

Scuola di Dottorato in  
Scienze e Tecnologie Chimiche e Farmaceutiche  
Università di Trieste

Dottorandi Ciclo XXVI (2011 – 2013)  
Progetti di Ricerca

Dottorando: **Beltramo Dario**

Tutore e Relatore: Prof. Aurelia Tubaro (DI3)

**Titolo:** Valutazione degli effetti tossici di: PALYTOSSINA & ACIDO OKADAICO

Palytoxin (PLTX) and Okadaic acid (OA), along with their analogues, are toxins produced by marine dinoflagellates, which can occasionally contaminate edible seafood. PLTX is a highly toxic compound associated to human seafood intoxications mainly in tropical and subtropical areas, but recently it has been detected also in microalgae and shellfish from Mediterranean Sea. On the other hand, OA is the main responsible for Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), a seafood intoxication characterized by gastrointestinal symptoms, such as diarrhea, nausea, vomiting and abdominal cramps. Toxicology studies performed in rodents showed intestinal and liver injuries after single intraperitoneal or oral OA administration accompanied by morpho-functional modifications on the lymphoid tissues of thymus and spleen.

In the last decade, PLTX and OA have been detected in the Mediterranean Sea and a possible co-exposure to both toxins can occur through contaminated seafood consumption. *In vivo* toxicological effects of repeated oral co-administration of these toxins will be studied in mice, and compared to the effects of each toxin alone. From the resulting data, the maximum adverse effect dose (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) or the lowest dose causing adverse effects (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL) will be determined in the framework of toxicological risk assessment. In particular, recent events of human intoxication following seafood ingestion have raised awareness regarding toxicological risk assessment. Determination of toxicological endpoints described above are of particular importance in order to obtain exhaustive safety profiles of these two toxins and serve as guide in setting the maximum admitted exposure levels for both routine and occasional human seafood consumers.

Dottorando: **Carini Marco**

Tutore e Relatore: Dr. Tatiana Da Ros (DSCF)

Il fullerene C<sub>60</sub> può trovare applicazione in vari settori, compreso quello biologico, grazie alla sua attività di *radical scavenging*, o alle possibilità di utilizzo in terapia fotodinamica. Inoltre la bassa tossicità e il tropismo per i tessuti tumorali ne fanno ipotizzare l'impiego come vettore per il *drug delivery*. Tuttavia il suo carattere fortemente idrofobico rende difficile l'utilizzo del C<sub>60</sub> non funzionalizzato in sistemi acquosi, ma con opportuna funzionalizzazione è possibile aumentarne di molto la solubilità.

Tra i possibili modi di funzionalizzare il C<sub>60</sub> la cicloaddizione 1,3-dipolare di ilidi azometiniche è uno strumento estremamente versatile per la varietà di gruppi che possono essere introdotti. Tuttavia nel caso dell'addizione multipla tale cicloaddizione manca di selettività ed è quindi difficile ottenere quantità considerevoli di bis- e poli-addotti fulleropirrolidinici isomericamente puri.

Applicando la strategia del *tether*, per altro già utilizzata in diverse metodologie di funzionalizzazione, verranno sintetizzati composti poli-funzionali recanti due o più porzioni aminoacidiche che, in presenza di aldeidi o chetoni, generano ilidi azometiniche, le quali si addizionano al fullerene. In questo modo, variando le dimensioni e la geometria del *tether* si intende controllare la regiochimica della poli-addizione. I *templates* utilizzati saranno rimovibili (ad esempio idrolisi di legami esterei), ottenendo fulleropirrolidine con gruppi funzionali (-OH, -COOH

o -NH<sub>2</sub>) sui quali, in un secondo momento, sarà possibile legare altre molecole quali ad esempio farmaci e/o peptidi e/o oligonucleotidi.

Considerando il ruolo importante che gioca la chiralità nei sistemi biologici, in un primo approccio si eviterà la formazione di centri stereogenici sulle fulleropirrolidine e, pertanto, i sostituenti verranno introdotti solo sull'azoto dell'anello pirrolidinico e non sui carboni 2 e 5. Le miscele di reazione delle cicloaddizioni con i *templates* verranno analizzate tramite HPLC in fase diretta equipaggiata con un rilevatore UV photodiode array in modo da ottenere informazioni qualitative e i poli-addotti fullerenici saranno caratterizzati tramite <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, COSY, spettroscopia UV-Vis e spettroscopia di massa.

