specie a singola carica negativa e il collasso strutturale è consistente con la loro minore stabilità rispetto ad aggregati carichi positivamente. Ciò è da attribuirsi ad una differente localizzazione di controioni Na^+ e teste polari nel core micellare e al minore numero di interazioni elettrostatiche attrattive.^[38,56,58]

Gli esperimenti ER-MS effettuati sugli aggregati multicarica di NaAOT hanno evidenziato una competizione tra i meccanismi di frammentazione per perdita di neutri e per separazione di carica. La dinamica molecolare fornisce informazioni qualitative e semi-quantitative accettabili per i processi a separazione di carica (ad esclusione dei processi di frammentazione consecutivi) ma non riesce a prevedere pienamente la perdita di frammenti neutri. Per approfondire questo aspetto quindi, sono state esaminate due frammentazioni competitive dell'aggregato 5^{2+} descritte dalle reazioni 4.1 in cui avviene perdita di una molecola neutra, e 4.2 in cui si ha separazione di carica:



L'abbondanza normalizzata (R) degli ioni figlio 4^{2+} ($R_{4^{2+}}$) e 4^{1+} ($R_{4^{1+}}$) è stata calcolata rispettivamente tramite le equazioni 4.1 e 4.2.

$$R_{4^{2+}} = \frac{I_{4^{2+}}}{I_{4^{1+}} + I_{4^{2+}}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$R_{4^{1+}} = \frac{I_{4^{1+}}}{I_{4^{1+}} + I_{4^{2+}}} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Il trend ottenuto al variare della CE è mostrati in figura 4.8.

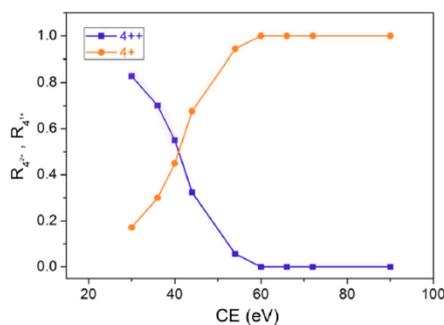


Figura 4.8: Abbondanza normalizzata degli ioni figlio 4^{2+} e 4^{1+} in funzione della CE.

Si può osservare come la perdita di neutri è favorita a $CE < 40$ eV mentre la frammentazione per separazione di carica predomina a $CE > 40$ eV. A bassa energia di collisione esiste una bassa probabilità di reazioni consecutive e il rapporto delle abbondanze normalizzate $4^{2+}/4^{1+}$ con buona approssimazione corrisponde al rapporto delle costanti cinetiche k_1/k_2 relative alle reazioni 4.1 e 4.2. Il punto di intersezione degli andamenti rappresenta quindi il valore di CE al quale la velocità di formazione degli ioni 4^{2+} e 4^{1+} diventa la stessa ($CE=39.2$ eV).

Bisogna anche considerare che in seguito alla riduzione della repulsione elettrostatica e all'aumento statistico della probabilità di rilascio di NaAOT, i processi con perdita di molecole neutre diventano competitivi rispetto alla separazione di carica all'aumentare del numero di aggregazione. Infatti, per CE comprese fra 30 e 50 eV gli ioni $(n-1)^{2+}$ sono responsabili del 90-100% dell'abbondanza totale dei frammenti per gli aggregati doppia carica con $n \geq 7$.

Anche le specie tripla carica eccetto l'aggregato più piccolo ($N_{agg}=7$) si frammentano a bassa CE (15eV) con perdita di NaAOT. In queste condizioni solo lo 0.5% dello ione precursore è frammentato, ma le specie $(n-1)^{3+}$, $(n-2)^{3+}$ e $(n-3)^{3+}$ provenienti dalla frammentazione degli aggregati 15^{3+} , 17^{3+} e 19^{3+} per perdita di neutri rappresentano più dell'80% degli ioni frammento totali.

Calcolando la percentuale di formazione (S%) di uno ione tramite l'equazione 4.3 in cui I_F è l'abbondanza dello ione frammento e la somma è estesa all'abbondanza di tutti i frammenti:

$$S\% = \frac{I_F}{\sum I_F} \times 100 \quad \text{Eq. 4.3}$$

la S% calcolata per gli ioni di tipo $(N_{agg}-1)^{3+}$ decresce rapidamente all'aumentare della CE, fino al valore di 90 eV al quale diventa nulla.

Reazioni caratterizzate da elevata energia di attivazione e alto fattore di frequenza come il clivaggio, sono favorite per aggregati ad elevata energia interna. Processi di riarrangiamento possiedono bassa energia di attivazione e ridotto fattore di frequenza e risultano favoriti in aggregati con bassa energia interna. E' stato quindi ipotizzato che l'eliminazione di neutri dagli aggregati di NaAOT venga assistita da un processo di riarrangiamento in cui le molecole di tensioattivo adiacenti a quella eliminata si legano, preservando la struttura micellare. La formazione di questi nuovi legami riduce l'energia di attivazione per la perdita di NaAOT.

I processi a separazione di carica provocano la rottura dell'aggregato e la formazione di due frammenti carichi senza un significativo riarrangiamento, rientrando nel caso di reazioni con più alta energia di attivazione e fattore di frequenza. In definitiva, la frammentazione degli aggregati doppia e tripla carica di NaAOT può essere spiegata qualitativamente in accordo con la figura 4.9 in cui è mostrato l'andamento della costante di velocità (k) dei due tipi di frammentazioni al variare dell'energia interna (E_{int}).

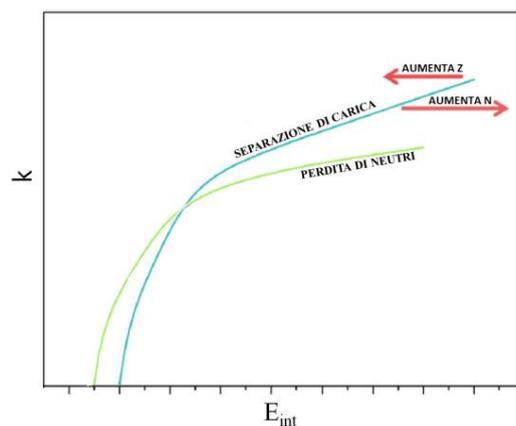


Figura 4.9: Rappresentazione schematica della costante di velocità k in funzione della E_{int} per i processi di frammentazione con separazione di carica e perdita di neutri.

L'energia interna dell'aggregato è proporzionale alla CE applicata e può essere previsto che a bassi valori prevalgono i processi con perdita di neutri e ad alti quelli con separazione di carica. Oltretutto, la curva relativa alla frammentazione per separazione di carica subisce uno spostamento a sinistra all'aumentare dello stato di carica e uno spostamento a destra all'aumentare del numero di aggregazione. La mancanza di questo shift per l'altra curva implica che un aumento di z favorisce la separazione di carica mentre un aumento del N_{agg} favorisce la perdita di neutri.

Infine, è stato effettuato un confronto dei valori delle $CE_{50\%}$ degli aggregati monocarica e multipla carica positiva e negativa. I dati in funzione del numero di aggregazione della specie sono mostrati in figura 4.10 (il confronto fra le specie monocarica e quelle multipla carica è stato fatto in virtù delle identiche condizioni sperimentali utilizzate durante gli esperimenti). È stata quindi definita la

seguinte scala di stabilità: $N_{agg}^{1+} > N_{agg}^{1-} > N_{agg}^{3+} > N_{agg}^{2-} > N_{agg}^{4+}$. Questo andamento riflette una diminuzione di stabilità all'aumentare dello stato di carica e una maggiore labilità degli aggregati a carica negativa rispetto a quelli carichi positivamente.

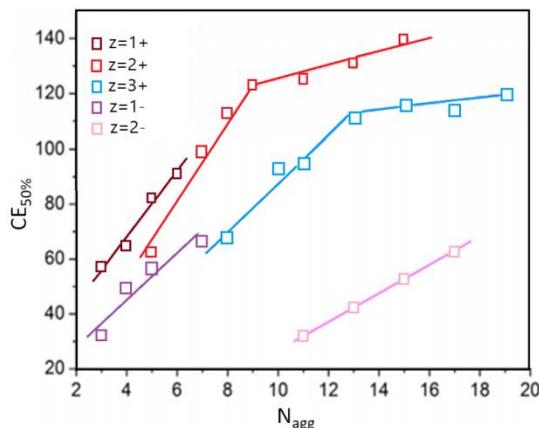


Figura 4.10: Valori delle $CE_{50\%}$ degli aggregati singola e multipla carica dell'NaAOT in funzione del numero di aggregazione (n). Le linee continue sono solamente una guida per gli occhi.

Osservando il grafico si nota che il trend delle $CE_{50\%}$ di aggregati positivi multicarica è caratterizzato da un iniziale rapido incremento seguito da un tratto con una pendenza minore per $z=+2$ e pressappoco costante per $z=+3$. Questo comportamento riflette tre contributi principali:

- 1) L'effetto dei gradi di libertà (Degree of Freedom Effect, DOF).^[59] L'energia acquisita dall'aggregato al momento dell'urto viene rapidamente distribuita su tutti i gradi di libertà vibrazionali con conseguente incremento lineare dei valori di $CE_{50\%}$ all'aumentare del numero di aggregazione.
- 2) L'effetto di repulsione fra cariche di segno uguale confinate nell'aggregato. La stabilità degli aggregati multicarica aumenta proporzionalmente al volume e diminuisce con l'incremento di z . Per numeri di aggregazione elevati, questo effetto tende a ridursi o a scomparire del tutto.^[60]
- 3) L'effetto statistico. L'aumento del numero di aggregazione implica un aumento statistico dei possibili canali di frammentazione.

Non si può escludere che il cambiamento di pendenza potrebbe derivare da variazioni strutturali o di geometria dell'aggregato.

I valori di $CE_{50\%}$ degli aggregati con $z=1+$ mostrano un andamento lineare e una pendenza minore rispetto ai positivi multicarica a causa dell'assenza di repulsione tra cariche di segno uguale. Il trend lineare osservato per gli aggregati doppia carica negativi è verosimilmente dovuto alla mancanza di piccoli aggregati e dell'effetto di repulsione elettrostatica.

4.1.3 Pattern di frammentazione e stabilità in fase gassosa degli aggregati supramolecolari del tensioattivo DMEB

Dopo aver studiato la fenomenologia riguardante i processi di auto aggregazione del DMEB in fase gassosa, gli stati di carica raggiunti, il numero di aggregazione e la presenza dei limiti superiore ed inferiore, lo studio di questo tensioattivo è proseguito con la valutazione della stabilità e dei pattern di frammentazione degli aggregati in fase gassosa al fine di ottenere informazioni riguardanti la loro struttura e stabilità.

I dati sperimentali mostrano che gli aggregati monocarica del DMEB, sia in modalità ioni positivi che ioni negativi, si frammentano perdendo specie neutre e lasciando come aggregato complementare una specie singola carica, con numero di aggregazione più piccolo. A basse energie di collisione ($CE_{10\%}$) è generalmente favorita la perdita di una singola molecola neutra. Tale perdita diventa ancora più marcata ad alte energie di collisione ($CE_{90\%}$) generando così un aumento dell'intensità di aggregati più piccoli (monomero e dimero monocarica). Sulla base dei dati ottenuti non è possibile affermare se la perdita di specie neutre dallo ione precursore avvenga in un unico step o attraverso delle espulsioni consecutive, ma considerando che il numero di frammenti carichi che si formano durante l'esperimento MS/MS aumenta all'aumentare del numero di aggregazione del precursore e che si attivino quindi più canali di frammentazione, risulta altamente probabile che la perdita delle specie neutre avvenga per step consecutivi.

La correlazione fra i valori delle $CE_{50\%}$ e il numero di aggregazione evidenziano un trend abbastanza lineare (figura 4.11) che indica un comportamento degli aggregati di DMEB simile a quello degli aggregati supramolecolari di altri sulfonati di sodio.^[59]

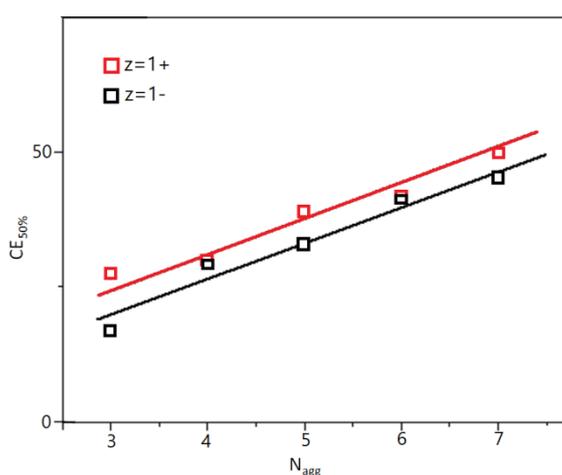


Figura 4.11: Valori delle $CE_{50\%}$ per gli aggregati monocarica positivi ($z=1+$) e negativi ($z=1-$) del tensioattivo DMEB in funzione del numero di aggregazione.

