



Paola Galletti, Danilo Malferrari,
Chiara Samorì, Emilio Tagliavini
Università di Bologna
CIRSA, Centro Interdipartimentale
per le Scienze Ambientali
e CIRI Energia e Ambiente
Unità Operativa REACH
Ravenna
emilio.tagliavini@unibo.it

LIQUIDI IONICI: VALUTAZIONE DELL'ECOTOSSICITÀ E DEGLI EFFETTI BIOLOGICI

Gli aspetti (eco)tossicologici dei liquidi ionici, ed in generale la loro modalità di interazione con gli esseri viventi, sono stati valutati su vari tipi di organismi bersaglio acquatici, tra cui invertebrati, alghe, batteri e su sistemi modello cellulari ed artificiali. La tossicità è modulata principalmente dal carattere anfifilico delle sostanze, che determina la modalità di interazione con le membrane cellulari.

I liquidi ionici sono i solventi "green" più investigati degli ultimi decenni, ma al tempo stesso rappresentano uno dei campi di ricerca più dibattuti della chimica sostenibile. L'interesse per tali sostanze come alternativa ai tradizionali solventi organici deriva da alcune loro proprietà benefiche riguardo ai possibili impatti sulla salute e sull'ambiente: tensione di vapore trascurabile che ne limita il rilascio in atmosfera, non infiammabilità ed elevata stabilità chimica e termica. A questo si aggiungono l'elevata conducibilità ionica, l'ampio intervallo di potenziali elettrochimici e le peculiari proprietà solvatanti che ne hanno reso possibile lo sfruttamento sia come solventi che come materiali in una vasta gamma di applicazioni (Fig. 1) [1].

Nel 2002 la Basf ha realizzato il processo Basil (Biphasic Acid Scavenging utilizing Ionic Liquids) che sfrutta le proprietà dei liquidi ionici su scala industriale. Durante uno step per la sintesi di alcossifenilfosfine, materie prime nella produzione delle lucirine, foto-iniziatori nella protezione degli inchiostri dall'esposizione alla luce ultravioletta, si libera acido cloridrico che viene neutralizzato con metilimidazolo formando appunto un liquido ionico, il metilimidazolinio cloruro [2].

Un'altra interessante applicazione è stata sviluppata da Iolitec per l'industria elettronica nel campo della pulizia di superfici; tale trattamento

può essere particolarmente difficoltoso poiché devono essere eliminate delle particelle cariche, spesso di natura metallica. I liquidi ionici impiegati nel processo formano una sottile guaina adesiva alle superfici da pulire che permette la rimozione delle particelle senza la formazione di incrostazioni.

Negli ultimi anni la ricerca ha aperto la strada all'utilizzo dei liquidi ionici nel trattamento e dissoluzione della cellulosa, il più abbondante polimero organico di origine naturale. La dissoluzione della cellulosa è possibile in pochissimi solventi organici, come ad esempio l'NMNO (N-metilmorfolina N-ossido), ed industrialmente viene lavorata e recuperata in processi che impiegano solventi acidi e basici in grandi quantità, come ad esempio nel processo Lyocell® o nel trattamento di rimozione degli inchiostri (*deinking*). Alcuni liquidi ionici, come sali di imidazolinio e piridinio con cloruri e acetati come anioni, sono invece in grado di solubilizzare efficacemente la polpa di cellulosa che può poi essere riottenuta per diluizione con acqua [3]. I liquidi ionici sono stati inoltre utilizzati nella fabbricazione di specchi liquidi per telescopi, permettendo di eliminare l'utilizzo del mercurio [4]; altre promettenti applicazioni riguardano il campo del fotovoltaico di terza generazione, dove vengono studiati ed utilizzati come elettroliti [5].

