

Azione 1.1.5 “Sostegno all'avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di valutazioni su larga scala”
PO FESR Sicilia 2014-2020

Progetto di ricerca
“Nuovi prodotti dalla trasformazione agroindustriale di frutti da colture mediterranee e gestione sostenibile dei sottoprodotti - MedFruit”



Allegato 21:

“Studio chemometrici sulla formazione di eventuali complessi di inclusione “HOST-GUEST” per l'eliminazione di pesticidi dagli oli essenziali agrumari”

- Università degli Studi di Catania
- Citrech snc

STUDI CHEMOMETRICI SULLA FORMAZIONE DI EVENTUALI COMPLESSI DI INCLUSIONE “HOST-GUEST” PER L’ELIMINAZIONE DI PESTICIDI DAGLI OLI ESSENZIALI AGRUMARI.

Introduzione

La chimica computazionale è una disciplina relativamente nuova che è divenuta sempre più popolare man mano che la capacità di calcolo degli elaboratori è cresciuta negli ultimi decenni.

La chimica computazionale viene utilizzata per comprendere meglio le reazioni ed i processi chimici ed il computer riesce a mostrare i processi chimici “dall’interno”.

La sfida della chimica computazionale è quella di caratterizzare e predire la struttura e la stabilità di sistemi chimici, di stimare le differenze di energia tra stati differenti e di spiegare le modalità ed i meccanismi delle reazioni a livello atomico. Riuscire in queste sfide significa risparmiare un’enorme quantità di tempo in esperimenti!

La chimica computazionale può essere anche utilizzata per studiare il comportamento dinamico delle molecole; in altre parole, un sistema molecolare a temperatura ambiente è caratterizzato accuratamente dal suo moto; le simulazioni di meccanica molecolare calcolano le velocità e le posizioni future degli atomi basandosi sui loro valori correnti ed è possibile ottenere dati qualitativi e quantitativi da queste simulazioni che consentono di raffinare strutture di modelli generati da differenti sistemi di indagine. Questi risultati sono particolarmente importanti negli studi su molecole ad alto peso molecolare dove possono avvenire moti concertati durante legami tra ligandi o attività enzimatiche. E’ possibile seguire le traiettorie di dinamica molecolare, cioè il set di posizioni e velocità degli atomi nel tempo, ed usarli per mettere in rilievo variazioni conformazionali che possono comportare variazioni con il sito attivo.

Metodologia

Citrech Snc ha inteso utilizzare tecniche di Chimica Supramolecolare per la rimozione selettiva di presidi fitosanitari dagli oli essenziali agrumari.

La Chimica Supramolecolare è la chimica del legame intermolecolare e prende in esame le strutture e le funzioni di nuove entità chimiche che si formano in seguito all’associazione tra due o più specie

chimiche diverse. La Chimica Supramolecolare può essere definita come la chimica “oltre la molecola”, la chimica delle interazioni intermolecolari, che sono deboli, cioè non si devono formare legami covalenti ma entrano in gioco interazioni elettrostatiche, idrofobe, legami a idrogeno, tra nuvole ρ , di coordinazione che hanno la caratteristica di essere reversibili.

Queste interazioni di solito coinvolgono complementarietà delle forme, delle proprietà delle superfici e delle cariche delle molecole che si vogliono far interagire (concetto di recettore molecolare) e tutto ciò ha, ovviamente, un carattere di estrema selettività.

Le molecole che possono essere utilizzate per questi scopi sono gli eteri corona, i criptandi, le ciclodestrine, i calixareni ed i ciclofani.

Escludendo gli eteri corona, piuttosto specifici per ioni metallici alcalini ed usati, di solito, per solubilizzare ioni metallici in solventi non acquosi, ed escludendo, altresì, i criptandi, i calixareni ed i ciclofani, non compatibili con le caratteristiche di “alimento” o di “cosmetico” degli oli essenziali agrumari, tra le possibili “molecole ospite” dobbiamo quasi obbligatoriamente scegliere le ciclodestrine.

Le ciclodestrine sono oligomeri ciclici costituiti da 6-8 unità di glucosio; sono, quindi, dei derivati degli zuccheri e sono solubili in acqua ma hanno la caratteristica di presentare al loro interno una cavità poco polare all'interno della quale possono ospitare una molecola idrofoba.

L'idea è quella di cercare di sfruttare questa caratteristica cruciale di questa classe di molecole per verificare la possibilità di “bloccare” le nostre molecole target, rimuovendole selettivamente dall'olio essenziale e, possibilmente trasferendole in acqua o soluzione acquosa sfruttando la solubilità intrinseca delle ciclodestrine.

Bisognerà, quindi, valutare, e poi sperimentare, moltissimi fattori (chimico-fisici, elettrici, elettrostatici, sterici, di legame) in quanto da un punto di vista teorico generale l'interazione di una molecola di questa classe con un qualsiasi substrato ha caratteristiche molto simili a quelle che si osservano per le proteine, cioè c'è selettività nel riconoscimento della molecola (la cavità ha una dimensione precisa e poco flessibile), c'è reversibilità (in quanto non ci sono legami covalenti in gioco) ed è sempre possibile l'inibizione da parte di molecole ospiti (guest) che mostrino una maggiore affinità per la molecola ospite rispetto alle nostre molecole target.

Simulare il comportamento di molecole di pesticidi disciolte in un sistema estremamente complesso quale un olio essenziale agrumario quando vengono in contatto con le ciclodestrine è praticamente impossibile; si è deciso, quindi, di eseguire le simulazioni costruendo le varie molecole coinvolte nelle prove, e ricercando le conformazioni più stabili per mezzo di tecniche combinate di meccanica e dinamica molecolare con l'impiego di un protocollo del tipo "simulated annealing", equilibrando le loro strutture dapprima "in vacuo" e quindi in condizioni di solvatazione in celle cubiche (periodic box). I vari sistemi dovranno essere minimizzati, gradualmente riscaldati (300 -310°K) ed equilibrati a queste temperature. Ricordiamo che la tecnica del "simulated annealing" serve ad evitare che le simulazioni di dinamica molecolare possano intrappolare le strutture in minimi locali ed allo scopo utilizza un raffreddamento lento del sistema ad alcune appropriate temperature inferiori.

Dal comportamento dei sistemi molecolari in queste condizioni dovrebbe essere possibile predire il comportamento dei sistemi ciclodestrina – pesticida e scegliere le ciclodestrine più idonee cioè quelle da danno luogo ad addotti o complessi più stabili con le varie molecole di pesticidi.

Le molecole di pesticidi prescelte sono le seguenti:

- | | |
|--------------------|----------------------|
| 1. tiabendazolo | 6. bromopropilato |
| 2. imazaryl | 7. chlorpyrifos |
| 3. fentoato | 8. dicofol |
| 4. ortofenilfenolo | 9. fenson |
| 5. methidation | 10. parathion metile |

Dopo aver "costruito" queste molecole mediante un software di modellazione molecolare, esse sono state sottoposte, sfruttando le caratteristiche del software stesso, a calcoli di meccanica quantistica dei tipi seguenti: "single point", minimizzazione (od ottimizzazione delle geometria), dinamica molecolare e Monte Carlo.

Il calcolo "single point" fornisce le proprietà statiche di una molecola, proprietà che includono energia potenziale e sua derivata, potenziale elettrostatico, energie degli orbitali molecolari ed i coefficienti degli stessi orbitali molecolari per lo stato fondamentale e gli stati eccitati.