Infatti, in accordo con la teoria RRKM^[61,62] elaborata da Rice Ramsperger e Kassel, che descrive reazioni unimolecolari in fase gassosa al momento della collisione con il gas target, l'energia acquisita dagli aggregati non covalenti di tensioattivi viene rapidamente distribuita su tutti i gradi di libertà dell'aggregato. La frammentazione avviene quando l'aggregato ha accumulato una quantità di energia vibrazionale sufficiente a rompere parte delle interazioni intermolecolari che lo stabilizzano. L'aumento dei valori delle CE_{50%} (in modalità ioni positivi e negativi) all'aumentare del numero di aggregazione può essere, quindi, principalmente attribuito al parallelo aumento del numero di gradi di libertà (effetto DOF). D'altro canto bisogna osservare che i valori delle CE_{50%} degli aggregati a carica negativa del DMEB sono più alti dei valori per gli aggregati a carica positiva con uguale numero di aggregazione, suggerendo una maggiore stabilità dei primi. Ciò presuppone che è richiesta una quantità di energia più elevata per l'allontanamento delle molecole neutre di tensioattivo dall'aggregato carico negativamente rispetto a quella richiesta dagli aggregati carichi positivamente e che l'aggiunta di due ioni Br⁻ all'aggregato a carica positiva accresce complessivamente le interazioni elettrostatiche attrattive.

Che la CE_{50%} risulta essere un parametro affidabile per testare la stabilità degli aggregati è stato confermato mediante calcoli di dinamica molecolare delle energie di binding (E_{bind} calcolate come $E_{\text{agg}} - N_{\text{agg}}E_{\text{DMEB}}^+$ ovvero come differenza tra l'energia potenziale dell'aggregato e quella di N_{agg} cationi del tensioattivo). Le E_{bind} diagrammate in funzione del numero di aggregazione mostrano un andamento simile a quello riportato nel grafico in figura 4.11. Oltretutto, le stesse simulazioni MD mostrano che, all'aumentare del numero di aggregazione, l' E_{bind} aumenta di una quantità pressoché costante (circa 5eV sia per gli aggregati a carica negativa che positiva) e ciò risulta plausibile in vista del fatto che l'energia di interazione nasce da un bilancio fra le forze attrattive fra le teste polari del tensioattivo e il controione negativo Br⁻ e le forze di natura repulsiva testa-testa e coda-coda. Infine, per ogni aggregato, il valore della CE_{50%} è più grande rispetto alla corrispondente E_{bind} , enfatizzando che solo una frazione dell'energia che provoca la frammentazione è effettivamente incanalata nei moti interni dell'aggregato.

Nella tabella 4.3 sono riportati i principali frammenti derivanti dalla decomposizione degli aggregati con le relative percentuali sia a bassi valori dell'energia di collisione (CE_{10%}) sia ad alta energia di collisione (CE_{90%}), ottenuti per gli aggregati singola carica del DMEB.

Tabella 4.3: Principali frammenti a bassi ed alti valori di CE ottenuti dalla frammentazione degli aggregati singola carica del DMEB. Sono anche inclusi i valori delle $CE_{50\%}$.

AGGREGATO	FRAMMENTI A BASSA CE	FRAMMENTI AD ALTA CE	$CE_{50\%}$	AGGREGATO	FRAMMENTI A BASSA CE	FRAMMENTI AD ALTA CE	$CE_{50\%}$
3¹⁺	2 ¹⁺ (97.1%) 1 ¹⁺ (2.9%) $CE_{10\%}=11.32$	2 ¹⁺ (93.3%) 1 ¹⁺ (6.7%) $CE_{90\%}=22.38$	16.8	3¹⁻	2 ¹⁻ (58.9%) 1 ¹⁻ (37.7%) Br(3.4%) $CE_{10\%}=21.07$	1 ¹⁻ (78.2%) 2 ¹⁻ (21.2%) Br(0.6%) $CE_{90\%}=33.45$	27.4
4¹⁺	2 ¹⁺ (68.5%) 3 ¹⁺ (28.8%) 1 ¹⁺ (2.7%) $CE_{10\%}=22.81$	2 ¹⁺ (84.3%) 3 ¹⁺ (9%) 1 ¹⁺ (6.7%) $CE_{90\%}=36.40$	29.6	4¹⁻	3 ¹⁻ (99.5%) 2 ¹⁻ (0.2%) 1 ¹⁻ (0.2%) Br(0.1%) $CE_{10\%}=22.7$	3 ¹⁻ (83.7%) 1 ¹⁻ (9.0%) 2 ¹⁻ (7.1%) Br(0.2%) $CE_{90\%}=35.1$	29.8
5¹⁺	4 ¹⁺ (74.2%) 2 ¹⁺ (16.8%) 3 ¹⁺ (8.8%) 1 ¹⁺ (0.2%) $CE_{10\%}=26$	2 ¹⁺ (73.8%) 4 ¹⁺ (15.7%) 3 ¹⁺ (6.5%) 1 ¹⁺ (4%) $CE_{90\%}=41.91$	32.9	5¹⁻	4 ¹⁻ (59.2%) 3 ¹⁻ (32.6%) 2 ¹⁻ (2.8%) 1 ¹⁻ (2.8%) Br(2.6%) $CE_{10\%}=32.42$	3 ¹⁻ (66%) 4 ¹⁻ (21.3%) 1 ¹⁻ (7.5%) 2 ¹⁻ (5%) Br(0.2%) $CE_{90\%}=44.75$	39.0
6¹⁺	5 ¹⁺ (81%) 4 ¹⁺ (12.8%) 2 ¹⁺ (5.8%) 3 ¹⁺ (0.2%) 1 ¹⁺ (0.2%) $CE_{10\%}=34.35$	5 ¹⁺ (41.8%) 4 ¹⁺ (27.1%) 2 ¹⁺ (26%) 3 ¹⁺ (4.3%) 1 ¹⁺ (0.8%) $CE_{90\%}=48.43$	41.3	6¹⁻	5 ¹⁻ (85.8%) 4 ¹⁻ (6.6%) 3 ¹⁻ (2.6%) 2 ¹⁻ (2.5%) 1 ¹⁻ (2.5%) $CE_{10\%}=33.31$	5 ¹⁻ (52.1%) 4 ¹⁻ (22.7%) 3 ¹⁻ (21.5%) 2 ¹⁻ (2.1%) 2 ¹⁻ (1.6%) $CE_{90\%}=49.49$	41.8
7¹⁺	6 ¹⁺ (68.3%) 5 ¹⁺ (23.8%) 4 ¹⁺ (3.2%) 2 ¹⁺ (2%) 1 ¹⁺ (2%) 3 ¹⁺ (0.7%) $CE_{10\%}=35.38$	5 ¹⁺ (37.6%) 4 ¹⁺ (23.4%) 6 ¹⁺ (22.3%) 2 ¹⁺ (12.1%) 3 ¹⁺ (3.8%) 1 ¹⁺ (0.8%) $CE_{90\%}=56.29$	45.4	7¹⁻	6 ¹⁻ (77.4%) 5 ¹⁻ (18.8%) 4 ¹⁻ (1.2%) 3 ¹⁻ (1.2%) 1 ¹⁻ (1.2%) 2 ¹⁻ (0.2%) $CE_{10\%}=40.93$	5 ¹⁻ (49.2%) 6 ¹⁻ (20.1%) 4 ¹⁻ (13.9%) 3 ¹⁻ (13.9%) 1 ¹⁻ (2.7%) 2 ¹⁻ (0.2%) $CE_{90\%}=58.17$	49.8

Per gli aggregati doppia carica, in modalità ioni positivi sono state selezionate le specie 10^{2+} , 12^{2+} , 14^{2+} , 16^{2+} ed in modalità ioni negativi le specie 11^{2-} , 12^{2-} , 14^{2-} , 16^{2-} . Queste specie sono state scelte come rappresentative dei vari aggregati ma anche perché caratterizzate da un'abbondanza sufficientemente alta. Gli esperimenti MS-MS sono stati effettuati a vari valori di energia di collisione. I dati sperimentali hanno permesso di costruire le curve SY e Y, nelle quali le abbondanze relative dello ione precursore ottenute e degli ioni figli vengono diagrammate in funzione dell'energia di collisione. Le curve di sopravvivenza degli aggregati doppia carica positivi del DMEB (figura 4.12: specie rappresentativa 12^{2+}) sono tutti caratterizzati dalla formazione predominante del dimero singola carica, sia a bassa che ad alta energia di collisione.

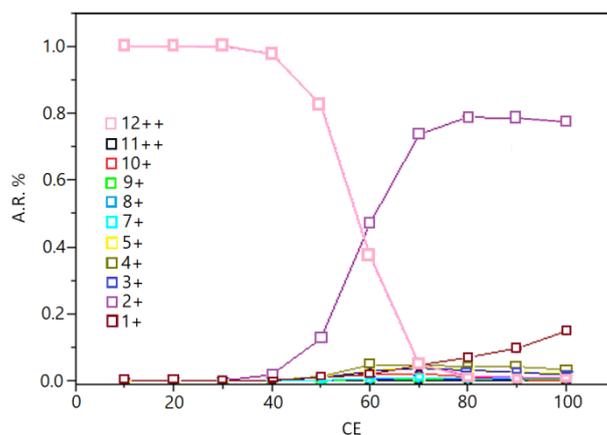


Figura 4.12: Curva di sopravvivenza dell'aggregato 12^{2+} e curva di formazione degli ioni figlio in funzione dell'energia di collisione (eV).

Oltre alla perdita preferenziale del dimero monocarica si assiste alla formazione di una serie di ioni frammento con abbondanza nettamente inferiore, come le specie 10^+ , 9^+ , 8^+ , ecc. Questo suggerisce che la frammentazione attivata dalle collisioni degli aggregati doppia carica positivi e che porta alla formazione dello ione figlio 2^{1+} lascia molta dell'energia di attivazione sulla specie complementare $(N_{\text{agg}}-2)^{1+}$. Quest'ultima, assistita dalle collisioni con il gas target, può ulteriormente decomporsi perdendo neutri e contribuendo all'abbondanza del dimero monocarica. I canali di frammentazione che generano gli ioni 2^{1+} risultano favoriti per tutti gli aggregati multicarica, tenendo anche in considerazione che questi sono osservabili con elevata abbondanza negli spettri CID delle specie singola carica positive sia a bassa che ad alta CE. Sorprendentemente, gli esperimenti ER-MS effettuati sugli aggregati negativi doppia carica mostrano il rilascio preferenziale dello ione 1^{1-} rispetto ad altri prodotti ionici carichi (in figura 4.13 viene mostrata come rappresentativa la frammentazione della specie 12^{2-}).

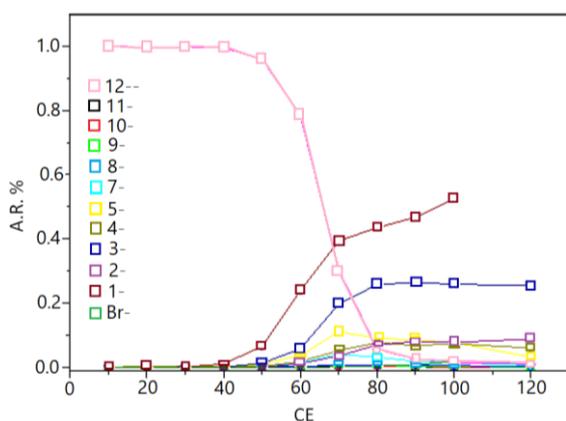


Figura 4.13: Curva di sopravvivenza dell'aggregato 12^{2-} e curva di formazione degli ioni figlio in funzione dell'energia di collisione (eV).

In questo caso può essere ipotizzato un meccanismo con separazione di carica seguito da un'intensiva perdita di specie neutre. Ciò è in conformità con quanto avviene per le specie doppia carica negative degli aggregati di NaAOT.

Anche per gli aggregati doppia carica, positivi e negativi, sono stati confrontati i valori delle $CE_{50\%}$ in funzione del numero di aggregazione (figura 4.14): gli aggregati doppia carica positivi hanno una stabilità inferiore rispetto agli aggregati doppia carica negativi del DMEB. Anche nel caso degli aggregati doppia carica, i valori delle $CE_{50\%}$ rappresentano un valido parametro per la valutazione della stabilità relativa, in accordo con il trend ottenuto per le energie di binding calcolate in funzione del numero di aggregazione.^[59]

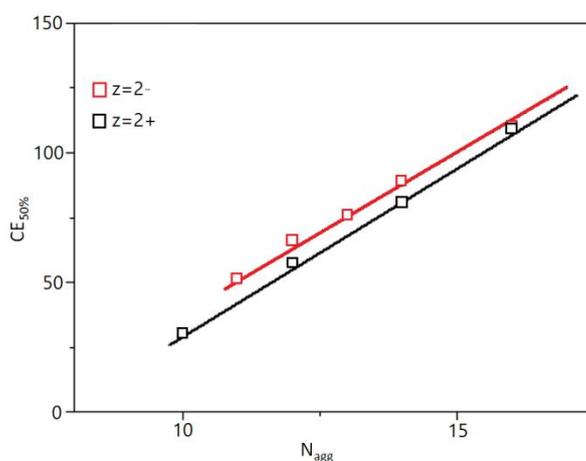


Figura 4.14: $CE_{50\%}$ versus numero di aggregazione degli aggregati con $z=2-$ e $z=2+$ del DMEB.