Infine, recentemente, nuove tipologie di liquidi ionici “reversibili” chiamati “switchable solvents” hanno trovato interessanti applicazioni; questi solventi, in genere costituiti da combinazioni di ammine con alcoli o acqua, possono essere convertiti da una forma apolare, idonea per estrazioni di matrici lipofile, come oli vegetali, in una forma ionica polare costituita da un carbonato di ammonio semplicemente aggiungendo e rimuovendo CO_2 . In tal modo i composti lipofili possono essere recuperati ed il solvente riciclato [6].

In vista di applicazioni sempre più vaste e su larga scala, la valutazione del rischio, la biodegradabilità ed in generale il destino ambientale dei liquidi ionici sono parametri fondamentali che non possono essere trascurati. La Fig. 2 mostra un aumento degli studi sulla tossicità dei liqui-

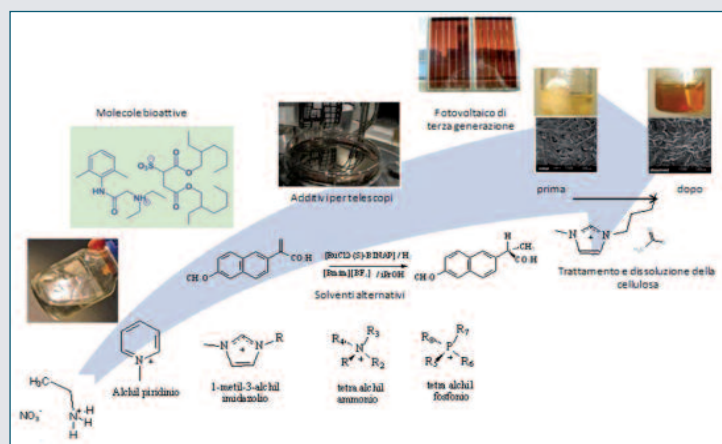


Fig. 1 - Esempi di strutture di liquidi ionici comuni ed alcune applicazioni

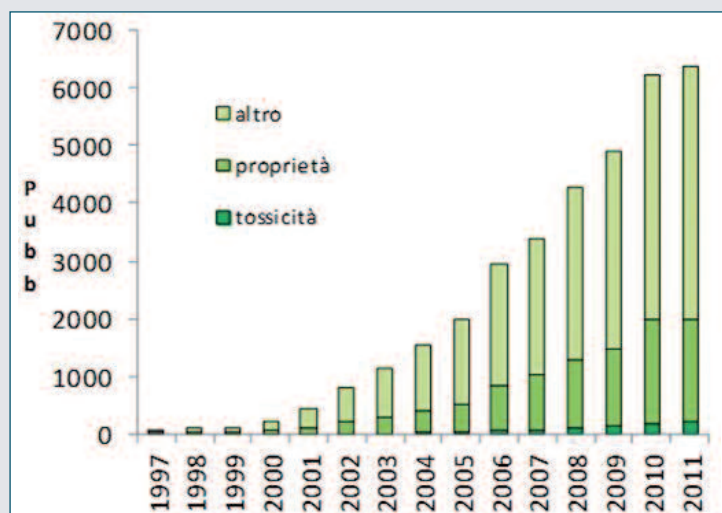


Fig. 2 - Pubblicazioni riguardanti i liquidi ionici degli ultimi 15 anni ottenute da SciFinder database

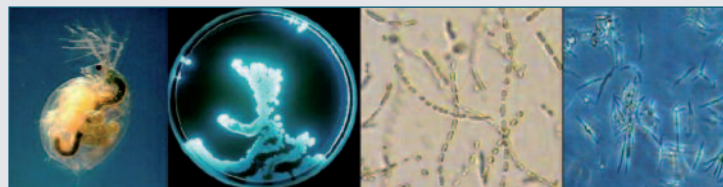


Fig. 3 - Immagini in microscopia degli organismi *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Skeletonema marino* e *Phaeodactylum tricornutum*