Nell'eseguire una minimizzazione, invece, il software inizia con un set di coordinate cartesiane per una molecole e cerca di trovare un nuovo set di coordinate con un minimo di energia potenziale.

I calcoli di minimizzazione non possono attraversare barriere di energia potenziale, per cui la struttura molecolare trovata durante l'ottimizzazione può benissimo essere un minimo locale e non il minimo globale, più esattamente il minimo più vicino alla struttura iniziale della molecola.

Le simulazioni di dinamica molecolare campionano fasi di spazio, regioni definite da posizioni e velocità atomiche, integrando numericamente le equazioni newtoniane del moto; a differenza dei calcoli “single point” e della minimizzazione, i calcoli di dinamica molecolare tengono in considerazione i moti termici; le molecole possono contenere abbastanza energia termica per attraversare barriere di potenziale, per cui è così possibile ottenere informazioni sulle possibili conformazioni, sulle proprietà termodinamiche e sul comportamento dinamico delle molecole.

Le simulazioni Monte Carlo campionano fasi di spazio generando configurazioni casuali per mezzo di una distribuzione di Boltzmann ad una data temperatura; le medie calcolate corrispondono ad un insieme di medie termodinamiche per cui il metodo Monte Carlo può essere utilizzato per trovare energie medie e proprietà di equilibrio strutturale in sistemi che interagiscono in modo complesso. Queste simulazioni, spesso, rappresentano la via più diretta all'equilibrio strutturale ed alle proprietà termodinamiche.

Per essere chiari sin da principio, il software che abbiamo utilizzato può usare due metodologie di calcolo; meccanica molecolare e meccanica quantistica; quest'ultima è, di solito, particolarmente utile con le biomolecole ma richiede importanti database per parametrizzare i metodi di calcolo e fornire risultati soddisfacenti.

Nel nostro caso tutte queste informazioni non sono disponibili per cui abbiamo preferito utilizzare calcoli di meccanica molecolare che utilizza le equazioni della meccanica classica per descrivere le superfici di energia potenziale e le proprietà fisiche delle molecole che, quindi, vengono descritte come una collezioni di atomi che interagiscono gli uni con gli altri mediante semplici funzioni analitiche. Questa descrizione è chiamata a “campi di forza”.

Un componente di un campo di forza è l'energia derivante dalla compressione e l'allungamento di un legame, componente che è spesso approssimata ad un oscillatore armonico e che può essere calcolato con la legge di Hooke con il legame tra due atomi assimilato ad una molla che connette due masse. L'energia potenziale di un sistema molecolare in un campo di forza è la somma dei singoli componenti del potenziale quali i legami, gli angoli di legame e i potenziali di Van der Waals. Le energie dei singoli componenti dei legami sono funzione della deviazione di una molecola rispetto ad una condizione ipotetica che ha le varie interazioni di legame ad un valore

minimo. In meccanica molecolare l'energia assoluta di una molecola non ha significato fisico intrinseco ed i valori di energia totale sono utili solo per comparazioni tra molecole.

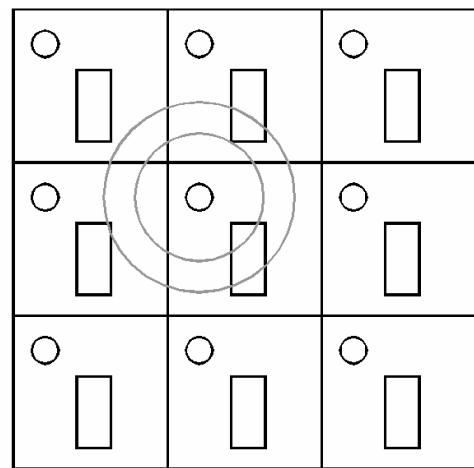
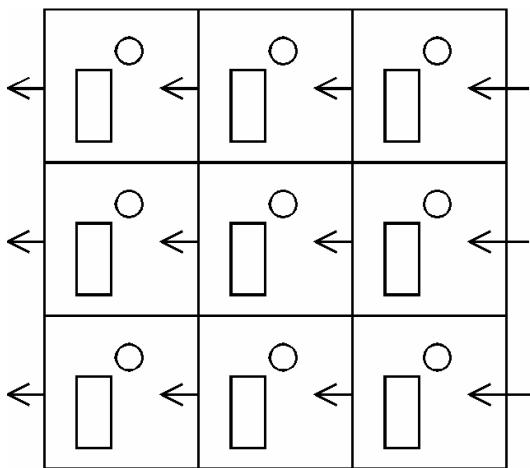
Mentre le energie da calcoli “single point” con tecniche di meccanica quantistica sono in relazione con le entalpie molecolare (anche se in realtà non sono entalpie vere e proprie perché mancanti dei contributi dei moti termici e di quelli dipendenti dalla temperatura) i calcoli di meccanica molecolare non trattano gli elettroni in modo esplicito, non possono descrivere la formazione di legami, la rottura di legami o sistemi in cui la delocalizzazione elettronica o interazioni di orbitali molecolari giochino un ruolo fondamentale nel determinare la geometria o le proprietà, mentre risultano utili in sistemi che non coinvolgano le proprietà appena elencate ed è per questo motivo che questi calcoli sono stati utilizzati nelle nostre simulazioni.

Un altro aspetto che abbiamo dovuto tenere nella giusta considerazione è quello inherente la solvatazione.

Delle simulazioni al computer in cui le molecole coinvolte si trovano astrattamente nel vuoto non avrebbero probabilmente alcuna utilità pratica; si è quindi ritenuto necessario verificare i risultati dei calcoli chemometrici in presenza di solvatazione poiché essa è particolarmente importante quando soluto e solvente sono polari o quando possono essere coinvolti legami ad idrogeno.

Il solvente, infatti, può fortemente influenzare le energie di conformazioni differenti del soluto o configurazioni di atomi, la natura delle interazioni soluto-soluto e soluto-solvente dipendono dall’ “ambiente solvente” e, infine, perché il solvente influenza le caratteristiche del legame a idrogeno, l’area superficiale del soluto e l’esposizione di eventuali gruppi idrofobi.

Il software di modellazione molecolare che abbiamo utilizzato usa un modello di solvatazione chiamato “**TIP3P**” ; in parole povere, si pone una molecola di soluto in una scatola di molecole d’acqua e vengono imposte delle condizioni al contorno periodiche, cioè il software circonda la “scatola” iniziale di sue immagini virtualmente identiche per cui le molecole più distanti dal centro del box originale non soffrono più delle interazioni con i confini (e quindi con il vuoto) in quanto il box originale incontra proprie immagini in tutte le direzioni. Dal momento che le immagini periodiche sono copie esatte del box originale, i movimenti degli atomi nel box originale sono replicate nelle immagini e quando una particella lascia il box la sua immagine periodica rientra dalla parte opposta e la sostituisce permettendo di conservare il numero di atomi in ciascun box.



La particella rotonda nella cella [B,B] ha due possibili “cutoff” di non legame; con quello esterno la particella interagisce sia con il rettangolo che con la sua immagine periodica, mentre riducendo il “cutoff” ad un raggio appropriato (il cerchio interno) la particella può interagire solo con un rettangolo, quello della cella [B,B].