Dottorando: **Cavigli Paolo**

Tutore e Relatore: Dr. Tatiana Da Ros (DSCF) e Dr. E. Iengo (DSCF)

**Titolo:** Design, synthesis, and characterization of novel Re(I) dyads and triads containing functionalized fullerenes for light-energy conversion.

Il progetto di dottorato riguarda il campo della chimica supramolecolare, ed in particolare la progettazione, la sintesi (attraverso la coordinazione a metalli di transizione) e la caratterizzazione di nuovi sistemi tridimensionali multi-cromoforici capaci di mostrare proprietà foto-indotte in seguito ad irraggiamento con luce visibile. Nel primo anno una serie di building blocks verranno sintetizzate e caratterizzate (in soluzione e possibilmente allo stato solido), ed in particolare unità "antenna" elettron-donatrici (zinco-porfirine, alluminio porfirine), ed unità elettron-accettrici (renio-bipiridile, fullereni funzionalizzati). Le unità di base saranno quindi opportunamente combinate al fine di ottenere dei sistemi triade, in grado cioè di produrre stati a separazione di carica a seguito di irraggiamento luminoso. La preparazione e caratterizzazione di tali specie richiede l'uso di diverse tecniche sintetiche e spettroscopiche. Le proprietà fotofisiche di questi sistemi, e di opportuni modelli, saranno studiate in collaborazione con il gruppo del Prof. F. Scandola dell'Università di Ferrara. La capacità di generare stati a separazione di carica con tempi di vita relativamente lunghi in seguito ad irraggiamento con luce visibile e la versatilità sintetica di questi sistemi, aprono le porte ad una varietà di addotti più complessi, alla cui preparazione ci si dedicherà nel corso degli anni seguenti, al fine di ottenere sistemi con funzioni più complesse, come la fotocatalisi, o sistemi adatti alla deposizione su superfici e/o nanoparticelle.

Dottorando: **Cok Michela**

Tutore e Relatore: Prof. Maurizio Prato (DSCF)

Carbon nanotubes (CNTs) have been widely employed in the biomedical field due to their electronic, mechanical and chemical characteristics. Carbon nanotubes deposited on a glass substrate promote neuronal cells growth and increase their synaptic activity. In fact, it has been demonstrated that CNTs are able to increase the neuronal activity in terms of a better backpropagation of the action potential. We are planning to exploit these capacities to improve the synapse formation and re-establish the electric communication in neuronal cultures. After these preliminary remarks, CNT network might be a good candidate for promoting tissue regeneration in case of spinal cord injury (SCI). The common causes of damage to the spinal cord are trauma (car/motorcycle accident, gunshot, falls, sports injuries, etc), or disease (Transverse Myelitis, Polio, Spina Bifida, Friedreich's Ataxia, etc.). The resulting damage to the spinal cord is known as a lesion and corresponds to a breakdown in the neuronal communication.

The aim of this project is the development of novel neuro-implantable devices, such as nanoscale bridges and nanovectors, in order to reconnect the communication in the presence of a spinal cord injury. We will perform a functionalization of the pristine CNTs based on the 1,3-dipolar cycloaddition of azomethine ylides. Functionalized carbon nanotubes (f-CNTs) with an ammonium-terminated triethylene glycol chain present a high solubility and the capacity to form complexes based on positive/negative charge interaction. In the first step of this study, we are playing on that characteristic to create, via a layer-by-layer (LbL) assembly technique, a carbon nanotube-

polyelectrolyte thin film on a glass substrate. We will focus our efforts to develop a biocompatible system able to stabilize the f-CNTs networks using:

- negatively charged polyelectrolytes for the interaction with f-CNTs
- long chain polymers for the stabilization of f-CNTs

All the synthesized products will be characterized by thermogravimetric analysis, transmission electron microscopy and atomic force microscopy.

Experiments of neuronal growth and electrical activity in presence of the carbon nanotube-polyelectrolyte devices will be performed in collaboration with prof. Ballerini's group.