di ionici che non tiene però il passo con l'enorme aumento dell'interesse nei loro confronti. Nonostante alcune caratteristiche “green” sopra citate, molti liquidi ionici si sono dimostrati (eco)-problematici, come evidenziato dai numerosi studi (eco)-tossicologici degli ultimi anni [7-10]. I liquidi ionici hanno tuttavia il vantaggio rispetto ai solventi molecolari di essere “modulabili” modificando la struttura chimica di uno o entrambi i membri della coppia di ioni in modo da regolare sia le proprietà fisico-chimiche che il comportamento (eco)-tossicologico. L'impatto ambientale dei liquidi ionici e la loro effettiva sostenibilità sono stati analizzati in una serie di studi interdisciplinari [11-16], che hanno sottolineato l'importanza di valutare un numero rilevante di scenari di rischio in considerazione del crescente interesse industriale e la necessità di una piena comprensione degli effetti biologici a diversi livelli di organizzazione. L'attività biologica di liquidi ionici è stata intensamente studiata e numerosi test di tossicità sono stati proposti per rilevare gli effetti tossici sia negli ecosistemi terrestri sia in quelli acquatici ed anche per valutare i danni a livello cellulare (vitalità) e sub-cellulare (inibizione dell'attività di specifici enzimi come l'acetilcolinesterasi). Pur non essendo conclusivi, i risultati di questi studi indicano che, in genere, l'effetto dei liquidi ionici sui sistemi biologici cresce all'aumentare della lipofilità, in particolare della lipofilità del catione. Vedremo nel seguito come anche i nostri studi sembrano confermare questo andamento.

Tossicità acquatica

Molti liquidi ionici sono caratterizzati da un'elevata solubilità in acqua e, dato il crescente interesse industriale verso questa classe di composti, deve essere preso in considerazione un numero rilevante di scenari di rischio, compresi quelli in cui potrebbero essere rilasciati in effluenti industriali e quindi raggiungere molti ecosistemi acquatici. Nel corso degli ultimi anni differenti organismi, come crostacei, microalghe, pesci e batteri, sono stati testati come specie indicatrici per valutare gli effetti tossici dei liquidi ionici sia in ecosistemi d'acqua dolce che marini (Fig. 3). *Daphnia magna* è un crostaceo d'acqua dolce particolarmente utile allo scopo di valutare sia la tossicità acuta che cronica di vari inquinanti. I risultati sono riportati in Tab. 1 e indicano che la tossicità è di regola associata ad una maggiore lipofilità del catione: ad esempio, nei sali di alchil metilimidazolinio la presenza di una catena laterale di 12 atomi di carbonio (C_{12}MIM) aumenta la tossicità di 3 ordini di grandezza rispetto ad una catena con 4 atomi di carbonio (C_4MIM) [11]. Anche la struttura generale del catione ha un ruolo evidente: cationi eterociclici aromatici come gli imidazoli o i piridini, sono più tossici rispetto ai cationi alifatici ciclici, come i morfolini e ai sali di solfonio, praticamente innocui. I sali di fosfonio e di ammonio quaternario contenenti lunghe catene, simili ai tensioattivi cationici, sono entrambi altamente tossici. È invece risultata scarsa l'influenza dell'anione sulla tossicità di una serie di sali di imidazolinio. Se la valutazione della tossicità cronica viene fatta attraverso studi multigenerazionali, si rileva che i liquidi ionici sono in grado di esercitare un effetto tossico sullo sviluppo sia dei singoli animali che della popolazione, almeno a concentrazioni elevate [17]. Nonostante il gran numero di dati raccolti sulla tossicità sia acuta che cronica, il meccanismo di