Le molecole “guest”

Abbiamo già elencato le molecole di pesticidi sulle quali ci è stato chiesto di focalizzare lo studio, per ciascuna di esse riportiamo i dati caratteristici:

tiabendazolo

Il nome IUPAC è 2-(tiazol-4-il)benzimidazolo, la formula bruta è C₁₀H₇N₃S ed appartiene alla classe dei benzimidazoli. Il peso molecolare è 201,2; il punto di fusione è 304-305°C, non è volatile a temperatura ambiente e, nelle normali condizioni, è stabile all'idrolisi, alla luce ed al calore.

Le solubilità a 25°C sono le seguenti :

acqua (pH 2)	10.000 mg/l	etanolo	7.900 mg/l
acqua (pH 5 – 12)	< 50 mg/l	benzene	230 mg/l
acqua (pH 12)	> 50 mg/l	cloroformio	80 mg/l
acetone	4.200 mg/l	metanolo	9.300 mg/l

La sua formula di struttura è la seguente :

Viene utilizzato per le sue proprietà fungicide.

imazalyl

Il nome IUPAC è allil 1-(2,4 diclorofenil)-2-imidazol-1-etiletere, la formula bruta è $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$ ed appartiene alla classe degli imidazoli. Il peso molecolare è 297,2 , è poco solubile in acqua e solubile nei comuni solventi organici. E' anch'esso un fungicida e la sua formula di struttura è riportata qui accanto.

fentoato

Il nome IUPAC è etil 2-dimetossifosfinotiolto(fenil)acetato, la formula bruta è $C_{12}H_{17}O_4PS_2$ ed appartiene alla classe dei ditiofosfati.

Il peso molecolare è 320,4 e la solubilità in acqua è di 11 mg/l. Il prodotto è stabile a pH compresi tra 3,9 e 7,8 ed il suo punto di fusione è 17-18°C. E' dotato di proprietà insetticide. La formula di struttura è riportata qui accanto.

orto-fenilfenolo

Il nome IUPAC è 1,1'-bifenil-2-olo; la formula bruta è $C_{12}H_{10}O$; il suo peso molecolare è 170,2.

Il punto di fusione è 58-60°C ed è insolubile in acqua. La formula di struttura è riportata qui accanto.

methidation

Il nome IUPAC è S-2,3-diidro-5-metossi-2-ossi-1,3,4-tiadizol-3-metil O,O-dimetil fosfoditoato; la formula bruta è $C_6H_{11}N_2O_4P_3S$; si tratta di un organofosfato appartenente alla classe dei ditiofosfati; il suo peso molecolare è 302,3.

Il punto di fusione è 39-40°C. La formula di struttura è riportata qui accanto. Il prodotto è piuttosto stabile all'idrolisi sia in ambiente neutro che leggermente acido. Le solubilità a 20°C sono le seguenti :

xilene	600 mg/l		
cicloesanone	850 mg/l	etanolo	260 mg/l
acetone	690 mg/l	acqua	250 mg/l

bromopropilato

Il nome IUPAC è isopropil 4,4'-dibromobenzilato; la formula bruta è C₁₇H₁₆Br₂O₃; si tratta di un aloidrocarburo appartenente alla classe dei benzilati ed è dotato di proprietà acaricide; il suo peso molecolare è 428,1.

Il punto di fusione è 77°C. La formula di struttura è riportata qui accanto. Il prodotto è piuttosto stabile all'idrolisi sia in ambiente neutro che leggermente acido. Le solubilità a 20°C sono le seguenti :

xilene	530 mg/l	diossano	870 mg/l
benzene	750 mg/l	metanolo	280 mg/l
acetone	850 mg/l	acqua	< 0,5 mg/l

chlorpyrifos

Il nome IUPAC è O,O'-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridilfosfato; la formula bruta è C₉H₁₁Cl₃N₃OPS; si tratta di un organofosfato appartenente alla classe dei tionofosfati ed è dotato di proprietà insetticida; il suo peso molecolare è 350,6.

Il punto di fusione è 42-43°C. La formula di struttura è riportata qui accanto. Le solubilità a 25°C sono le seguenti :

xilene	5000 mg/l	cloroformio	6300 mg/l
benzene	7900 mg/l	metanolo	450 mg/l
acetone	6500 mg/l	acqua	1,4 mg/l

dicofol

Il nome IUPAC è 2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanolo; la formula bruta è C₁₄H₁₉Cl₅O ; si tratta di un aloidrocarburo appartenente alla classe dei difeniletanoli ed è dotato di proprietà acaricide; il suo peso molecolare è 370,5. La molecola è stabile in ambiente acido mentre in ambiente alcalino si idrolizza in cloroformio e 4,4'-diclorobenzofenone.

Il punto di fusione è 78-79°C. La formula di struttura è riportata qui accanto. Il prodotto è praticamente insolubile in acqua e solubile nella maggior parte dei solventi organici.

fenson

Il nome IUPAC è 4-clorofenilbenzensulfonato; la formula bruta è C₁₂H₉Cl₃OS ; si tratta di un solfororganico appartenente alla classe dei sulfonati ed è dotato di proprietà acaricide; il suo peso molecolare è 268,7. La molecola in ambiente alcalino si idrolizza facilmente.

Il punto di fusione è 61-62°C. La formula di struttura è riportata qui accanto. Il prodotto è moderatamente solubile in acqua e solubile nella maggior parte dei solventi organici polari ed aromatici.

Parathion metile

Il nome IUPAC è O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosfotioato; la formula bruta è C₈H₁₀N₅OPS ; si tratta di un fosfororganico appartenente alla classe dei tionofosfati ed è dotato di proprietà insetticida; il suo peso molecolare è 262,3. Il punto di fusione è 35-36°C. La formula di struttura è riportata qui accanto. Il prodotto in acqua ha una solubilità di 55-60 mg/l mentre è estremamente solubile in diclorometano.

Le molecole “host”

Le molecole “ospiti” che, selettivamente, desideriamo investigare sono le ciclodestrine.

Le **cyclodestrine** (CD) sono oligosaccaridi ciclici naturali formati da 6, 7 o 8 monomeri di D-(+)-glucopiranosio uniti tra loro con un legame α ,1-4 glucosidico e chiusi ad anello.

Le cyclodestrine furono individuate per la prima volta da Villiers nel 1891, che credendo si trattasse di una sostanza unica la chiamò cellulosa; in seguito Schardinger ne identificò le tre strutture α , β e γ . Da quel momento le CD furono note come Zuccheri di Schardinger e in seguito

come cyclodestrine. Dal 1911 al 1935, Pringsheim fu il più autorevole ricercatore in questo campo, egli dimostrò che le CD formano complessi stabili in acqua con numerose molecole lipofile.

Dalla metà degli anni settanta le cyclodestrine naturali furono chimicamente caratterizzate e furono approfonditamente studiati complessi con

svariate molecole.