Gli esperimenti ER-MS sono stati effettuati anche sugli aggregati tripla carica selezionando come ioni precursore quelli con abbondanza sufficientemente alta. In particolare: in ESI (+) sono state scelte le specie 18^{3+} , 22^{3+} , 25^{3+} , 28^{3+} mentre in modalità ESI (-) è stato possibile ottenere le informazioni solo per le specie 21^{3-} e 24^{3-} . Anche nel caso degli aggregati tripla carica sia carichi positivamente che negativamente, a bassa energia di collisione, il processo di frammentazione principale è dato dalla separazione di carica non-simmetrica.

A bassa energia di collisione gli ioni frammento principali risultano essere la specie 2^{1+} e la specie complementare corrispondente $(N_{agg}-2)^{2+}$, la cui abbondanza risulta essere, però, molto bassa. Il meccanismo è lo stesso ipotizzato per gli altri aggregati del DMEB, ovvero quest'ultima specie una volta formata va incontro ad ulteriori perdite di specie 2^{1+} e neutre. Ad elevata energia di collisione, la frammentazione degli aggregati tripla carica risulta essere più efficiente, portando ad un incremento dell'abbondanza degli ioni prodotti.

Sulla base dei valori delle $CE_{50\%}$ è stato dedotto che, come aspettato, gli aggregati tripla carica del DMEB sono meno stabili dei relativi aggregati singola e doppia carica.

Per gli aggregati supramolecolari di DMEB si osserva quindi un comportamento diverso rispetto a quello mostrato da aggregati di tensioattivi come l'NaAOT, risultando meno stabili e più facilmente frammentabili, comportamento che verosimilmente è da ricondurre ad una minore energia coesiva dell'aggregato, ovvero a forze elettrostatiche più deboli fra contro-ione e testa del tensioattivo. Negli aggregati di DMEB infatti, il contro-ione bromuro è abbastanza voluminoso e interagisce con la testa polare ingombrata stericamente dal gruppo aromatico mediante una forza più debole rispetto a quella che si instaura tra il controione sodio e la testa sulfo-succinato carica dell'NaAOT. Simulazioni di dinamica molecolare confermano per gli aggregati di DMEB una struttura a micella inversa in cui i controioni bromuro non sono strettamente segregati nel core e anzi, essi risultano nella conformazione più stabile, distribuiti nell'intero volume micellare.^[63]

Questa ridotta stabilità può essere osservata appunto negli esperimenti CID, in cui si verifica una estensiva perdita di specie neutre e frammentazioni specifiche per questo sistema nel quale i dimeri (che contendono due cationi ed un singolo ione bromuro: $2^+ = [\text{DMEB-Br-DMEB}]^+$ in modalità ioni positivi), e i monomeri (formati da due bromuri ed un catione $1^- = [\text{Br-DMEB-Br}]^-$ in modalità ioni negativi), risultano le specie più rappresentative. Verosimilmente tali specie sono i building block del processo di autoaggregazione del tensioattivo DMEB che portano alla crescita degli aggregati carichi. Calcoli quantomeccanici effettuati su queste due specie mostrano che, sorprendentemente, nel dimero carico positivamente (2^+) il controione bromuro interagisce con l'atomo di idrogeno del gruppo -OH del tensioattivo, risultando quest'ultimo più efficiente nell'interazione rispetto al gruppo ammonico quaternario. Secondo le simulazioni, oltretutto, la lunghezza del legame H---Br risulta essere circa la metà rispetto a quella che caratterizzerebbe l'interazione con il gruppo ammonico quaternario (ovvero pari a 2.15 Å, valore vicino a 2.27 Å, lunghezza di legame tipica dell'interazione H---Br), determinando un legame stretto paragonabile ad un ponte ad idrogeno. In maniera simile è stata ottimizzata anche la struttura del monomero carico negativamente nella quale uno dei controioni bromuro interagisce più fortemente con il gruppo -OH che con il gruppo ammonico quaternario, mentre il secondo controione bromuro interagisce debolmente solo con il gruppo ammonico quaternario.^[63]

4.1.4 Sezione d'urto e geometria degli aggregati in fase gassosa del tensioattivo DMEB

La caratterizzazione degli aggregati del DMEB si è conclusa con l'ottenimento di informazioni riguardanti la loro forma e dimensione. Ciò è importante anche allo scopo di valutare eventuali variazioni derivanti dall'inglobamento di molecole ospite o evidenziare differenze fra aggregati contenenti gli enantiomeri di uno stesso host.

Una prima analisi è stata effettuata valutando la forma del picco che descrive il valore di drift time per alcuni aggregati significativi a diversi stati di carica, e visualizzabile direttamente sul software Driftscope. In figura 4.15 è possibile osservare gli andamenti ottenuti per gli aggregati più abbondanti in ogni stato di carica, sia in modalità ioni positivi che negativi. Ogni specie è caratterizzata da un singolo picco la cui larghezza varia nel range 1-2 ms, valore attribuibile alla lunghezza del pacchetto di ioni iniettato e/o a moti diffusivi delle specie).^[64] Ciò indica che ogni aggregato del tensioattivo DMEB è caratterizzato da una struttura abbastanza rigida in fase gassosa oppure, esso possa coesistere in una serie di conformazioni multiple con sezione d'urto molto simile.

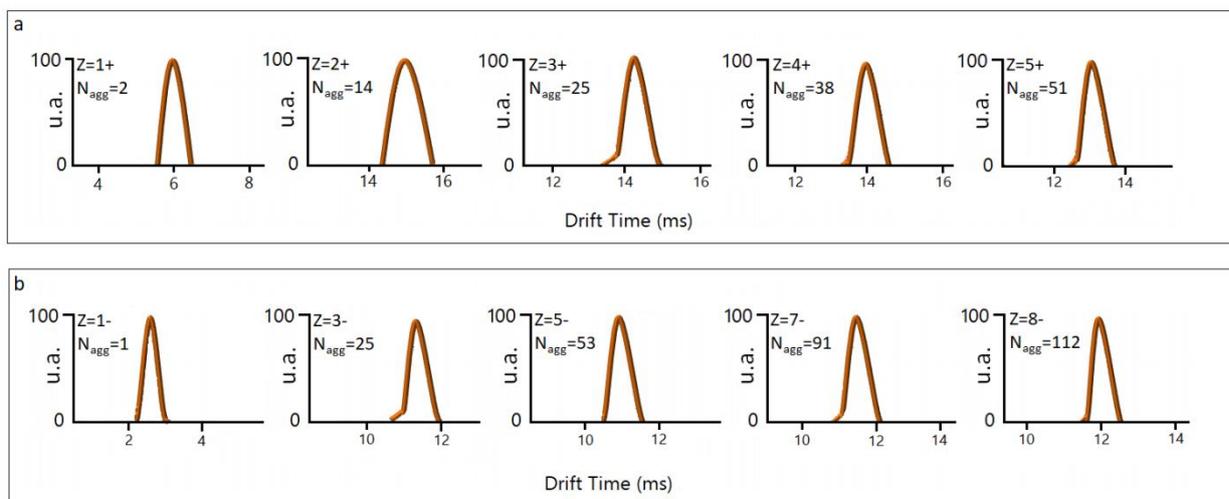


Figura 4.15: Forma dei picchi relativa al valore di drift time per alcune specie rappresentative di aggregati carichi di DMEB in modalità ioni positivi (a) e negativi (b)

In figura 4.16 sono mostrate le rette di calibrazione ottenute per lo strumento, ovvero il grafico logaritmico dei valori di Ω^* in funzione del t_D per gli aggregati di 10TAB e 16TAB. Ogni stato di carica è caratterizzato da un andamento lineare, ma passando da uno stato di carica al successivo si osserva anche una leggera variazione dell'andamento, denotando così una dipendenza delle costanti A e B dallo stato di carica z, probabilmente dovute al campo elettrico non lineare del sistema TWIMSTM.^[65]

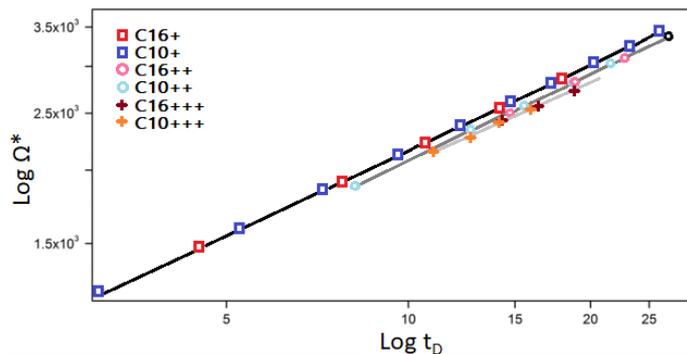


Figura 4.16: Grafico logaritmico dei valori di Ω^* in funzione del t_D per gli aggregati del 10TAB e del 16TAB singola, doppia e tripla carica.

In figura 4.17/a viene mostrato il risultato dal quale si può notare che, indipendentemente dallo stato di carica, i valori delle Ω degli aggregati carichi positivamente di DMEB seguono un unico andamento.

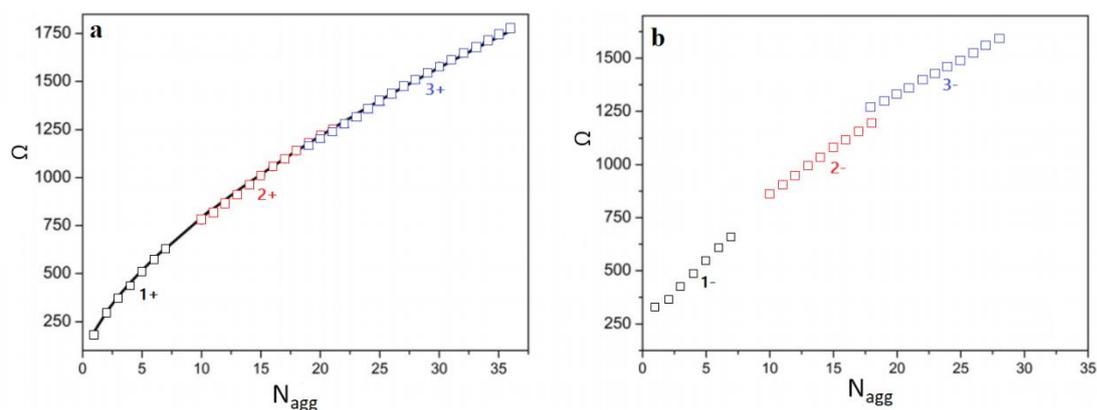


Figura 4.17: Ω vs N_{agg} per gli aggregati di DMEB in modalità ioni positivi (a) e negativi (b).

Per gli aggregati a carica positiva, all'aumentare dello stato di carica si riduce il numero di ioni bromuro e di conseguenza si dovrebbe osservare una riduzione delle Ω . Allo stesso tempo, con il diminuire del numero di controioni presenti nell'aggregato aumenta la repulsione elettrostatica fra le teste polari di tensioattivo, generando così un aumento del valore di Ω , che controbilancia l'effetto dovuto alla riduzione degli ioni bromuro. L'andamento ottenuto è quindi il risultato di un effetto compensatorio ed è simile al comportamento mostrato da altri aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa, come alcuni n-alcil trimetil ammonio bromuri (nTAB).

Per ottenere i valori di Ω degli aggregati di DMEB con carica negativa è stato assunto che le rette di calibrazione non dipendano dalla polarità dell'onda che sposta gli ioni all'interno della cella di mobilità e quindi quelle ottenute per ioni positivi possano valere anche per gli aggregati con carica

negativa. Come mostrato in figura 4.17/b nel caso degli aggregati a carica negativa del DMEB si assiste ad un progressivo e crescente spostamento degli andamenti dei diversi stati di carica. In questo caso l'effetto non è di tipo compensatorio ma additivo, esso infatti è dovuto al contributo apportato da un aumento degli ioni bromuro e da quello dovuto all' aumento dello stato di carica.

Infine, sono state ricavate informazioni relative alla forma assunta dagli aggregati ottenuti.

Studi precedenti effettuati da Borysik e Robinson mostrano che nel caso di aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa le strutture che si producono mediante ESI seguono un modello di crescita in accordo con una forma sferica (descritto dall'equazione 4.3) indipendentemente dallo stato di carica e dal numero di aggregazione (misure effettuate per una serie di aggregati a carica positiva di nTAB, e valida fino a $N_{agg}=180$).^[27]

E' stata applicata quindi la stessa formula (equazione 4.3) per valutare se anche gli aggregati di DMEB in fase gassosa seguono lo stesso modello di crescita trovato per gli aggregati di nTAB:

$$\Omega_{sfera} = \pi \left[\left(\frac{3N_{agg}V^0}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} + R_g \right]^2 \zeta \quad \text{Eq. 4.3}$$

In cui N_{agg} è il numero di aggregazione, V^0 il volume molare del monomero di DMEB (836 \AA^3), R_g il raggio del buffer gas presente nella cella di mobilità ionica (N_2), ed ζ corrispondente al fattore di Millikan (1.36) e che contribuisce alla frazione di urti non elastici tra gli aggregati e il buffer gas.^[42,43]

E' stato trovato un eccellente accordo tra i valori sperimentali delle Ω calcolate per gli aggregati con carica positiva del DMEB e i valori Ω_{sfera} calcolati tramite l'equazione 4.3, indicando chiaramente che gli aggregati di DMEB sono sferoidali nel range dei numeri di aggregazione studiati e che, in accordo a quanto aspettato in fase gassosa, per numeri di aggregazione relativamente bassi, esso si assembla formando strutture simili a micelle inverse.