**Dottorando: Milcovich Gesmi**

Tutore e Relatore: Dr. Fioretta Asaro (DSCF)

L'attività di ricerca consisterà in indagini su struttura e dinamica di "materia condensata soffice". Durante il primo anno verranno prese in considerazione le vescicole catanioniche. L'aggettivo catanionico indica l'associazione di un tensioattivo anionico con uno cationico, in cui può realizzarsi l'eventualità di nuovi tipi di aggregato non presenti nei sistemi binari acqua-tensioattivo dei componenti.

Il termine vescicole è utilizzato per indicare gusci sferici racchiudenti il mezzo solvente e costituiti da tensioattivi sintetici, laddove il nome liposoma è utilizzato per indicare le strutture analoghe, basate su lipidi, solitamente fosfolipidi, di origine naturale. I liposomi sono di uso consolidato in campo farmaceutico e cosmetico come vettori di molecole biologicamente attive e nella chimica sintetica per la loro capacità di compartimentalizzazione. I tensioattivi naturali, però, soffrono degli svantaggi, ad esempio l'alto costo, un limitato numero di composti, e la scarsa riproducibilità.

Le vescicole catanioniche, pur essendo diventate oggetto di interesse in tempi ben più recenti dei liposomi, hanno già trovato alcuni importanti utilizzi applicativi nel drug e gene delivery e come templanti per la sintesi di capsule cave, ma c'è ancora molto spazio per ampliarne il campo d'impiego e per migliorare le proprietà, anche in virtù della la grandissima varietà dei tensioattivi sintetici disponibili. Restano vari aspetti non completamente chiariti, proprio riguardo a stabilità termodinamica e cinetica ed effetto degli ioni. Particolarmente interessante è la transizione da vescicole multilamellari a vescicole unilamellari indotta dalla temperatura. Con questi obiettivi verranno prese in considerazione durante il I anno del dottorato vescicole catanioniche corrispondenti a sistemi già descritti in letteratura, utilizzando cioè come tensioattivo anionico un alchilsolfato o un alchilsolfonato di sodio e come tensioattivo cationico un bromuro di tetraalchilammonio o alchilpiridinio. Verranno svolte indagini di spettroscopia NMR multinucleare e PGSE NMR, applicando quelle specifiche tecniche che si sono dimostrate utili per la comprensione dei liposomi, ma che si stanno ulteriormente evolvendo, e non sono ancora molto utilizzate per le vescicole. Mediante tali metodi si possono ottenere informazioni su interazione con i controioni, mobilità delle code, diffusione superficiale, lamellarità, permeabilità all'acqua e a piccoli soluti. Verranno sfruttate informazioni addizionali ottenute mediante altre tecniche, specialmente spettroscopiche, quali l'UV-Vis e l'FT-IR, in modalità ATR (attenuated total reflection), quest'ultima particolarmente adatta per lo studio della conformazione delle catene alchiliche e del coinvolgimento delle teste nell'interazione.

Le tecniche spettroscopiche sono in grado fornire informazioni prevalentemente su scale dei tempi veloci e scale delle lunghezze dell'ordine molecolare, ma una completa comprensione delle vescicole richiede l'uso combinato di tecniche che coprano un vasto intervallo di scale spaziali e temporali. A tal fine si potrà sfruttare il confronto con dati strutturali ottenuti mediante dynamic light scattering (DLS) e small angle X rays scattering (SAXS) e dati dinamici ottenuti mediante rilassamento dielettrico, reologia e rheo-NMR, grazie a collaborazioni con le Università di Roma La Sapienza e della Calabria.

**Dottorando: Foscatto Marco**

Tutore e Relatore: Prof. Lucia Gardossi (DSCF)

Il primo anno di ricerca si concentrerà sull'applicazioni di tecniche computazionali atte alla simulazione dell'attività e della stabilità di enzimi nelle condizioni operative, nell'ottica di un razionale sviluppo di processi industriali biocatalizzati.

In particolare si tratterà l'effetto dei solventi organici sugli aspetti termodinamici e cinetici delle reazioni catalizzate da enzimi, considerando nello specifico i fenomeni di solvatazione e desolvatazione delle specie chimiche coinvolte nella reazione. Lo studio delle caratteristiche dei sistemi solvente e del loro effetto sulle reazioni, si baserà sull'utilizzo di software per la caratterizzazione di piccole molecole come i solventi, delle interazioni tra piccole molecole e con le macromolecola cercando correlazioni con le evidenze macroscopiche sperimentali.