Le cyclodestrine hanno struttura tronco-conica. In base al numero di monomeri: 6, 7, o 8 sono dette alfa, beta o gamma CD. Le tre classi di CD differiscono tra loro per grandezza dell'anello e dunque dalla cavità (pari a 5.70, 7.80 e 9.50 angstrom) e per la solubilità in acqua, pari a 18.5 g/l per la β 145 g/l per l' α e 232 g/l per la γ . A temperatura ambiente si presentano come una polvere bianca cristallina inodore dal sapore debolmente dolce. La cavità centrale è di natura idrofoba, mentre la parte esterna è idrofila; tali proprietà dipendono dalla conformazione degli ossidrili delle unità di glucosio. Grazie a questa struttura le cyclodestrine sono in grado di ospitare nella loro cavità sostanze di natura lipofila formando dei complessi di inclusione di tipo supramolecolare. Le sostanze che si accomodano nella cavità delle cyclodestrine sono dette *guest*, mentre le CD stesse sono dette *host*, così come altre sostanze con comportamento simile. Tra le tre CD la più usata è la beta, in quanto l'alfa risulta avere una cavità troppo piccola, la gamma invece risulta essere piuttosto costosa. La beta CD è meno idrosolubile rispetto alle altre due a causa dell'elevata tendenza con la quale forma dimeri insolubili, per questo sono state operate

varie modifiche strutturali al fine di determinare una diminuzione della dimerizzazione e, dunque un aumento della solubilità in acqua. La formazione di un complesso di inclusione host/guest con ciclodestrine determina un miglioramento delle proprietà chimico-fisiche della sostanza inclusa e ne determina un notevole incremento della solubilità in acqua.

Volendo spiegare l'uso che intendiamo fare degli studi chemometrici, di seguito schematizziamo un piccolo esempio di quello che potrebbe accadere:

CICLODESTRINA
VUOTA

COMPLESSO CICLODESTRINA - SUBSTRATO
SUPRAMOLECOLA

Studi Chemometrici “in vacuo” – costruzione dei modelli molecolari

Abbiamo iniziato lo studio dai presidi fitosanitari scelti per questa ricerca.

tiabendazolo

Dopo aver costruito la molecola, abbiamo ottimizzato la struttura mediante un algoritmo a gradiente coniugato (Polak-Ribiere) utilizzando come condizioni di termine un gradiente di 0,1 kcal/[°A mol].

Di fianco è riportata la struttura ottenuta e di seguito i dati con le proprietà della molecola calcolate dal software.

L’ottimizzazione di dinamica molecolare è stata eseguita nelle condizioni seguenti:

Le proprietà
della molecola
riportate di
fianco; mentre
l’aspetto della
molecola è
riportato di
seguito:

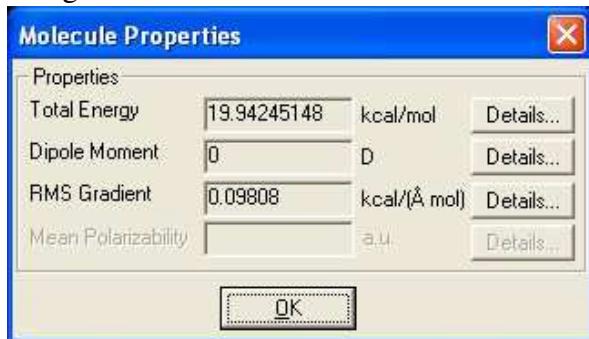
La molecola è stata, quindi, sottoposta a docking Monte Carlo nelle condizioni riportate di seguito:

E la seguente struttura molecolare definitiva, sempre, ovviamente, “in vacuo”.

Per le altre molecole di pesticidi si è lavorato in modo assolutamente analogo ottenendo i dati riportati di seguito.

imazaryl

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:



fentoato

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

orto-fenilfenolo

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

methidation

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

bromopropilato

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

chlorpyrifos

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

dicofol

Parathion metile

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

Le stesse operazioni sono state effettuate con le ciclodestrine.

a-Ciclodestrina

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

b-Cyclodextrina

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

g-Cyclodextrina

Considerando le solubilità decisamente maggiori degli idrossipropilderivati della ciclodestrine rispetto alle molecole madri, abbiamo voluto ripetere le operazioni anche per queste molecole con i seguenti risultati:

idrossipropil- α -ciclodestrina

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

idrossipropil- β -ciclodestrina

idrossipropil-g-ciclodestrina

La “struttura definitiva e le proprietà calcolate sono le seguenti:

Studi Chemometrici in “periodic box” – costruzione dei modelli molecolari

Dal momento che tutte le strutture sin qui elaborate e stabilizzate sono “in vacuo”, facendo seguito a quanto esplicitato nella parte introduttiva del presente lavoro, dobbiamo ripetere tutte le elaborazioni in presenza di acqua. Tutte le molecole sono state quindi poste in un “periodic box” le cui dimensioni, determinate dal software, non sono state modificate per evitare di interferire con il modello di solvatazione “TIP3P” e, di conseguenza, non è stato variato il numero di molecole d’acqua inserite nel “periodic box” rispetto a quanto calcolato dal software.

Desideriamo far notare come i calcoli di ottimizzazione molecolare (ottimizzazione geometrica, dinamica molecolare e docking Monte Carlo) in questo caso siano stati decisamente più lunghi.

Nel caso delle ciclodestrine, per esempio, per ognuna delle molecole sono stati necessarie circa 50 ore di elaborazione, il che è abbastanza evidente considerando che si sono ottimizzate strutture come le seguenti:

Dopo aver effettuato queste operazioni, abbiamo utilizzato le possibilità offerte dal software per non visualizzare le molecole d'acqua (e quindi evitare l'enorme confusione che ne sarebbe derivata) ed abbiamo iniziato ad effettuare il “merging” tra le molecole di ciclodestrine e le molecole di presidi fitosanitari così da iniziare lo studio vero e proprio di simulazione della eventuale formazione di complessi.

Studi Chemometrici in “periodic box” – Verifica della possibilità di complessamento

Tutte le strutture interessate a queste prove sono, ovviamente, quelle ottimizzate in ambiente acquoso; una volta introdotta una molecola di pesticida nel “periodic box” della ciclodestrina prescelta, la molecola di pesticida viene posta in prossimità della molecola di ciclodestrina, e, utilizzando le possibilità del software, vengono misurate alcune distanze interatomiche tra atomi della ciclodestrina ed atomi del pesticida così da poter verificare in modo obiettivo le posizioni reciproche delle molecole, rispetto alla situazione iniziale, e verificare, anche attraverso le variazioni energetiche se la formazione di un eventuale complesso è termodinamicamente possibile.