Ad alti numeri di aggregazione risulta poco probabile che questi aggregati, che si prestano ad avere una forma sferica, corrispondano effettivamente a micelle inverse, visto che ciò implicherebbe la formazione di uno spazio centrale vuoto. In questo caso, il mantenimento di una forma sferica può essere razionalizzato ipotizzando la formazione di domini polari e apolari interconnessi in modo tale da generare una struttura compatta.

Calcoli di dinamica molecolare hanno permesso di trovare un buon accordo tra i valori delle Ω sperimentali e di quelle simulate, mentre compaiono alcune deviazioni rispetto ai dati ottenuti applicando i modelli di crescita sferica: gli aggregati, anche per piccoli numeri di aggregazione,

appaiono come strutture a forma di ovale sferoidali irregolari nei quali esiste una certa influenza della polarità dell'aggregato (carico positivamente o negativamente) e dello stato di carica.^[63]

4.2 Fenomenologia dell'interazione e della selezione chirale di aggregati supramolecolari di tensioattivi in fase gassosa

4.2.1 Solubilizzazione dell'aminoacido triptofano in aggregati di DMEB

Tenendo in considerazione che la capacità di inclusione di strutture organizzate in fase gas dipende criticamente dalla natura del tensioattivo, al fine di estendere le conoscenze sui processi di trasporto e protezione di biomolecole non volatili, nell'ambito del mio dottorato di ricerca ho deciso di studiare l'intrappolamento dell'aminoacido triptofano negli aggregati formati dal tensioattivo DMEB.

Il primo fenomeno valutato è stato la capacità degli aggregati del tensioattivo DMEB di inglobare o meno l'aminoacido e quindi di formare mediante interazioni deboli un complesso host-guest. Da una attenta analisi dei mobilogrammi (mostrati in figura 4.18) acquisiti in seguito dall'infusione in sorgente elettrospray delle soluzioni contenenti DMEB ed L-triptofano in rapporto molare 5:1 e a tre diversi valori di pH (5, 7, 10), si evince che, effettivamente il processo avviene, e che, insieme agli aggregati di solo tensioattivo sono presenti anche specie contenenti il triptofano sia in forma protonata (T^+) che in forma deprotonata (T^-). Al contrario di questi ultimi, gli aggregati che inglobano il triptofano in forma neutra/zwitterionica (T^0) sono praticamente assenti nelle specie singola carica e compaiono fra le specie doppia e tripla carica, solamente a pH=7.

Per ogni stato di carica, gli aggregati misti di DMEB/L-Triptofano sono caratterizzati da un campo di esistenza dei numeri di aggregazione inferiore e superiore, come precedentemente osservato anche per gli altri tipi di aggregati di tensioattivo. Il limite inferiore può essere razionalizzato in termini di stabilità degli aggregati, mentre il limite superiore deriva dal meccanismo attraverso cui gli aggregati vengono prodotti in sorgente.

La distinzione tra le varie forme di triptofano inglobate dagli aggregati è stata fatta in funzione della differenza di massa generata dalla perdita o dall'acquisto di ioni Br^- , contestuale all'acquisto dell'aminoacido carico. Ovviamente deve essere ipotizzata la possibilità che differenti isomeri supramolecolari possano corrispondere ad una uguale composizione chimica degli aggregati, e per questo, tutte le strutture assegnate agli aggregati di cui si parla in seguito sono quelle considerate come le più probabili.

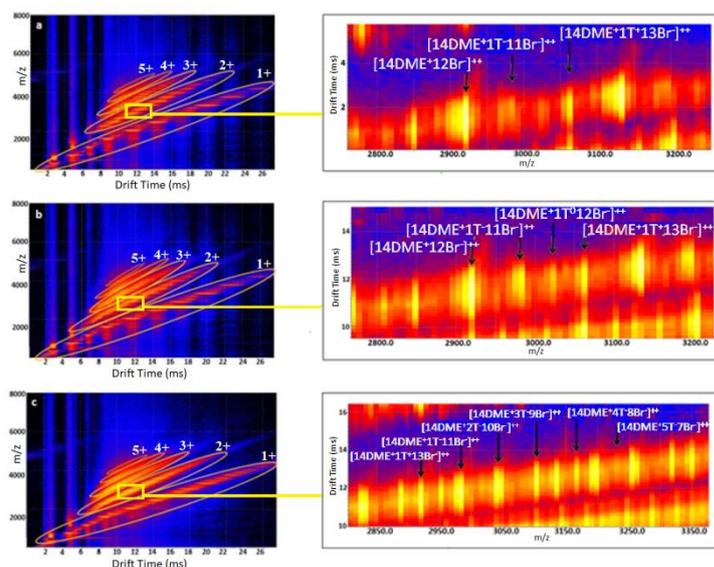


Figura 4.18: Parte sinistra: mobilogrammi estratti dal software DriftScope™ e relativi ad aggregati carichi positivamente del solo DMEB e ad aggregati misti DMEB/L-triptofano nel caso dei campioni a pH=5 (a), pH=7 (b) e pH=10 (c). Parte destra: Ingrandimento mostrante le regioni che includono gli aggregati del DMEB con le varie aggiunte dell'aminoacido L-triptofano.

Anche in questo caso, come succedeva per l'elettrospray delle soluzioni del solo tensioattivo, non sono stati riscontrati aggregati che inglobano molecole di acqua o di metanolo (ovvero dei solventi usati per la dispersione). Ciò permette di supporre che, solamente le specie cariche possono essere intrappolate negli aggregati in fase gassosa grazie all'istaurarsi di forti interazioni elettrostatiche, e per lo stesso motivo, in considerazione che il triptofano neutro interagisce con gli aggregati di DMEB solamente a pH=7, si può considerare che la forma inglobata sia quella zwitterionica (T^0).^[66] L'assenza di aggregati contenenti l'aminoacido in forma zwitterionica fra le specie monocarica può essere attribuito quindi alla debolezza complessiva delle interazioni che si istaurano e/o alle condizioni sperimentali in cui è stato effettuato l'elettrospray.

Per fornire una informazione quantitativa della capacità degli aggregati di DMEB di incorporare L-triptofano, si è deciso di calcolare le quantità R_L definite come il rapporto tra l'abbondanza di ciascun aggregato contenente il triptofano e quella dell'aggregato del solo tensioattivo con lo stesso stato di carica e numero di aggregazione. Tenendo in considerazione l'incertezza legata all'abbondanza degli aggregati, la deviazione standard relativa ai valori di R_L è compresa fra il 7% per gli aggregati meno abbondanti e l'1% per le specie più abbondanti.

In figura 4.19 sono mostrate le abbondanze degli aggregati singola carica di DMEB contenenti una molecola di triptofano T^- o T^+ , e degli aggregati del solo tensioattivo in funzione del numero di aggregazione rispettivamente a pH=5, 7 e 10. Negli inserti corrispondenti, invece si possono

osservare i valori del rapporto R_L in funzione del N_{agg} . Esiste una marcata differenza di abbondanza tra gli aggregati contenenti T^+ o T^- al cambiare del pH della soluzione di partenza: infatti, per ogni numero di aggregazione, l'abbondanza e i valori di R_L degli aggregati contenenti T^- aumenta all'aumentare del pH, mentre quella degli aggregati contenenti T^+ diminuisce all'aumentare del pH. Visto che un cambiamento del pH della soluzione influenza gli equilibri fra la specie protonata, deprotonata e zwitterionica del triptofano, questa evidenza indica la presenza di un certo effetto di memoria della concentrazione delle varie forme di triptofano nella soluzione di partenza.

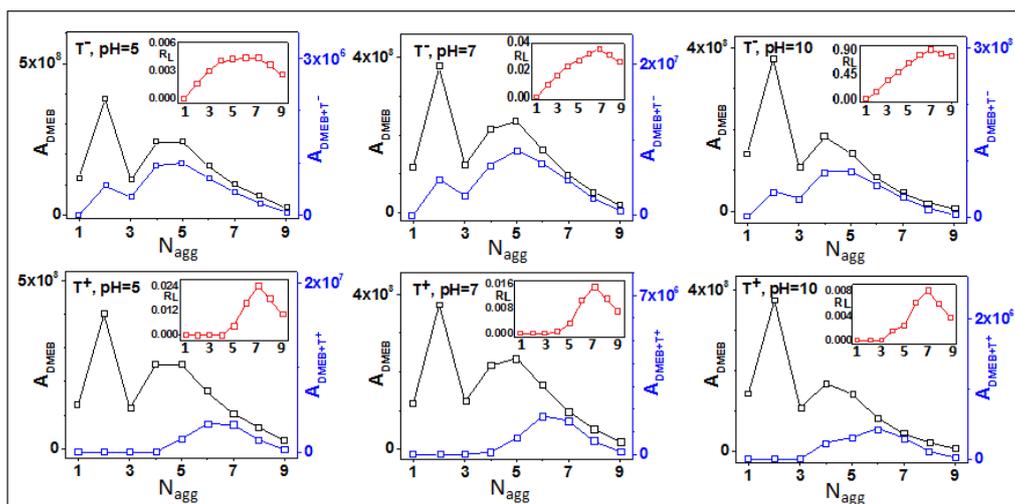


Figura 4.19: Abbondanza degli aggregati di DMEB singola carica contenenti un T^- o un T^+ e degli aggregati del mero DMEB in funzione del numero di aggregazione in condizioni acide, neutre e basiche. I valori di R_L sono mostrati come inserto. Le linee sono solamente una guida per gli occhi.

Si può notare che i valori di R_L aumentano all'aumentare del numero di aggregazione fino a $N_{agg}=7$, suggerendo che, gli aggregati del tensioattivo più grandi sono più propensi rispetto a quelli più piccoli nell'incorporare l'amino acido. La riduzione del valore R_L per $N_{agg} > 7$ è stata attribuita a fenomeni di intrappolamento competitivo da parte di aggregati di DMEB con stato di carica maggiore (vedi dopo). Un'altra interessante caratteristica che emerge dall'osservazione della figura 4.19, è che l'incorporazione di una molecola di triptofano negli aggregati di DMEB singola carica, si verifica per numeri di aggregazione ≥ 4 per il T^+ , e ≥ 2 per la specie T^- , suggerendo che per l'inglobamento è necessario l'effetto cooperativo di interazioni multiple. In aggiunta, tenendo in considerazione che la carica complessiva dell'aggregato è $1+$, questo comportamento può essere attribuito all'istaurarsi di interazioni più favorevoli tra la specie carica negativamente T^- e l'aggregato di DMEB positiva doppia carica, rispetto a quelle che si instaurano tra il triptofano T^+ ed un aggregato di DMEB neutro.

Oltretutto, solo nel caso dei campioni basici in cui la concentrazione della specie T^- è massima, gli aggregati del DMEB singola carica incorporano due o tre molecole dell'host deprotonato (figura 4.20). Dal confronto dei valori di R_L relativi agli aggregati contenenti il T^- a pH 10, può essere notato che, per ragioni statistiche, all'aumentare del numero di molecole di amino acido incorporate, avviene una riduzione degli R_L . Infine, è interessante notare che, la soglia del numero di aggregazione necessario all'incorporazione dell'L-triptofano cresce con il numero di molecole di triptofano incorporate ($N_{agg}=2$ per $1T^-$, $N_{agg}=3$ per $2T^-$ e $N_{agg}=4$ per $3T^-$)

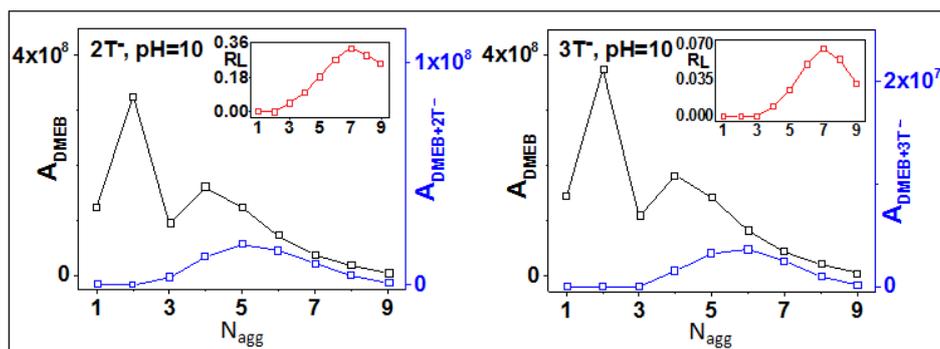


Figura 4.20: Abbondanza degli aggregati di DMEB singola carica contenenti due ($2T^-$) o tre ($3T^-$) molecole di triptofano deprotonato e aggregati di solo DMEB in funzione del numero di aggregazione in condizioni basiche. I valori di R_L sono mostrati nell'inserito. Le linee rappresentano solamente una guida per gli occhi.