Inoltre, verrà affrontato lo studio della stabilità di enzimi in solvente organico. Utilizzando i metodi della statistica multivariata, si costruiranno modelli 3DQSAR al fine di relazionare le proprietà calcolabili da modelli computazionali con la stabilità osservabili nelle condizioni operative. In questo modo si vuole interpretare al meglio l'informazione ottenuta sperimentalmente cercando di identificare le caratteristiche enzimatiche che meglio correlano con la stabilità, permettendo così una previsione utile anche ad uno screening virtuale delle condizioni operative.

Un'attenzione speciale verrà rivolta nei confronti della glicosilazione, che è considerato uno dei contributi più significativi alla stabilizzazione, ma che a causa della sua eterogenicità intrinseca, viene spesso trascurato. Si cercheranno degli strumenti computazionali per costruire modelli in grado di considerare la glicosilazione e valutarne l'effetto sui diversi aspetti che concernono l'utilizzo di un biocatalizzatore.

**Dottorando: Laboragine Valeria**

Tutore e Relatore: Prof. Fabio Benedetti (DSCF)

Il programma scientifico per il 2011 sarà basato principalmente sulla sintesi di inibitori peptidomimetici di proteasi virali e sulla sintesi di inibitori delle Prolilproteasi basati su isosteri di dipeptidi del tipo *Xaa-Pro*.

Le metodologie già utilizzate per la sintesi degli inibitori della HIV-PR verranno estese alla sintesi di inibitori di altre proteasi virali quali, ad esempio, la proteasi del virus dell'epatite C (HCV-PR) e la proteasi del virus del Nilo Occidentale (WNV-PR).

Ci concentreremo su inibitori basati su isosteri idrossietilenici che dovranno contenere gruppi in grado di mimare i dipeptidi *Thr/Cys-Ala/Ser* (per la HCV-PR), *Arg-Gly* per la (WNV-PR) e *Gln-Gly/Ala/Ser* (per la SARS-PR); gli inibitori verranno infine ottenuti coniugando gli isosteri con opportuni gruppi laterali che garantiscano il riconoscimento da parte dell'enzima.

Un'ulteriore applicazione delle metodologie sintetiche messe a punto per gli inibitori dell'HIV-PR sarà la sintesi di inibitori di prolilpeptidasi basati su isosteri di tipo *Xaa-Pro*.

In particolare verrà ottimizzata una procedura, già attualmente in studio per la sintesi di inibitori dell'HIV-PR, che prevede l'idrossilazione stereoselettiva di olefine ottenute mediante reazione di ring closing-metatesi (RCM) a partire da olefine terminali derivanti da *L*-amminoacidi *Boc*-protetti. L'attività degli inibitori ottenuti nel corso del progetto verrà valutata determinando i valori di IC50 su enzimi isolati disponibili commercialmente, utilizzando saggi fluorimetrici standard condotti nella cella di uno spettrofotometro o, nel caso di librerie, in micro piastre da 96 pozzetti.

**Dottorando: Leon Castellanos Veronica**

Tutore e Relatore: Prof. Maurizio Prato (DSCF)

Graphene is a two-dimensional material composed of layers of carbon atoms forming six-membered ring. It has recently attracted great attention as a new material with many advantageous properties, such as extremely high electric and thermal conductivity at room temperature, high strength and a large surface area. However, a major obstacle is the preparation of a single-layer graphene and its inherent lack of solubility.

One of the main challenges in the production of graphene is the scalable processing and handling of individual graphene sheets. Methods for the fabrication of graphene in a dry environment include

the micromechanical cleavage of graphite and the epitaxial growth of graphene on certain substrates. By these techniques, very large entities of single-layer graphene can be produced, but the scalability and handling problems remain. The most promising route is the direct exfoliation of either chemically modified or graphite directly into various solvents. For example, graphene oxide can be exfoliated from graphite via acidic treatments. However, the oxidation process results in the formation of structural defects, which may lower the conductivity of graphene dramatically.

We will use a scalable and easy technique for exfoliation of graphene sheets in the presence of melamine by ball milling processes in solvent free conditions. The organic molecules, such as melamine, will modify the surface of graphene in a noncovalent and nondestructive way. This fact will enable the stabilization of the graphene sheets. The ball milling experiments will be carried out in a planetary mill. Afterwards, the materials will be suspended in a variety of aqueous solutions and organic solvents by means of sonication, in order to obtain solutions of graphene.