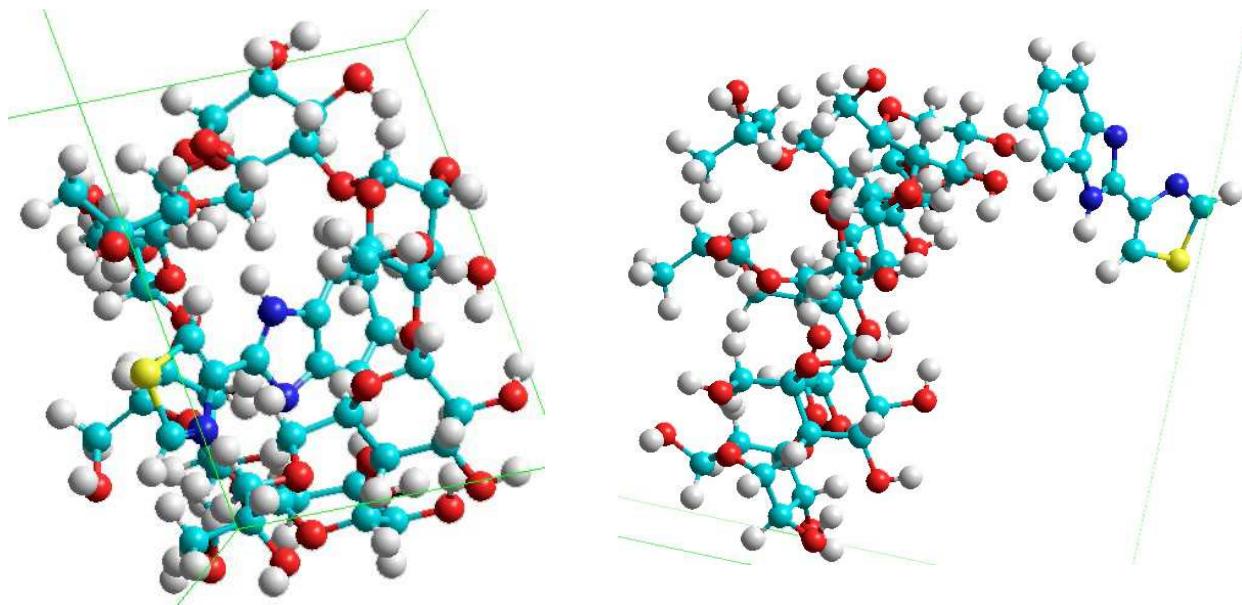
Sistema α-ciclodestrina – tiabendazolo

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo il tiabendazolo, dalla parte dell'anello benzenico del benzimidazolo, dentro la cavità dell'idrossipropil- α -ciclodestrina, entrando dalla parte opposta alle catene idrossipropiliche. La situazione iniziale era la seguente:

Durante l'esecuzione della prova di dinamica molecolare si è assistito all'espulsione della molecola di tiabendazolo dalla cavità della molecola della idrossipropil- α -ciclodestrina; la situazione al termine della prova era la seguente:

Con l'anello benzimidazolico del pesticida fuori dalla cavità.

Si è ripetuta la prova approcciando la molecola del tiabendazolo dalla parte dell'anello contenente lo zolfo, ma anche stavolta il risultato non è cambiato come è possibile vedere dalle due immagini seguenti:



Con la molecola di antifungino completamente espulsa dalla cavità della ciclodestrina.

Anche le prove con l' α -cyclodextrina hanno dato gli stessi risultati, quindi *pensiamo di poter escludere che il tiabendazolo formi complessi con la α -cyclodextrina o con la idrossipropil- α -cyclodestrina.*

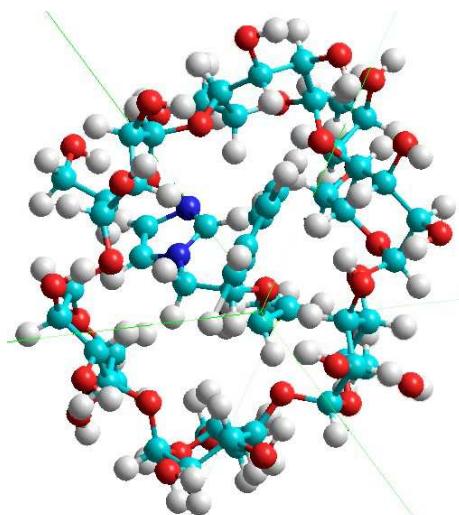
Sistema β -cicloestrina – tiabendazolo

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo il tiabendazolo, dalla parte dell'anello benzenico del benzimidazolo, dentro la cavità dell'idrossipropil- β -cicloestrina, entrando dalla parte opposta alle catene idrossipropiliche. In questo caso la molecola di tiabendazolo non viene espulsa ma rimane all'interno della cavità della idrossipropil- β -cicloestrina; l'energia totale del sistema diminuisce e un grafico del potenziale elettrostatico del sistema sembra essere compatibile con la formazione di un complesso o di un addotto stabile. Di seguito la situazione di partenza:

Anche introducendo il tiabendazolo dalla parte dell'anello contenente lo zolfo la situazione non cambia; la molecola guest resta nella cavità della ciclodestrina e l'energia totale del sistema diminuisce. Di seguito, le situazioni iniziali e finali ed il grafico del potenziale elettrostatico:

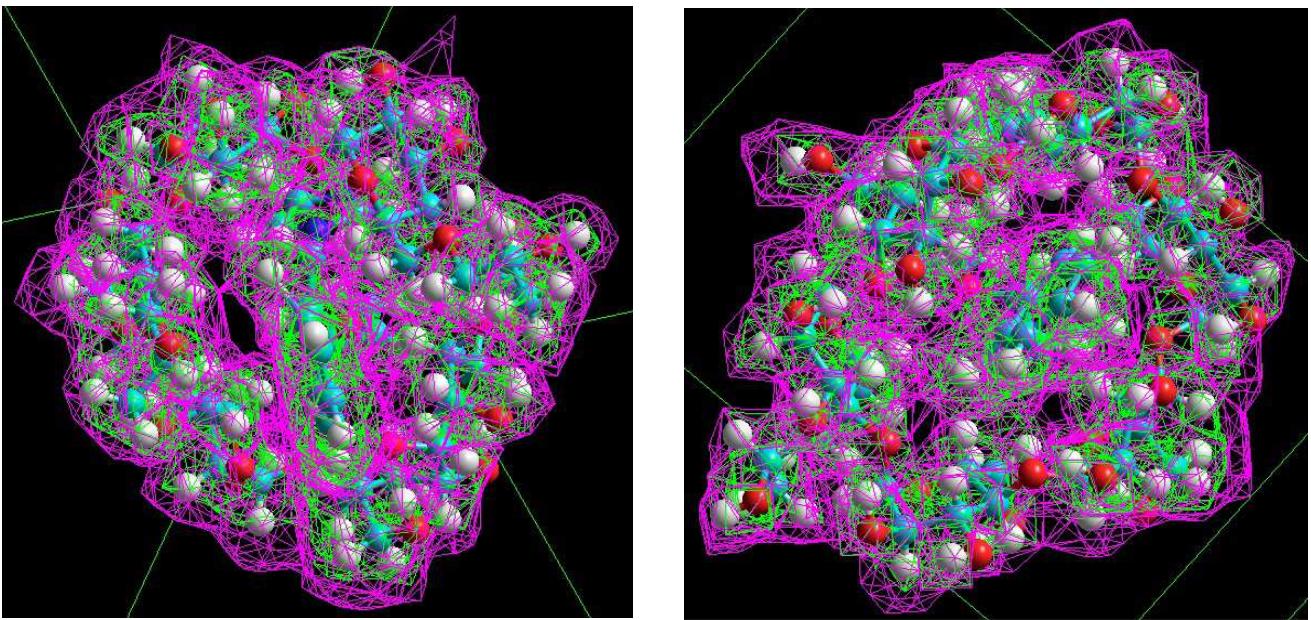
Sistema α -ciclodestrina – imazalyl

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo, nella cavità della idrossipropil- α -ciclodestrina, l'imazalyl , dalla parte del gruppo -O-CH₂CHCH₂ che si trova tra il diclorobenzene e l'anello bendazolico. La molecola di imazalyl dopo la prova di dinamica molecolare non viene espulsa ma rimane all'interno della cavità della idrossipropil- α -ciclodestrina; l'energia totale del sistema diminuisce e un grafico del potenziale elettrostatico del sistema indica chiaramente la formazione di un complesso stabile.



Già da questa immagine si possono notare le forze elettrostatiche che tengono l'imazalyl trattenuto entro la cavità. Dall'interno del software di modellazione molecolare il tutto è decisamente più evidente.