Gli aggregati misti DMEB/L-triptofano doppia carica sono osservati in un range di N_{agg} compreso tra 7 e 20. Quelli che interagiscono con una molecola di T^- sono caratterizzati da R_L più elevati rispetto a quelli singola carica, allo stesso valore di pH. Oltretutto, è stata osservata la tendenza degli R_L a decrescere rapidamente per poi raggiungere un trend piuttosto costante al variare del numero di aggregazione (visibile negli inserti in figura 4.21): tenendo in considerazione che la carica complessiva dell'aggregato è $2+$, questo comportamento può essere razionalizzato ipotizzando che lo ione T^- ha una forte affinità nei confronti dell'aggregato di DMEB positiva tripla carica e che, all'aumentare del N_{agg} la riduzione della densità di carica determina una diminuzione della forza attrattiva verso T^- .

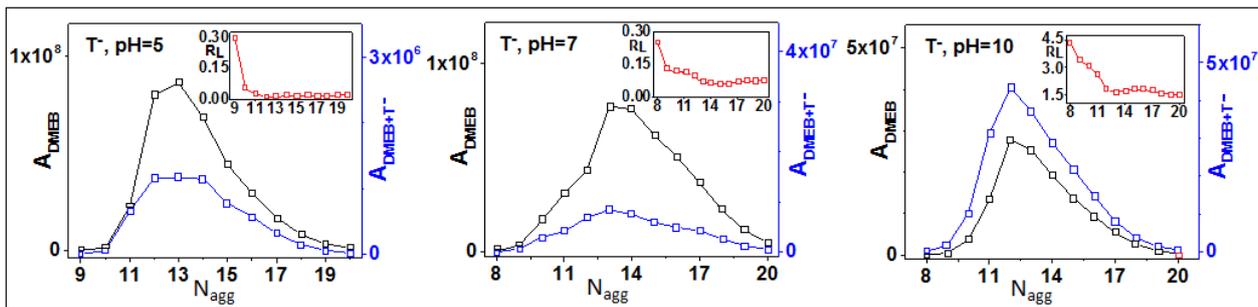


Figura 4.21: Abbondanza degli aggregati di DMEB doppia carica contenenti una molecola di T^- e degli aggregati di solo tensioattivo in funzione del numero di aggregazione in condizioni acide, neutre e basiche. I valori R_L sono mostrati nell'inserto. Le linee rappresentano solo una guida per gli occhi.

Sorprendentemente, lo stesso andamento degli R_L caratterizza gli aggregati doppia carica che interagiscono con un T^+ . Quello che ci si poteva aspettare era infatti un andamento opposto, in vista del fatto che, a causa della repulsione elettrostatica, l'affinità della specie T^+ per un aggregato di DMEB positiva singola carica dovrebbe essere abbastanza bassa. In realtà, osservando con attenzione l'andamento delle abbondanze degli aggregati di mero tensioattivo e di quelli che inglobano l'aminoacido, appare chiaramente un altro effetto: l'inserzione del T^+ influenza la stabilità complessiva dell'aggregato del tensioattivo, rendendo più stabili quelli che si trovano al limite inferiore e meno stabili quelli che si trovano al limite superiore. In definitiva, si è concluso che la presenza del triptofano genera una variazione dei limiti inferiore e superiore del numero di aggregazione (figura 4.22) che spiega l'andamento osservato.

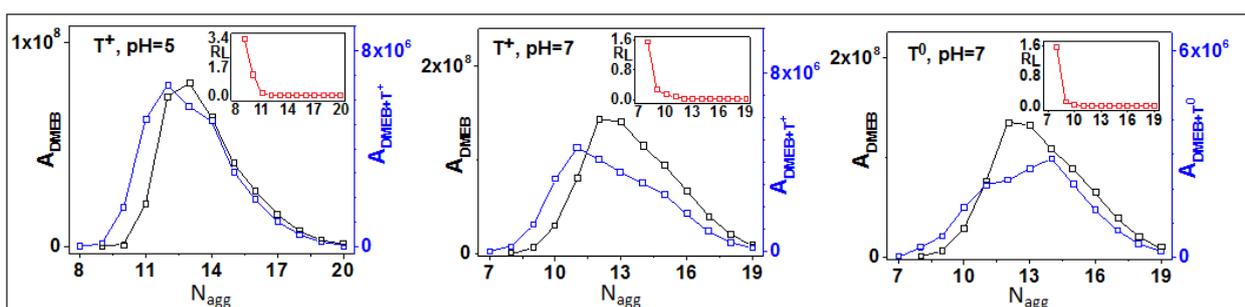


Figura 4.22: Abbondanza degli aggregati di DMEB doppia carica contenenti una molecola di T^+ in condizioni acide e neutre o una molecola di T^0 a pH neutro e degli aggregati di mero DMEB in funzione del numero di aggregazione. I valori di R_L sono mostrati nell'inserto. Le linee sono solamente una guida per gli occhi.

Per gli aggregati doppia carica, solo a pH basico in cui la concentrazione della specie T^- è verosimilmente massima, gli aggregati di DMEB incorporano da 2 a 5 molecole di triptofano deprotonato (figura 4.23). Anche in questo caso sono stati osservati cambiamenti nel limite di stabilità degli aggregati.

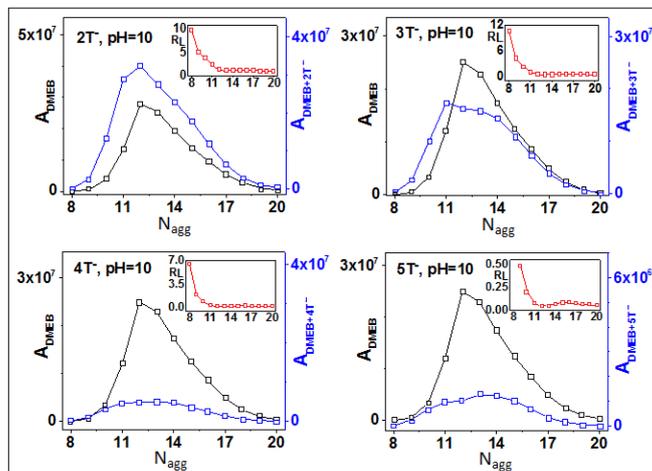


Figura 4.23: Abbondanze degli aggregati di DMEB positive doppia carica contenenti da 2 a 5 molecole di T^- e degli aggregati di mero tensioattivo in funzione del numero di aggregazione in condizioni basiche. I valori degli R_L sono mostrati nell'inserto. Le linee sono solo una guida per gli occhi.

Gli aggregati tripla carica che inglobano il triptofano sono compresi nel range di N_{agg} 17-28. Anche in questo caso essi intrappolano una molecola di triptofano protonato o deprotonato mostrando valori di R_L ancora più alti rispetto a quelli degli aggregati singola e doppia carica con uguale numero di aggregazione, allo stesso pH. Anche la dipendenza dal numero di aggregazione è risultata essere simile a quella degli aggregati doppia carica (figura 4.24) e per questo le ragioni che sostengono i motivi di aggregazione descritti in precedenza possono essere applicati anche in questo caso.

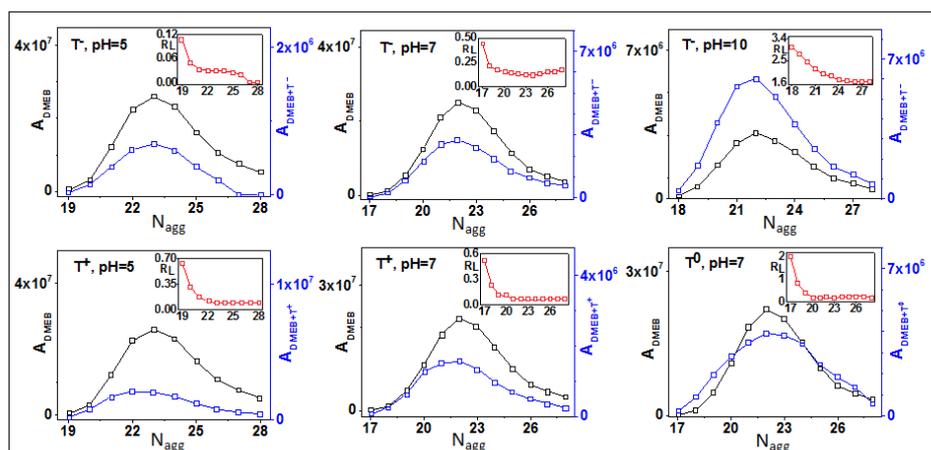


Figura 4.24: Abbondanze degli aggregati positiva tripla carica di DMEB contenenti un T^- , T^+ , T^0 e aggregati di mero DMEB in funzione del numero di aggregazione alle specifiche condizioni di pH- I valori degli R_L sono mostrati nell'inserto. Le linee sono solo una guida per gli occhi.

In tabella 4.4 sono stati calcolati i valori del rapporto tra le abbondanze degli aggregati V , definito secondo l'equazione 4.4:

$$V = \frac{\sum A_{DMEB+T}}{\sum A_{DMEB}} \quad \text{Eq. 4.4}$$

per le specie inglobanti 1 T^- e 1 T^+ per ogni valore dello stato di carica e del pH. Questi devono essere comparati al valore $V= 0.2$ delle specie presenti nella soluzione di partenza di cui è stato effettuato l'elettrospray

Tabella 4.4: Valori del rapporto V calcolati per le specie inglobanti 1 T^- e 1 T^+ ad ogni valore di pH e stato di carica.

z		V (pH=5)	V (pH=7)	V (pH=10)
1+	1 T^-	0.0029	0.02	0.37
	1 T^+	0.0051	0.0034	0.0015
2+	1 T^-	0.014	0.073	1.83
	1 T^+	0.068	0.046	0
3+	1 T^-	0.026	0.14	1.96
	1 T^+	0.11	0.07	0

Gli aggregati tripla carica sono in grado di incorporare fino a 5 T^- (figura 4.25). Come succede per gli aggregati doppia carica, ciò avviene solamente nel caso del campione basico, per le ragioni

sopra riportate. Anche in questo caso, l'intrappolamento dell'L-triptofano implica un cambiamento del limite di stabilità degli aggregati.

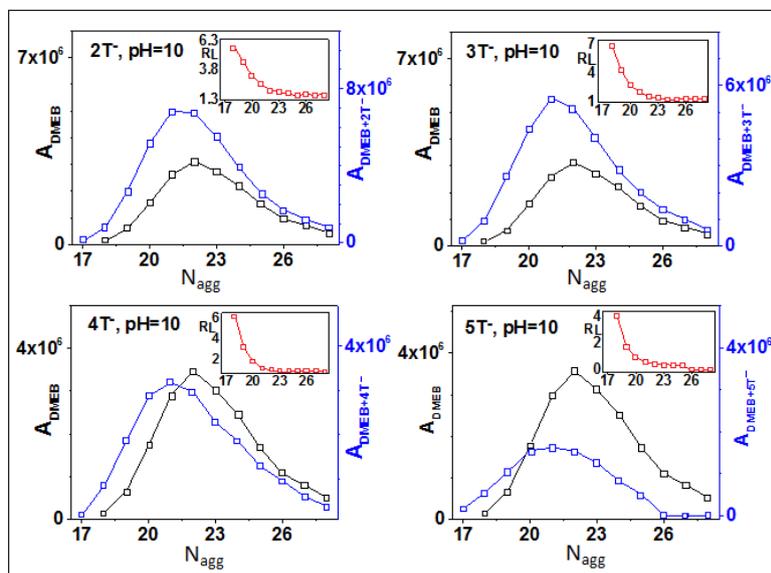


Figura 4.25: Abbondanza degli aggregati positivi tripla carica contenenti da 2 a 5 T^- e abbondanza degli aggregati di mero DMEB in funzione del numero di aggregazione in condizioni di pH=10. I valori degli R_L sono mostrati nell'inserito. Le linee sono solo una guida per gli occhi.

Al fine di comprendere se gli aggregati di DMEB fossero in grado di discriminare i due enantiomeri D- ed L-triptofano, è stato effettuato il confronto del rapporto delle abbondanze R_D ed R_L relative agli aggregati contenenti D- ed L-triptofano (sia in forma protonata che nella forma deprotonata), ottenuti da esperimenti effettuati nelle stesse condizioni sperimentali. Non si sono denotate significative differenze nell'incorporazione da parte degli aggregati di DMEB dei due enantiomeri. Questo comportamento viene elucidato nella figura 4.26. Il rapporto tra i valori R_L e R_D (R_L/R_D) in funzione del numero di aggregazione per le specie singola, doppia e tripla carica è approssimativamente costante e, entro l'errore sperimentale, uguale ad 1.