Finally, graphene sheets will be characterized by various techniques, such as transmission electron microscopy (TEM), UV-vis spectrometry, Raman spectrometry and thermogravimetric (TGA).

This approach will permit, in a next step, the functionalization of graphene with organic groups, using the common methods already employed for the organic functionalization of carbon nanotubes.

**Dottorando: Martinelli Andrea**

Tutore e Relatore: Prof. Lucia Pasquato (DSCF)

Il programma di ricerca del primo anno del dottorato sarà centrato sullo studio di reazioni o di approcci sintetici innovativi per la sintesi di intermedi, composti di chimica fine o principi attivi. Queste vie di sintesi alternative devono presentare caratteristiche di interesse per l'industria. Durante il primo anno lo studio sarà focalizzato sull'addizione di Michael asimmetrica di nucleofili allo zolfo su calconi o altri composti carbonilici alfa,beta-insaturi con l'obiettivo di trovare dei catalizzatori adatti ad ottenere processi con elevata enantioselezione. In particolare, saranno presi in considerazione organo-catalizzatori riportati in letteratura ed utilizzati nel promuovere reazioni di Michael. Questi composti in genere non sono commerciali e sarà quindi necessario prepararli in laboratorio. Gli studi di base saranno condotti sul calcone e poi estesi a substrati più complessi di interesse per la preparazione di composti attualmente in commercio. Per quanto riguarda i nucleofili saranno studiati principalmente reazioni con nucleofili allo zolfo utilizzando composti modello e tioli di interesse per la preparazione di specifici target. Il progetto prevede una comprensione dettagliata del meccanismo del processo in modo da poter razionalizzare i dati sperimentali e acquisire i criteri che consentono di rendere generale la reazione oggetto di studio.

**Dottorando: Rubesa Fernandez Adriana Spela**

Tutore e Relatore: Prof. Iginio Colussi (DI3)

Il progetto di ricerca si articola su due temi tra loro strettamente collegati in quanto costituenti i processi di depurazione delle acque reflue.

La prima indagine (impegno prevalente del I° anno di dottorato) consiste nello sviluppo di una nuova tecnologia di trattamento di reflui urbani con processo aerobico che, mantenendo comunque elevato il rendimento complessivo del processo depurativo, consenta una diminuzione della produzione dei fanghi (riduzione dei costi di impianto e di esercizio) e la rimozione dei nutrienti (raggiungimento dei limiti di legge imposti sull'effluente) in sistemi impiantistici sufficientemente semplici. A tale scopo, si intende utilizzare un reattore SBR in cui la biomassa aerobica è costituita da fango granulare, in quanto, come appare da letteratura recente, in tal modo si riduce la produzione di fango ed è possibile, in determinate condizioni, ottenere la simultanea nitrificazione e denitrificazione del refluo.

Di conseguenza, questa fase dello studio riguarderà la sperimentazione finalizzata alla granulazione del fango, a partire da un fango attivo aerobico. La ricerca, in particolare, tenderà alla

individuazione dei parametri operativi che favoriscono la riuscita del processo stesso, fornendo granuli di fango di adeguate dimensioni (necessarie per il processo nitro/denitro).

Il fango granulare aerobico sarà impiegato in reattore su scala di laboratorio, alimentato con refluo sintetico, per la valutazione delle prestazioni del fango granulare stesso in termini di diminuzione della quantità di fango prodotta e dell'efficienza di rimozione del carbonio organico e dei nutrienti.

Verranno anche poste le basi per affrontare il problema della riduzione e della destinazione dei fanghi di depurazione in generale, con particolare riferimento alla loro utilizzazione quale fonte energetica (biogas) conseguente alla loro digestione anaerobica. Metodi di tipo biologico di riduzione della produzione dei fanghi possono essere considerate un intervento preventivo nell'ottica di contenere i costi di smaltimento. Inoltre, nel prosieguo dell'attività di dottorato, è previsto lo studio specifico sull'utilizzo di fanghi e di biomasse primarie e residuali (energy crops) per la generazione di un vettore energetico (biogas) mediante digestione anaerobica.

La ricerca potrà beneficiare della collaborazione con aziende del settore.