Anche introducendo la molecola di Imazalyl secondo altri versi si ottengono risultati compatibili come si vede dalle due immagini seguenti:



Possiamo, quindi, affermare che è possibile che l'imazalyl formi un complesso o un addotto stabili con la α -cyclodestrina e con l'idrossipropil- α -cyclodestrina.

Sistema β -cyclodestrina – imazalyl

Con questo sistema abbiamo operato in modo analogo a quanto effettuato con l' α -cyclodestrina iniziando l'introduzione dalla parte del gruppo -O-CH₂CHCH₂ che si trova tra il diclorobenzene e l'anello bendazolico. La situazione, in questo caso sembra meno favorevole che con l' α -cyclodestrina, infatti il guadagno energetico è basso;

osservando, però, lo svolgersi della prova di dinamica molecolare si vede che c'è una tendenza a spostarsi verso la cavità della ciclodestrina da parte dell'anello azotato, per cui si decide di provare subito introducendo l'imazalyl da quella parte. La prova dà un buon risultato, con l'imazalyl ben trattenuto dentro la cavità della ciclodestrina e, sembra, anche ben ancorato da forze elettrostatiche.

Properties		
Total Energy	-26.28541946	kcal/mol
Dipole Moment	91.51	D
RMS Gradient	0.08591	kcal/(\AA mol)

*Possiamo, quindi, affermare che è possibile che l'imazalyl formi un complesso o un addotto stabili con la **β -ciclodestrina** e con l'idrossipropil- **β -ciclodestrina**.*

Considerando le dimensioni della cavità non si ritiene necessario verificare l'imazalyl anche con la **γ -ciclodestrina**.

Sistema α -ciclodestrina – fentoato

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo, nella cavità della idrossipropil- α -ciclodestrina, il fentoato dalla parte dell'anello benzenico. Di seguito riportiamo le proprietà del sistema prima e dopo l'ottimizzazione di dinamica molecolare.

Properties		
Total Energy	0.5370300412	kcal/mol
Dipole Moment	12.2	D
RMS Gradient	0.09951	kcal/(\AA mol)

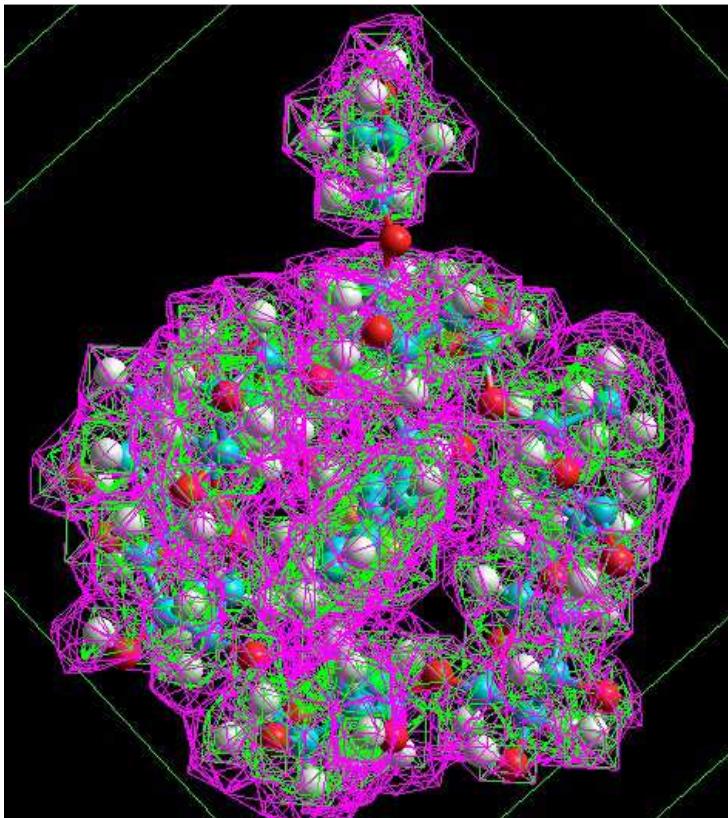
Properties		
Total Energy	-9.832386017	kcal/mol
Dipole Moment	27.13	D
RMS Gradient	0.09456	kcal/(\AA mol)

Come si vede, c'è una qualche stabilizzazione a livello energetico e delle strutture elettrostatiche che fanno ritenere possibile una qualche interazione positiva alla formazione di un addotto – complesso. Abbiamo, quindi, provato ad inserire la molecola di fentoato dalla parte opposta, cioè dalla parte dei due metossili legati al fosforo.

Prima ancora di eseguire la ottimizzazione di dinamica molecolare, già eseguendo l'ottimizzazione geometrica, si nota che il software trova dei minimi energetici spostando verso l'esterno della cavità della idrossipropil- α -ciclodestrina la parte della molecola di fentoato contenente i metossili con il fosforo e

cerca di includere, invece, l'anello benzenico.

Di seguito riportiamo i dati energetici delle due configurazioni, prima e dopo l'ottimizzazione di dinamica molecolare e il grafico dei potenziali elettrostatici che, come si potrà vedere, è molto simile a quello riportato più su in questa stessa pagina.



Possiamo, quindi, affermare che è possibile che il fentoato formi un complesso o un addotto stabili con la α -ciclodestrina e con l'idrossipropil- α -ciclodestrina.

Si ritiene, comunque che le interazioni, in questo caso siano decisamente più deboli rispetto a quanto visto per esempio con l'imazaryl.

Sistema β -ciclodestrina – fentoato

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo, nella cavità della idrossipropil- β -ciclodestrina, il fentoato dalla parte dell'anello benzenico. Di seguito riportiamo le proprietà del sistema prima e dopo l'ottimizzazione di dinamica molecolare.

Anche in questo caso, come già con l' α -ciclodestrina ci sono delle interazioni elettrostatiche che rendono possibile la formazione dell'addotto / complesso; in questo caso, però, la situazione è stericamente più favorevole come denotato anche dai valori energetici.

Dall’immagine a fianco si notano chiaramente i “punti di attacco” eletrostatici.

Abbiamo, quindi, provato ad inserire la molecola di fentoato dalla parte opposta, cioè dalla parte dei due metossili legati al fosforo.

Stavolta, la situazione sembra essere energeticamente abbastanza favorevole; durante il ciclo di dinamica molecolare, la molecola di fentoato tende ad uscire dalla cavità, salvo poi rientrare durante l’ottimizzazione della geometria. Di seguito riportiamo i dati energetici prima e dopo l’ottimizzazione di dinamica molecolare.

*Possiamo, quindi, affermare che sulla base delle simulazioni chemometriche è possibile che il fentoato formi complessi od addotti stabili con la **b**-ciclodestrina e con l’idrossipropil-**b**-ciclodestrina.*

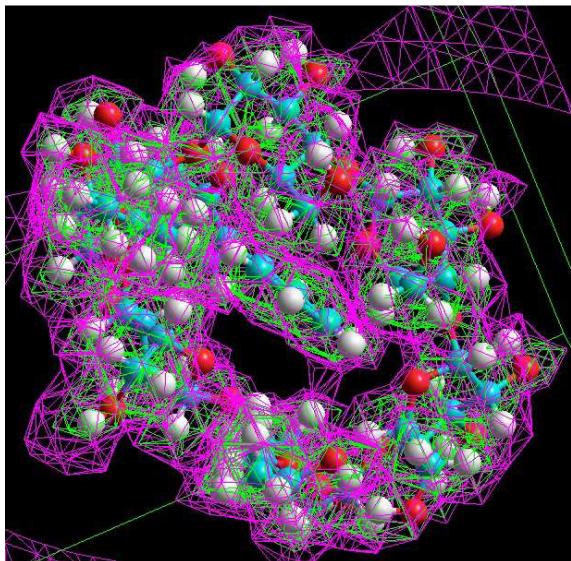
Sistema α -ciclodestrina – ortofenilfenolo

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo, nella cavità della idrossipropil- α -ciclodestrina, l'ortofenilfenolo dalla parte dell'anello benzenico non sostituito; infatti considerando le piccole dimensioni della cavità dell' α -ciclodestrina, per ragioni di ingombro sterico abbiamo preferito approcciare il sistema da quella parte. Lo studio chemometrico restituisce un sistema energeticamente molto stabile e con “ganci elettrostatici” molto evidenti. L'ortofenilfenolo viene bloccato proprio all'ingresso della cavità della idrossipropil- α -ciclodestrina con una piegatura che sicuramente serve a schermare l'ossidrile fenolico.