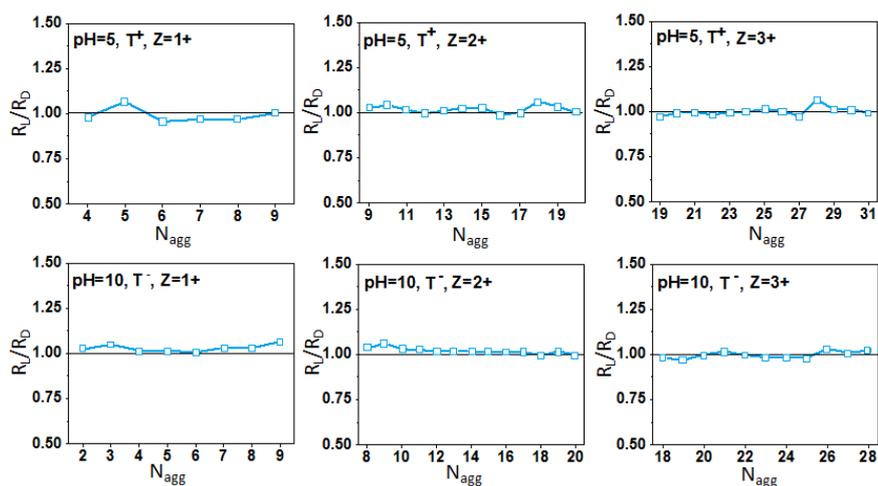


Figura 4.26: Rapporto fra R_L e R_D in funzione del numero di aggregazione per gli aggregati del tensioattivo DMEB, singola ($z=1+$), doppia ($z=2+$) e tripla ($z=3+$) carica a $\text{pH}=5$ e $\text{pH}=10$.

L'assenza di discriminazione può essere razionalizzata in termini di ingombro sterico della catena indolica del triptofano che non permette un contatto sufficientemente vicino tra il centro chirale dell'aminoacido e la testa chirale del tensioattivo DMEB.

Al fine di ottenere maggiori informazioni sugli aggregati del tensioattivo DMEB inglobanti il triptofano, ed avere una ulteriore conferma dell'assenza di discriminazione tra i due enantiomeri, sono stati effettuati esperimenti ER-MS sull'esamero del DMEB positivo singola carica, contenente una molecola di D- o L-triptofano deprotonato. Questa specie ed è stata selezionata perché mostra una abbondanza sufficientemente elevata per ottenere risultati significativi ed è stata indicata come $[6\text{DME}^+ 1\text{T}^- 4\text{Br}^-]^+$, nel quale DME^+ rappresenta il catione del tensioattivo.

In figura 4.27 vengono mostrate la curva SY e le curve Y dei frammenti più abbondanti in funzione della CE, mentre in figura 4.28 sono presenti le curve Y di tutti i frammenti prodotti. In più mi è sembrato utile costruire uno schema (schema 4.1) che spiegasse i vari canali di frammentazione dello ione precursore e alcune delle più importanti frammentazioni degli ioni figlio. Sono anche mostrati i valori di CE relativi al massimo della curva Y per ogni frammento. Una ispezione della figura 4.27 e dello schema 4.1 mostrano che, a bassi valori di CE, il frammento più abbondante è $[5\text{DME}^+ 1\text{T}^- 3\text{Br}^-]^+$ proveniente dalla perdita in una molecola di DMEB dallo ione precursore, seguito dallo ione figlio $[5\text{DME}^+ 4\text{Br}^-]^+$ proveniente dalla perdita di $[\text{DME}^+ \text{T}^-]$ dallo ione precursore, ed infine, dallo ione frammento $[5\text{DME}^+ 1\text{DME}^0 4\text{Br}^-]^+$ derivante dalla perdita di una molecola di $[\text{T}^0]$ dallo ione precursore e dalla formazione della specie DME^0 (ovvero di una molecola di tensioattivo neutro, vedi sotto).

Il trend delle abbondanze di questi frammenti suggerisce che il triptofano deprotonato T^- è preferenzialmente localizzato in prossimità della testa DME^+ del tensioattivo e con il residuo ionico

all'interno al core dell'aggregato. E' importante notare che la formazione della specie $[5\text{DME}^+ 1\text{DME}^0 4\text{Br}^-]^+$ indica l'avvenimento di un trasferimento protonico dal gruppo $-\text{OH}$ del DME^+ alla molecola di T^- prima della sua eiezione dall'aggregato, lasciando così nella struttura a micella inversa il tensioattivo DME^0 in forma zwitterionica.

Aumentando la CE, sono state osservate ulteriori frammentazioni massive dello ione precursore e/o la presenza di decomposizioni consecutive che portano alla formazione degli altri frammenti.

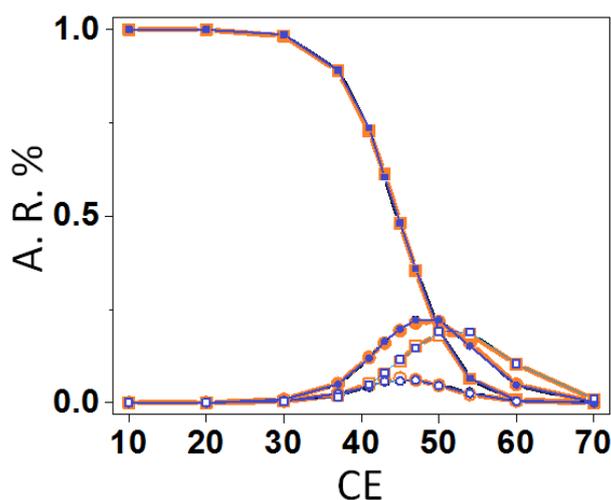


Figura 4.27: Curva di sopravvivenza dell'aggregato inglobante il triptofano $[6\text{DME}^+ 1\text{T}^- 4\text{Br}^-]^+$ e curva di formazione dei frammenti più abbondanti in funzione della CE. Nel grafico i quadrati pieni sono stati utilizzati per la specie $[6\text{DME}^+ 1\text{T}^- 4\text{Br}^-]^+$; i cerchi pieni per $[5\text{DME}^+ 1\text{T}^- 3\text{Br}^-]^+$; i quadrati vuoti per la specie $[5\text{DME}^+ 4\text{Br}^-]^+$ e i cerchi vuoti per $[5\text{DME}^+ \text{DME}^0 4\text{Br}^-]^+$. Oltretutto le curve blu sono relative all'esamero contenente L-triptofano e le curve in arancione relative all'aggregato contenente il D-triptofano.

In accordo con il risultato dell'analisi sul rapporto R_L/R_D , la figura 4.27 mostra una completa sovrapposizione delle curve SY e Y relative alla frammentazione dell'esamero di DMEB inglobante il D- o L-triptofano, confermando l'assenza di selettività nell'intrappolamento dei due enantiomeri.

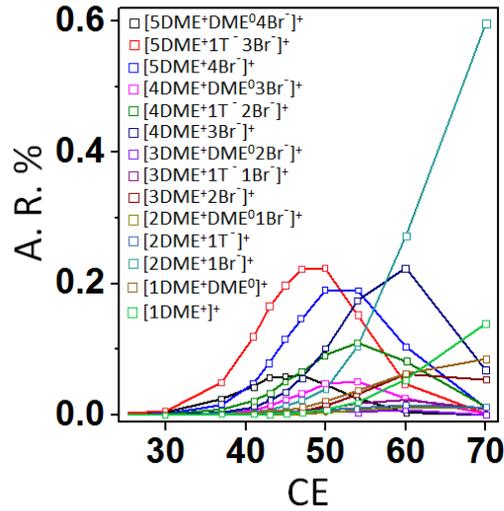
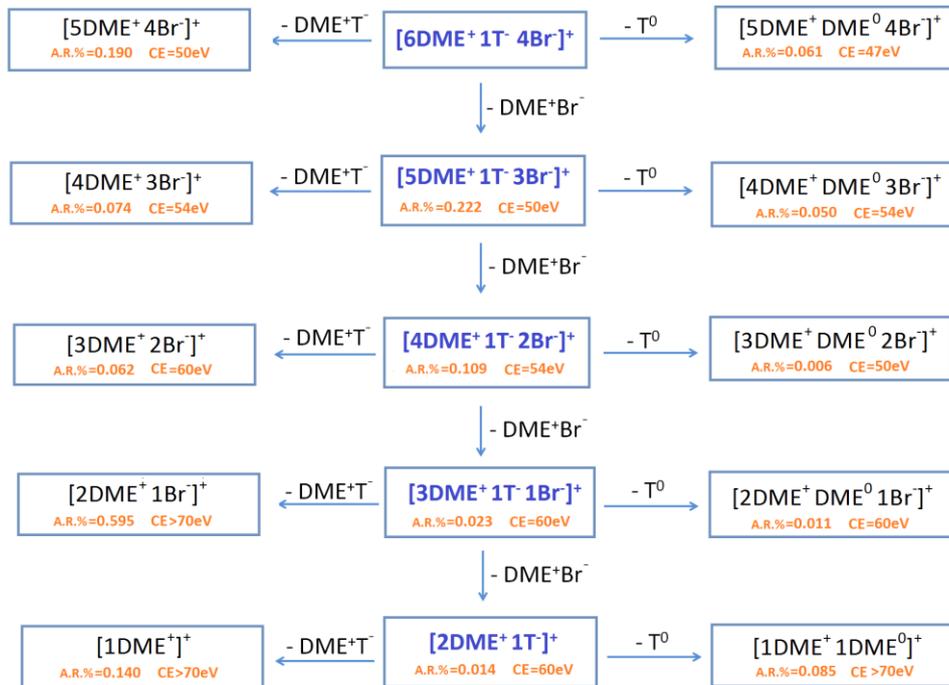


Figura 4.28: Curve di formazione di tutti i frammenti in funzione della CE.



Schema 4.1: Pattern di frammentazione della specie $[6DME^+ 1T^- 4Br^-]^+$. Sono rappresentati anche i valori dell'abbondanza relativa e i valori di CE relativi al massimo della curva Y per ogni frammento.

Infine sono state raccolte informazioni riguardanti la sezione d'urto degli aggregati misti DMEB/Triptofano. I picchi che descrivono i drift time degli aggregati mono- e multicarica DMEB/L-triptofano sono mostrati in figura 4.29. Ogni specie è caratterizzata da un singolo picco definito (larghezza 2 ms dovuta alla lunghezza del pacchetto di ioni iniettato e/o a moti diffusivi

delle specie), suggerendo che gli aggregati misti mantengono una conformazione relativamente rigida o coesistono in conformazioni multiple con sezione d'urto simile.

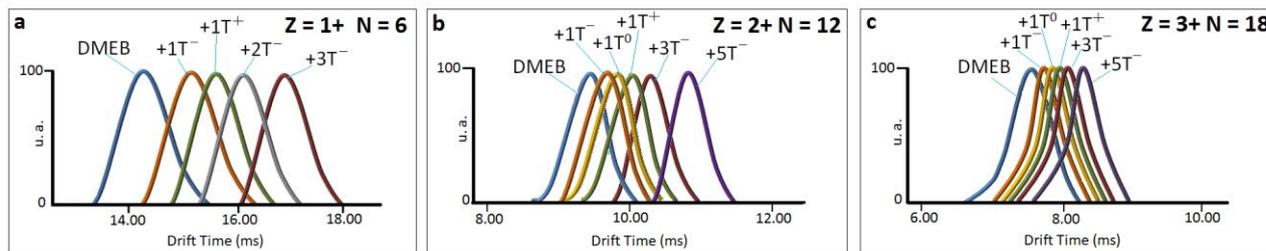


Figura 4.29: Forma dei picchi normalizzata relativa ad alcuni aggregati rappresentativi di DMEB contenenti triptofano per singola (a), doppia (b) e tripla (c) carica.

Dal confronto delle Ω di aggregati di DMEB contenenti o L- o D-triptofano non sono emerse differenze significative di geometria e forma confermando, ancora una volta, la mancanza di selettività chirale.

Nelle figure 4.30, 4.31, 4.32 (grafici a sinistra), vengono mostrati i valori delle sezioni d'urto di aggregati di DMEB contenenti un T^- o un T^+ (per i singola, doppia e tripla carica) e per quelli contenenti un T^0 (per i doppia e tripla carica). Le Ω degli aggregati singola, doppia e tripla carica degli aggregati del tensioattivo contenenti più di un T^- sono mostrati in figura 4.30, 4.31, 4.32 (grafici a destra). Per effettuare un confronto, sono stati inseriti i valori delle CCS degli aggregati di solo DMEB.

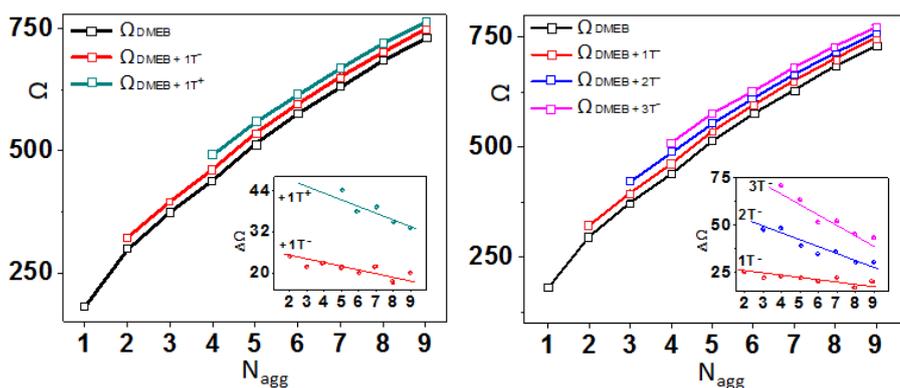


Figura 4.30: Valori delle sezioni d'urto (Ω , \AA^2) degli aggregati monocarica di DMEB che inglobano triptofano. Negli inserti sono presenti le differenze ($\Delta\Omega$) fra le sezioni d'urto degli aggregati contenenti triptofano e gli analoghi di solo tensioattivo in funzione del numero di aggregazione.

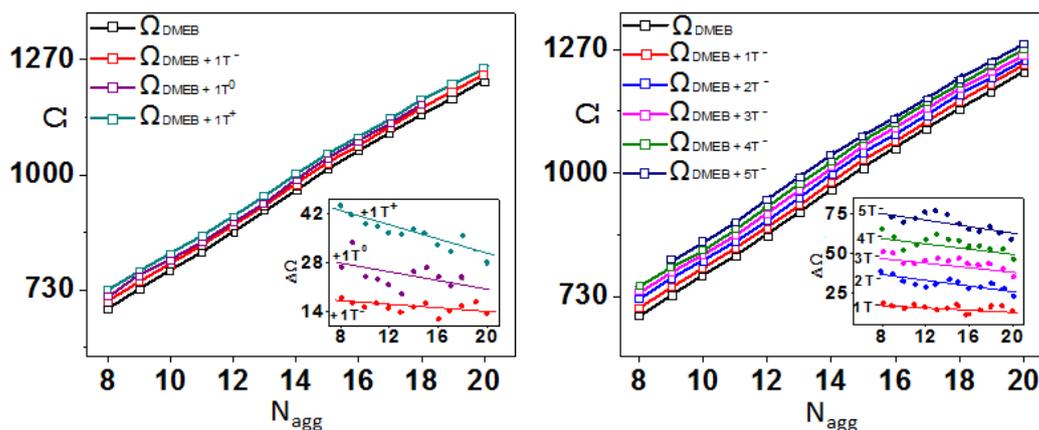


Figura 4.31: Valori delle sezioni d'urto (Ω , \AA^2) degli aggregati doppia carica di DMEB che inglobano triptofano. Negli inserti sono presenti le differenze ($\Delta\Omega$) fra le sezioni d'urto degli aggregati contenenti triptofano e quelle degli analoghi di solo tensioattivo, in funzione del numero di aggregazione.

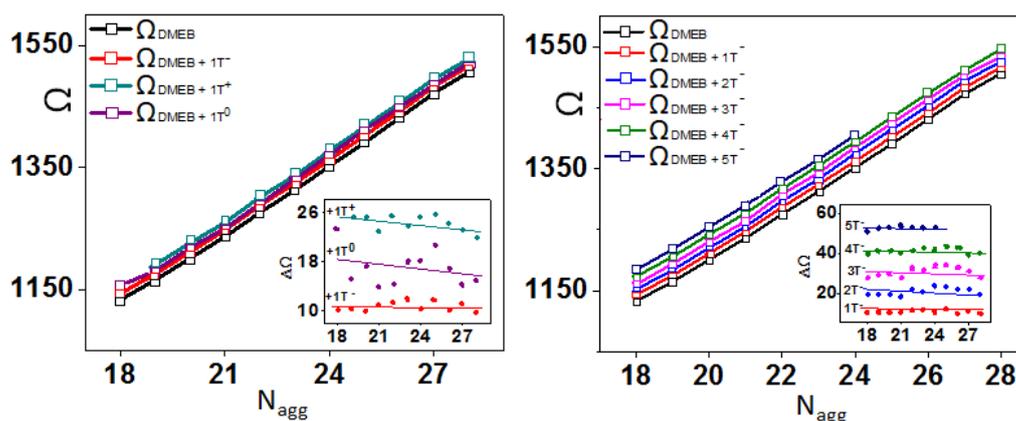


Figura 4.32: Valori delle sezioni d'urto (Ω , \AA^2) degli aggregati tripla carica di DMEB che inglobano triptofano. Negli inserti sono presenti le differenze ($\Delta\Omega$) fra le sezioni d'urto degli aggregati contenenti triptofano e quelle degli analoghi di solo tensioattivo, in funzione del numero di aggregazione.

Gli aggregati di DMEB contenenti L-triptofano posseggono Ω maggiore rispetto a quelli del solo tensioattivo con lo stesso numero di aggregazione, e l'incremento dovuto alla presenza di un T^+ è più grande rispetto a quello dovuto alla presenza di un T^- . Infatti, per mantenere lo stesso stato di carica dell'aggregato di mero tensioattivo, l'aggiunta di un T^+ è accompagnata dal contestuale ingresso di un controione Br^- , mentre l'aggiunta di un T^- richiede l'uscita di un Br^- . D'altra parte, l'incremento dovuto all'inglobamento di T^0 (forma zwitterionica) stima il contributo del solo aminoacido alla sezione d'urto totale.

Per ottenere dati più dettagliati sono state calcolate le differenze ($\Delta\Omega$) fra le sezioni d'urto degli aggregati contenenti il triptofano (in forma T^+ , T^- e T^0) e quelle degli aggregati di mero tensioattivo. Le $\Delta\Omega_1$ sono state calcolate per gli aggregati contenenti un numero (n) di T^+ e rendono conto del contributo del triptofano e di n ioni bromuro alla sezione d'urto totale ($n*\Omega_{T^+} + n*\Omega_{Br^-}$). Le $\Delta\Omega_2$ rendono conto del contributo di $n T^-$ sottratto al contributo di n ioni bromuro ($n*\Omega_{T^-} - n*\Omega_{Br^-}$) ed infine, i valori di $\Delta\Omega_3$ rappresentano il contributo alla sezione d'urto totale dovuto alla presenza del triptofano. I risultati (rappresentati negli inserti delle figure 4.30, 4.31, 4.32) mostrano che i contributi alla Ω totale tendono a diminuire con l'incremento del numero di aggregazione. Ciò può essere razionalizzato considerando che la probabilità del triptofano e degli ioni bromuro di occupare interstizi interni dell'aggregato aumenta con le sue dimensioni.

Assumendo che il contributo del triptofano alla Ω totale sia indipendente dallo stato di carica, dai dati presenti negli inserti in figura 4.30, 4.31 e 4.32 è possibile ricavare il contributo del triptofano (Ω_T) e dello ione bromuro (Ω_{Br}) alla sezione d'urto totale, calcolato secondo le seguenti equazioni 4.5 e 4.6:

$$\Omega_T = \frac{\Delta\Omega_1 + \Delta\Omega_2}{2n} \quad \text{Eq. 4.5}$$

$$\Omega_{Br} = \frac{\Delta\Omega_1 - \Delta\Omega_2}{2n} \quad \text{Eq. 4.6}$$

I valori ottenuti dalle due equazioni sono stati diagrammati in funzione del numero di aggregazione e mostrati in figura 4.33. Dall'osservazione dei grafici, i contributi alla sezione d'urto totale dovuti alla presenza del triptofano e degli ioni bromuro sono in qualche modo influenzati dallo stato di carica e dal numero di molecole di aminoacido presenti nell'aggregato. Inoltre, tali contributi decrescono con il numero di aggregazione, essendo quelli del triptofano compresi nel range 14-37 \AA^2 e quelli degli ioni bromuro nel range 6-14 \AA^2 . Questo comportamento conferma l'ipotesi che il triptofano e gli ioni bromuro tendono ad occupare preferenzialmente domini interstiziali degli aggregati di DMEB, il cui volume complessivo aumenta con le dimensioni dell'aggregato.

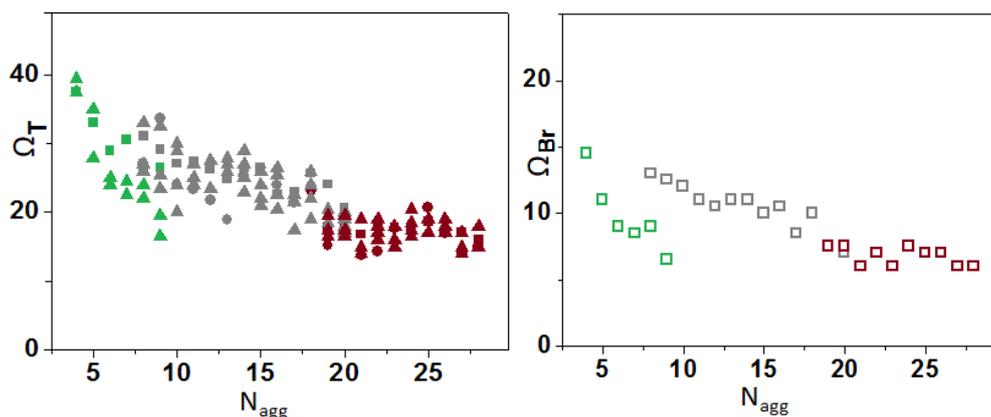


Figura 4.33: Nel grafico a sinistra, contributo alla sezione d'urto totale dato dalla presenza del triptofano ($\Omega_T, \text{\AA}^2$) indicato con quadratini provenienti dall'eq. 4.5 e $n = 1$, cerchi corrispondenti ai valori di $\Delta\Omega_3$ e triangoli provenienti dall'eq. 4.3 ed $2 \leq n \leq 5$. Nel grafico a destra viene mostrato il contributo alla Ω totale dagli ioni bromuro ($\Omega_{Br}, \text{\AA}^2$) e ottenuto mediante l'eq. 4.6. In entrambi i grafici, i punti verdi, marroni e grigi indicano rispettivamente gli aggregati singola, doppia e tripla carica.

4.2.2 Solubilizzazione dell'aminoacido serina in aggregati di DMEB

Alla luce dei risultati ottenuti nella solubilizzazione del D- ed L- triptofano in aggregati di DMEB, lo studio dell'inglobamento in strutture organizzate in fase gas finalizzato al riconoscimento chirale è stato esteso alla coppia enantiomerica L- e D-serina. Ciò al fine di rendere più efficace l'interazione aminoacido-tensioattivo. Pertanto, sono stati acquisiti gli spettri di massa di soluzioni acquose basiche di DMEB/D- e DMEB/L-serina utilizzando uno strumento quadrupolo-tempo di volo (QToF, Waters Corporation) interfacciato ad una sorgente elettrospray.

Una analisi preliminare delle abbondanze degli aggregati di DMEB con e senza una molecola di serina (in forma anionica) in modalità ioni positivi ha permesso il calcolo del rapporto R_D/R_L in funzione del numero di aggregazione, mostrato in figura 4.34.

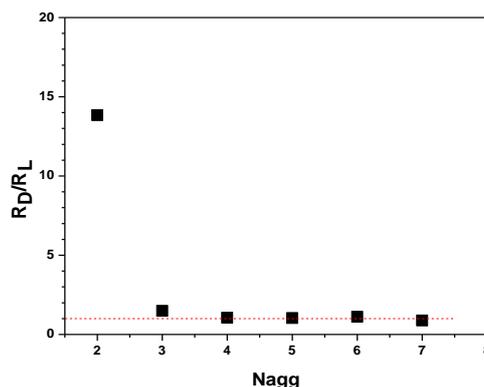


Figura 4.34: R_D/R_L in funzione del numero di aggregazione per aggregati di DMEB/serina in modalità positiva (la linea rossa tratteggiata indica il valore di $R_D/R_L=1$, ovvero assenza di riconoscimento).

Si nota un notevole riconoscimento della forma D- rispetto alla L- nel caso della specie costituita da due DMEB in forma cationica e una serina in forma anionica mentre per numeri di aggregazione maggiori questo effetto scompare rapidamente. Il comportamento osservato insieme all'assenza di riconoscimento nel caso di aggregati DMEB/serina in modalità ioni negativi può essere attribuito alla presenza degli ioni bromuro. Sembra infatti plausibile ipotizzare che queste specie legandosi alla testa chirale del DMEB, per effetto sterico, impediscono l'avvicinamento della serina.

CONCLUSIONI

Gli studi di spettrometria di massa effettuati hanno mostrato che i tensioattivi DMEB e NaAOT hanno la capacità di autoaggregarsi nel vuoto, formando specie altamente polidisperse di forma sferoidale e una struttura relativamente rigida simile a quella delle micelle inverse. L'analisi dei dati sperimentali ha evidenziato che le forze elettrostatiche attrattive e repulsive assumono un ruolo fondamentale sia nella definizione della struttura e della stabilità delle specie, sia nei fenomeni di solubilizzazione e trasporto di piccole biomolecole in fase gassosa. In particolare, gli aggregati del tensioattivo DMEB si sono dimostrati degli ottimi carrier per il triptofano e per la serina.