Qui accanto la situazione iniziale dopo l'ottimizzazione della geometria; seguono i valori energetici iniziali e finali e la rappresentazione del sistema dopo l'ottimizzazione di dinamica molecolare.

Properties		
Total Energy	-57.44715118	kcal/mol
Dipole Moment	26.59	D
RMS Gradient	0.0998	kcal/(\AA mol)

Infine, la rappresentazione dello stato di potenziali elettrostatici con l'evidente legame Van Der Waals che ci porta a concludere che è **possibile che l'ortofenilfenolo formi complessi stabili con l' α -ciclodestrina e l'idrossipropil- α -ciclodestrina**.



Sistema β -ciclodestrina – ortofenilfenolo

Anche con questo sistema abbiamo iniziato introducendo l'ortofenilfenolo dalla parte dell'anello benzenico non sostituito. Lo studio chemometrico restituisce un sistema energeticamente molto stabile e con “ganci elettrostatici” molto evidenti. Di seguito i dati energetici prima e dopo l’ottimizzazione di dinamica molecolare e l’immagine dei potenziali elettrostatici.

Anche in questo caso è possibile concludere che *è verosimile che l'ortofenilfenolo formi complessi stabili con la β -ciclodestrina e l'idrossipropil- β -ciclodestrina.*

Sistema b-ciclodestrina – methidation

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo, nella cavità della idrossipropil- β -ciclodestrina, il methidation dalla parte dell'anello azotato e lasciando fuori il gruppo contenente il gruppo fosfoditionico. Lo studio chemometrico restituisce un sistema energeticamente piuttosto stabile ma senza “ganci elettrostatici” evidenti.

Di seguito le proprietà energetiche prima e dopo ottimizzazione di dinamica molecolare, la configurazione finale e l'immagine delle proprietà elettrostatiche:

In un secondo tentativo, invece, introduciamo il methidation dalla parte del gruppo fosfoditionico.

In questo caso, dopo il controllo di dinamica molecolare si nota l'uscita della molecola dalla cavità della ciclodestrina con il contemporaneo “streching” di alcuni dei legami della ciclodestrina stessa come si può notare dalla immagine seguente:

Sulla base di questi risultati *non è immediato pronosticare la possibilità di formazione di un complesso tra il methidation e la idrossipropil- b-cyclodestrina.*

Sistema g-ciclodestrina – methidation

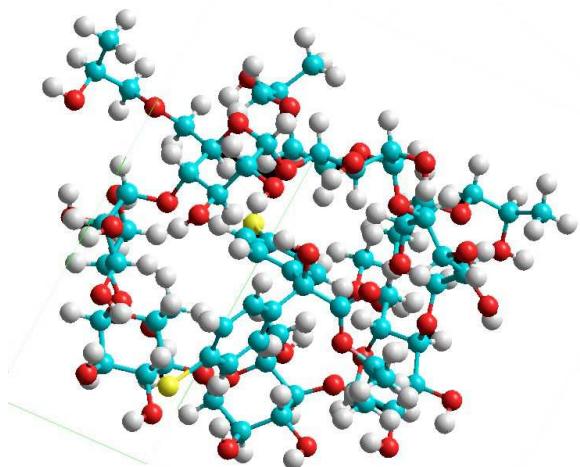
Questo sistema è assolutamente instabile indipendentemente dalla modalità di introduzione del methidation dentro la ciclodestrina; in ogni condizione e configurazione, indipendentemente da vari tipi di ottimizzazione si osservano sempre o l'espulsione del methidation dalla ciclodestrina oppure il verificarsi di tensioni “impossibili” di alcuni legami della ciclodestrina.

Su questa base riteniamo estremamente improbabile che si possa formare alcun complesso od addotto tra il methidation e la g-ciclodestrina o la idrossipropil-g-ciclodestrina.

Sistema β -ciclodestrina – bromopropilato

Con questo sistema abbiamo iniziato introducendo, nella cavità della idrossipropil- β -ciclodestrina, il bromopropilato dalla parte di uno degli anelli bromobenzenici. Lo studio chemometrico restituisce un sistema energeticamente piuttosto stabile con il bromopropilato che si stabilizza all'ingresso della cavità delle ciclodestrina e con un unico “gancio elettrostatico” evidente, tra la ciclodestrina ed il gruppo carbossilico del bromopropilato che rimane all'esterno della cavità.

Di seguito le proprietà energetiche prima e dopo ottimizzazione di dinamica molecolare, la configurazione finale e l'immagine delle proprietà elettrostatiche:



Abbiamo, quindi, provato l'introduzione dalla parte del gruppo estereo; anche in questo caso sembra che la formazione del complesso – addotto sia energeticamente favorita con il bromopropilato che resta all'imboccatura della cavità ed anche stavolta si vede un unico “gancio elettrostatico” tra la ciclodestrina e, in questo caso, un anello bromobenzenico.

Sulla base di tutti questi dati chemometrici,
possiamo affermare che *è possibile che il
bromopropilato formi complessi od addotti
con la **b**-ciclodestrina e con l'idrossipropil-
ciclodestrina.*

Vista la situazione non si ritiene opportuno
con la **g**-ciclodestrina.

*stabili
b-*

provare

Sistema $\text{b-ciclodestrina} - \text{chlorpyrifos}$

Con questo sistema iniziamo introducendo il chlorpyrifos nella cavità dell'idrossipropil- b-ciclodestrina dalla parte dell'anello piridinico; di seguito riportiamo i dati energetici e le immagini delle due configurazioni, prima e dopo l'ottimizzazione di dinamica molecolare; si deve notare come, stavolta, energeticamente i valori non sono particolarmente entusiasmanti ma sono, invece, visibili ben quattro “ganci elettrostatici”. Ciò potrebbe voler dire che la costante di formazione del complesso è bassa e che questo, una volta formatosi è piuttosto stabile.

In un secondo tentativo abbiamo introdotto il chlorpyrifos dalla parte del gruppo dietil-fosfotionico.

Anche in questo caso il risultato delle prove chemometriche è poco significativo in quanto le energie non sono particolarmente buone e durante l'ottimizzazione di dinamica molecolare si nota l'uscita della molecola del chlorpyrifos dalla cavità della ciclodestrina; tuttavia, la molecola si ferma all'imbocco e si notano due o tre

“ganci elettrostatici” tra la ciclodestrina e i gruppi etilici del dietilfosfotionato.

Sistema g-ciclodestrina – chlorpyrifos

Con questo sistema iniziamo introducendo il chlorpyrifos nella cavità dell'idrossipropil-g-cyclodestrina dalla parte dell'anello piridinico; di seguito riportiamo i dati energetici e le immagini:

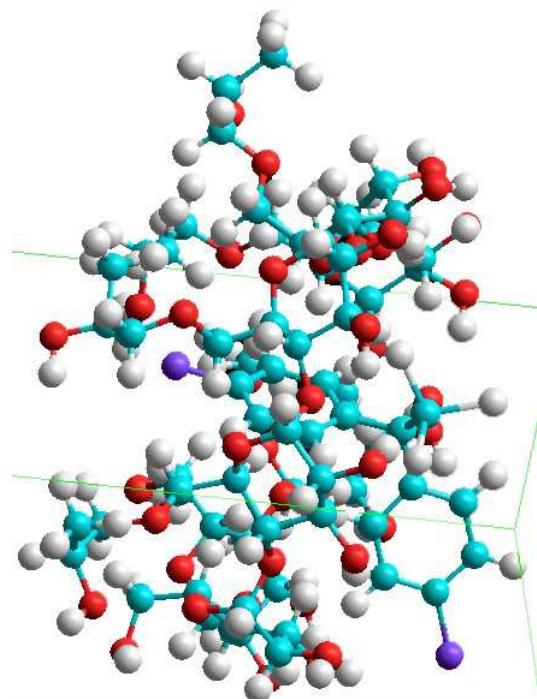
Come si può notare, in questo caso il sistema sembra più stabile rispetto alla configurazione con la b-cyclodestrina probabilmente a causa del minore ingombro sterico determinato dalla maggiore dimensione della cavità della g-cyclodestrina.

Nell'immagini dei potenziali elettrostatici si vede distintamente un "gancio" che interessa uno degli atomi di cloro dell'anello tetracloropiridinico del chlorpyrifos ed un idrogeno di un'unità di glucosio della cyclodestrina.

In conclusione, il chlorpyrifos forma sicuramente sistemi più stabili con la α -ciclodestrina piuttosto che con la β -ciclodestrina ma i valori energetici non sono particolarmente favorevoli per cui concludiamo che sulla base delle considerazioni chemometriche effettuate, *si ritiene possibile, ma poco probabile che il chlorpyrifos formi addotti o complessi stabili con la α -ciclodestrina.*

Sistema β -ciclodestrina – dicofol

Con questo sistema introduciamo il dicofol nella cavità dell'idrossipropil- β -ciclodestrina dalla parte di uno dei due gruppi clorofenilici; il sistema sembra energeticamente stabile e di seguito riportiamo i dati e le immagini relative:



Nell'immagine dei potenziali eletrostatici non si ravvisano “ganci” ma il sistema sembra molto stabile, per cui *si ritiene possibile che il dicofol formi complessi stabili con la β -ciclodestrina e con l'idrossipropil- β -ciclodestrina.*

Vista la situazione non si ritiene opportuno provare con la γ -ciclodestrina.

Sistema b-ciclodestrina – fenson

Con questo sistema introduciamo dapprima il fenson nella cavità dell'idrossipropil-**b**-ciclodestrina dalla parte dell'anello clorobenzenico; il sistema sembra energeticamente stabile ma dopo il controllo di dinamica molecolare si nota come la stabilizzazione del sistema venga ottenuta a

scapito di “innaturali” “stretching” di alcuni dei legami della ciclodestrina. Ciò anche dopo aver variato, diverse volte, la posizione del fenson all'interno della cavità; in ogni caso la routine di dinamica molecolare continua sempre a stabilizzare il sistema stirando alcuni dei legami della ciclodestrina.

Su questa base riteniamo che l'unica conclusione possibile sia quella di scartare “a priori” la possibilità che il fenson possa essere complessato dalla **b**-ciclodestrina o dal suoi idrossipropilderivati

se si presenta dalla parte dell'anello clorobenzenico.

Anche provando ad introdurre il fenson dalla parte dell'anello benzenico non sostituito la situazione non cambia per cui si ritiene di poter concludere che *si ritiene impossibile che il fenson formi complessi stabili con la **b**-ciclodestrina e con l'idrossipropil-**b**-ciclodestrina.*

Vista la situazione si decide di verificare la situazione usando la **g**-ciclodestrina.

Sistema g-ciclodestrina – fenson

Anche con questo sistema introduciamo dapprima il fenson nella cavità dell'idrossipropil-g-ciclodestrina dalla parte dell'anello clorobzenenico; anche stavolta, ed è sufficiente la routine di ottimizzazione della geometria, l'abbassamento dell'energia del sistema avviene a spese delle lunghezze di alcuni legami dell'idrossipropil-g-ciclodestrina come si può vedere nell'immagine seguente:

Anche introducendo il fenson dalla parte dell'anello benzenico non sostituito la situazione non cambia :

Per cui non possiamo far altro che concludere

che si ritiene impossibile che il fenson formi complessi stabili con la g-ciclodestrina e con l'idrossipropil-g-ciclodestrina.

Sistema b-ciclodestrina – parathion metile

Con questo sistema introduciamo dapprima il parathion metile nella cavità dell'idrossipropil-b-ciclodestrina dalla parte del gruppo nitrofenilico; il sistema sembra energeticamente stabile e di seguito riportiamo i dati e le immagini relative:

Nell'immagine dei potenziali elettrostatici si ravvisano un paio di “ganci elettrostatici” ed il sistema sembra molto stabile, per cui *si ritiene possibile che il parathion metile formi complessi stabili con la b-ciclodestrina e con l'idrossipropil-b-ciclodestrina.*

Vista la situazione si decide di verificare la situazione usando la g-ciclodestrina.

Sistema g-ciclodestrina – parathion metile

Con questo sistema si verifica una situazione molto simile a quella che si è verificata con il fenson, ogni tentativo di inserire il parathion metile comporta sempre anomalie a carico di alcuni dei legami della ciclodestrina, per cui si ritiene di poter affermare che **è impossibile che il parathion metile formi complessi stabili con la g-ciclodestrina e con l'idrossipropil-g-ciclodestrina.**

Conclusioni

I risultati ottenuti con le simulazioni al computer hanno dato i risultati riepilogati nella tabella seguente:

presidio fitosanitario	a-ciclodestrina	b-ciclodestrina	g-ciclodestrina
tiabendazolo	non possibile	possibile	=====
imazalyl	possibile	possibile	=====
fentoato	possibile	possibile	=====
orto-fenilfenolo	possibile	possibile	=====
methidation	=====	non verosimile	non possibile
bromopropilato	=====	possibile	=====
chlorpyrifos	=====	non verosimile	non verosimile
dicofol	=====	possibile	=====
fenson	=====	non possibile	non possibile
parathion metile	=====	possibile	non possibile

Desideriamo, infine, specificare ciò che riteniamo essere un principio basilare importante, e cioè che la formazione dei complessi e/o addotti dipende, innanzitutto, dalla solubilità in acqua dei vari presidi fitosanitari; in altre parole, se prima il principio fitosanitario non si scioglie in acqua non è possibile che venga in contatto con le ciclodestrine e formi il complesso. Quindi, sulla base delle solubilità dei pesticidi selezionati si ritiene, comunque, più probabile che si verifichino situazioni positive soprattutto con tiabendazolo, imazalyl, ortofenilfenolo e meno probabilmente con fentoato e parathion metile.