I risultati ottenuti mostrano che la fenomenologia del processo di autoaggregazione dei tensioattivi in fase gassosa e quello di solubilizzazione è particolarmente complessa e intrigante. La carenza di letteratura in questo ambito non è giustificabile in vista della notevole importanza teorica e pratica di questi sistemi. Essi infatti sono potenzialmente utili per la comprensione dei fenomeni di trasporto di materia ed energia nell'atmosfera e dei meccanismi di formazione di aggregati organizzati nello spazio interstellare connessi con l'ipotesi di un'origine cosmica della vita. Lo studio inoltre della formazione e stabilità di piccoli aggregati supramolecolari carichi può essere di notevole utilità per razionalizzare processi di nucleazione in ambienti rarefatti. Dal punto di vista pratico, la loro utilità consiste non solo nella progettazione di carrier per biomolecole e di sistemi anti-inquinamento dell'atmosfera, ma anche nella realizzazione di micro-ambienti specializzati per reazioni in spazi confinati ed elettricamente carichi. In quest'ottica, con il presente progetto di ricerca si è voluto fornire un contributo utile a chiarire i processi molecolari coinvolti nel trasporto e protezione in fase gassosa mediata da strutture micellari.

BIBLIOGRAFIA

1. J. M. Lehn. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supramolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 89–112.
2. J. M. Lehn. *Supramolecular Chemistry*. VCH, Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), **1995**.
3. J. B. Wittenberg, L. Isaacs. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials, Complementarity and Preorganization*. **2012**.
4. M. Rekharsky, Y. Inoue. *Solvation Effects in Supramolecular Recognition*. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. **2012**.
5. J. N. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Seconda Edizione. Academic Press limited, **1991**.
6. E. V. Anslyn, D. A. Dougherty. *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books. USA, 2006, pp. 162–168.
7. M. L. Waters. Aromatic interactions in model systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 736–741.
8. A. Klug. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **1999**, 354, 531–535.
9. J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* **1976**, 72, 1525–1568.
10. J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 470, 185–201.
11. G. S. Hartley. Organized structure in soap solutions. *Nature*, 1949, 163, 767–768.
12. W. Philippoff. Micelles and X-rays *J. Colloid. Sci.* **1950**, 5, 169–191.
13. J. C. Eriksson, G. Gillberg. NMR-studies of the solubilisation of aromatic compounds in cetyltrimethylammonium bromide solution II. *Acta Chem. Scand.* 1966, 20 (8), 2019–2017.
14. J. T. Kunjappu, P. Somasundaran, N. J. Turros. A Luminescence Quenching Study on the Localization Problem of Ru(bpy)₃⁺ in Micelles and Hemimicelles. *J Phys. Chem.* **1990**, 94, 8464–8468.
15. L. B. Loeb, A. F. Kip, G. G. Hudson, W. H. Bennett. Pulses in Negative Point-to-Plane Corona. *Phys. Rev.* **1941**, 60, 714–722.

16. K. Ichiki, S. Consta. Disintegration mechanisms of charged aqueous nanodroplets studied by simulations and analytical models. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 19168–19175.
17. E. Ahadi, L. Konermann. Ejection of solvated ions from electrosprayed methanol/water nanodroplets studied by molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 9354–9363.
18. G. Longhi, A. Ceselli, S. L. Fornili, S. Abbate, L. Ceraulo, V. Turco Liveri. Molecular dynamics of electrosprayed water nanodroplets containing sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate. *J. Mass Spectrom.* **2013**, 48, 478–486.
19. L. L. Ilag, C. V. Robinson. Evidence for Micellar Structure in the Gas Phase Michal Sharon. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (28), 8740–8746.
20. V. A. Pashynska, M. V. Kosevich, H. Van den Heuvel, M. Claeys. The effect of cone voltage on electrospray mass spectra of the bisquaternary ammonium salt decamethoxinum. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20: 755–763.
21. F. Cacace, G. de Petris, E. Giglio, F. Punzo, A. Troiani. Bile salt aggregates in the gas phase: an electrospray ionization mass spectrometric study. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1925–1933.
22. D. Nohara, T. Ohkoshi, T. Sakai. The possibility of the direct measurement of micelle weight by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12 (23), 1933–1935.
23. D. Nohara, M. Bitoh. Observation of micelle solution of decyltrimethylammonium bromide by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 1434–1437.
24. D. Nohara, T. Kajiura, K. Takeda. Determination of micelle mass by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40 (4), 489–93.
25. L. Ceraulo, G. Giorgi, S. Indelicato, V. Turco Liveri, D. Bongiorno. Do electrospray mass spectra of surfactants mirror their aggregation state in solution?. *J. Mass Spectr.* **2011**, J. 46, 1262–1267.
26. L. Ceraulo, V. Turco Liveri, G. Berden, J. Oomens, G. Giorgi. Gas phase infrared multiple photon dissociation spectra of positively charged sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate reverse micelle-like aggregates. *J. Phys.ical Chem. B.* **2011**, 115, 2282–2286.
27. A.J. Borysik, C. V. Robinson. The ‘sticky business’ of cleaning gas-phase membrane proteins: a detergent oriented perspective. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 14439–14449.

28. G. Longhi, S. L. Fornili, V. Turco Liveri. Structural organization of surfactant aggregates in vacuo: a molecular dynamics and well-tempered metadynamics study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 16512–16518.
29. G. de Petris, M. R. Festa, L. Galantini, E. Giglio, C. Leggio, N. V. Pavel, A Troiani. Sodium glycodeoxycholate and glycocholate mixed aggregates in gas and solution phases. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, 113 (20), 7162–7169.
30. R. Friemann, D. S. Larsson, Y. Wang, D. van der Spoel. Molecular dynamics simulations of a membrane protein-micelle complex in vacuo. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (46), 16606–16607.
31. R. Allen, S. Bandyopadhyay, M. L. Klein. C₁₂E₂ Reverse micelle: A molecular dynamics study. *Langmuir.* **2000**, 16, 10547–10552.
32. G. Giorgi, L. Ceraulo, V. Turco Liveri. Surfactant self-assembly in the gas phase: bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate-alkaline metal ion aggregates. *J Phys Chem B.* **2008**, 112 (5), 1376–82.
33. G. Giorgi, E. Giocaliere, L. Ceraulo, A. Ruggirello, V. Turco Liveri. Spatially ordered surfactant assemblies in the gas phase: negatively charged bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate-alkaline metal ion aggregates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 2206–2212.
34. G. Giorgi, I. Pini, L. Ceraulo, V. Turco Liveri. Gas phase charged aggregates of bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) and divalent metal ions: first evidence of AOT solvated aggregates. *J. Mass Spectrom.* **2011**, 46 (9), 925–932.
35. G. Giorgi, L. Ceraulo, V. Turco Liveri. Surfactant self-assembling in the gas phase: bis(2-ethylhexyl)-sulfosuccinate divalent metal ion anionic aggregates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 2260–2266.
36. S. Indelicato, D. Bongiorno, V. Turco Liveri, A. Mele, W. Panzeri, F. Castiglione, L. Ceraulo. Self-assembly and intra-cluster reactions of erbium and ytterbium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinates in the gas phase. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2014**, 28, 2523–2530.
37. D. Bongiorno, L. Ceraulo, G. Giorgi, S. Indelicato, A. Ruggirello, V. Turco Liveri. Supramolecular aggregates in vacuum: positively monocharged sodium alkanesulfonate clusters. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2010**, 16 (1), 151–161.
38. D. Bongiorno, L. Ceraulo, G. Giorgi, S. Indelicato, M. Ferrugia, A. Ruggirello, V. Turco Liveri. Effects of the net charge on abundance and stability of supramolecular surfactant aggregates in gas phase. *J. Mass. Spectrom.* **2011**, 46, 195–201.

39. S. Indelicato, D. Bongiorno, L. Ceraulo, V. Calabrese, D. Piazzese, A. Napoli, F. Mazzotti, G. Avellone, V. Di Stefano, V. Turco Liveri. Electrospray ion mobility mass spectrometry of positively and negatively charged (1R,2S)-dodecyl(2-hydroxy-1-methyl-2-phenylethyl)dimethylammonium bromide aggregates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2016**, 30, 230–238.
40. S. Roy, D. Khatua, J. Dey. Giant vesicles of a single-tailed chiral cationic surfactant, (1R,2S)-(-)-N-dodecyl-N-methylephedrinium bromide, in water. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 292 (1), 255–264.
41. A. B. Pahi, D. Varga, Z. Kiraly, A. Mastalir. Thermodynamics of micelle formation of the ephedrine-based chiral cationic surfactant DMEB in water, and the intercalation of DMEB in montmorillonite. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* **2008**, 319, 77–83.
42. S. Abbate, M. Passarello, F. Lebon, G. Longhi, A. Ruggirello, V. Turco Liveri, F. Viani, F. Castiglione, D. Mendola, A. Mele. Chiroptical Phenomena in Reverse Micelles: The Case of (1R,2S)- Dodecyl (2-hydroxy-1-methyl-2-phenylethyl)dimethylammonium bromide (DMEB). *Chirality.* **2014**, 26 (9), 532–538.
43. S. Colonna, A. Re, H. Wynberg. Asymmetric induction in the Michael reaction by means of chiral phase-transfer catalysts derived from cinchona and ephedra alkaloids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **1981**, 2, 547–552.
44. J. Dey, A. Mohanty, S. Roy, D. Khatua. Cationic vesicles as chiral selector for enantioseparations of nonsteroidal antiinflammatory drugs by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1048, 127–132.
45. A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill Jr. Ion mobility–mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2008**; 43, 1–22.
46. K. Giles, J. P. Williams, I. Campuzano. Enhancements in travelling wave ion mobility resolution. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, 25, 1559–1566.
47. C. J. Hogan Jr., J. F. de la Mora. Ion Mobility Measurements of Non denatured 12–150 kDa Proteins and Protein Multimers by Tandem Differential Mobility Analysis–Mass Spectrometry (DMA-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22, 158–172.
48. J. Fernández-García, J. F. de la Mora. Measuring the effect of ion-Induced drift-gas polarization on the electrical mobilities of multiply-charged ionic liquid nanodrops in air. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, 24, 1872–1889.
49. G. Longhi, S. Abbate, L. Ceraulo, A. Ceselli, S. L. Fornili, V. Turco Liveri. A molecular dynamics study of structure, stability and fragmentation patterns of sodiumbis(2-

- ethylhexyl)sulfosuccinate positively charged aggregates in vacuo. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 21423–21431.
50. M. Gamero-Castano, J. Fernandez de la Mora. Kinetics of small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 790–803.
51. M. Gamero-Castaño, J. Fernández de la Mora. Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *406*, 67–91.
52. J. V. Iribarne, B. A. Thomson. Evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287–2294.
53. B. A. Thomson, J. V. Iribarne. Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric-pressure. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4451–4463.
54. B. A. Thomson, J. V. Iribarne, P. J. Dziedzic. Liquid ion evaporation mass-spectrometry mass-spectrometry for the detection of polar and labile molecules. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2219–2224.
55. M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. P. Ferguson, M. B. Alice. Molecular beams of macro-ions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240–2249.
56. L. Ceraulo, G. Giorgi, V. Turco Liveri, D. Bongiorno, S. Indelicato, F. Di Gaudio, S. Indelicato. Mass spectrometry of surfactant aggregates. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2011**, *17*, 525–541.
57. G. Longhi, S. Abbate, A. Ceselli, L. Ceraulo, S. L. Fornili, V. Turco Liveri. Structure, stability, and fragmentation of sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate negatively charged aggregates in vacuo by MD simulations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25* (9), 1642–1649.
58. D. Bongiorno, L. Ceraulo, S. Indelicato, V. Turco Liveri, S. Indelicato. Charged supramolecular assemblies of surfactant molecules in gas phase. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 170–187.
59. S. Indelicato, D. Bongiorno, S. Indelicato, L. Drahos, V. Turco Liveri, L. Turiak, K. Vekey, L. Ceraulo, Degrees of freedom effect on fragmentation in tandem mass spectrometry of singly charged supramolecular aggregates of sodium sulfonates, *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 379–383.
60. S. W. Lee, J. L. Beauchamp, Fourier transform ion cyclotron resonance study of multiply charged aggregates of small singly charged peptides formed by electrospray ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 347–351.

61. R. G. Gilbert, S. C. Smith, *Theory of Unimolecular and Recombination Reactions*, Blackwell scientific publications, **1990**.
62. L. L. Griffin, D. J. McAdoo. The effect of ion size on rate of dissociation: RRKM calculations on model large polypeptide ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 11–15.
63. D. Bongiorno, S. Indelicato, L. Ceraulo, U. Perricone, V. Calabrese, A. M. Almerico, V. Turco Liveri, M. Tutone. Micelles of the chiral biocompatible surfactant (1R,2S)-dodecyl(2-hydroxy-1-methyl-2-phenylethyl) dimethylammonium bromide (DMEB): molecular dynamics and fragmentation patterns in gas phase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2017**, 15, 31(13), 1158–1168.
64. R. R. Hudgins, Y. Mao, M. A. Ratner, M. F. Jarrold. Conformations of GlynH and AlanH peptides in the gas phase. *Biophys. J.* **1999**, 76, 1591–1597.
65. D. P. Smith, T. W. Knapman, I. Campuzano, R. W. Malham, J. T. Berryman, S. E. Radford, A. E. Ashcroft. Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, 15, 113–130.
66. Y. Fang, A. Bennett, J. Liu. Selective transport of amino acids into the gas phase: driving forces for amino acid solubilization in gas-phase reverse micelles. *Phys Chem Chem Phys.* **2011**, 13, 1466–1478.