Tab. 1 - Effetti tossicologici di vari liquidi ionici su *Daphnia magna*

Liquido ionico	EC ₅₀ mg/L	Rif.	Liquido ionico	EC ₅₀ mg/L	Rif.
C ₄ MIMCl	15-6	[17, 11]	C ₄ MPyBr	13	[19]
C ₄ MIMBr	8-15	[17, 18]	C ₄ MPyNTf ₂	37	[14]
C ₄ MIMBF ₄	11	[17]	C ₆ MPyBr	1	[19]
C ₄ MIMPF ₆	20-24	[17, 11]	C ₆ MPyBr	0,7	[19]
C ₄ MIMNTf ₂	19	[14]	TBABr	9	[19]
C ₆ MIMBr	3	[18]	ECOENG500	1	[11]
C ₈ MIMBr	0.9	[18]	AMMOENG130	0,5	[14]
C ₁₀ MIMBr	0.1	[18]	AMMOENG100	2	[14]
C ₁₂ MIMBr	0,05	[18]	CYPHOS169	11	[11]
C ₁₂ MIMCl	0,004	[11]	CY101	0,07	[11]
C ₁₆ MIMCl	0,003	[11]	TBPBr	3	[19]
C ₁₈ MIMCl	0,001	[11]	EMMorBr	>100	[14]
C ₄ PyCl	20	[11]	EBMorBr	>100	[14]
C ₄ PyNTf ₂	2	[14]	ETHTBr	>100	[14]
C ₆ PyBr	3	[19]	Et ₃ SBr	>100	[14]

CnMIM = 1-alcil-3-metilimidazolio; CnPy = N-alcilpiridinio; CnMPy = 1-alcil-3-metil piridinio; TBA=tetrabutilammonio; ECOENG500 = PEG-5 cocconio metossolato; AMMOENG130 = disteardimetilamminocloruro; AMMOENG100 = coccochil pentaetossi metil ammonio metilsolfato; CYPHOS169 = tributilettilfosfonio dietilfosfato; CYPHOS101 = triesiltetradecilfosfonio cloruro; TBP = tetrabutilfosfonio; EMMor = etilmetilmorfolinio; EBMor = etilbutilmorfolinio; ETHT = etiltetraidrotiofene

azione dei liquidi ionici verso *Daphnia magna* è ancora sconosciuto; tra le ipotesi formulate ci sono l'inibizione enzimatica, la perturbazione della permeabilità di membrana e danni strutturali al DNA, ma ad oggi necessitano ancora di essere confermate.

Così come *Daphnia magna* rappresenta un buon modello per valutare la tossicità sui crostacei, *Vibrio fischeri* è il modello standard per i procarioti. *Vibrio fischeri* è un batterio marino Gram-negativo, globalmente distribuito e caratterizzato da proprietà bioluminescenti indicative dello stato metabolico delle cellule. Quando le cellule batteriche entrano in contatto con composti tossici, la bioluminescenza si riduce e tale riduzione può essere utilizzata come *end point* in test di inibizione acuta; finora sono stati sviluppati diversi test di inibizione della bioluminescenza, la maggior parte di essi progettati per l'analisi di campioni acquosi, come il Microtox®. Essendo i test molto rapidi, versatili e sensibili, il database degli effetti acuti di vari composti chimici verso *Vibrio fischeri* è molto ampio e anche l'attività biologica dei liquidi ionici verso questa specie è ben documentata in letteratura. La maggior parte dei dati (Tab. 2) riguarda la tossicità acuta dei sali di imidazolinio ma anche gli effetti tossici delle altre specie cationiche, come piridinio, morfolinio, piperidinio, pirrolidinio, ammonio e fosfonio sono stati descritti. Anche nel caso di *Vibrio fischeri* si evidenzia chiaramente la correlazione maggiore lipofilità/aumento di tossicità, sia per i cationi imidazolinio che piridinio. Così C₁₀MIM è 10.000 volte più tossico di C₂MIM [13]. Tuttavia, per composti molto lipofili, si ha un'inversione della tendenza e C₁₆MIM o C₁₈MIM risultano meno tossici dei congeneri più corti. Anche per *Vibrio fischeri* i sali di imidazolinio e piridinio risultano più tossici di quasi un ordine di grandezza rispetto agli analoghi di morfolinio, pirrolidinio e piperidinio; i sali di fosfonio sono in generale più tossici di quelli di ammonio. L'effetto dell'anione risulta qui rilevabile: a parità di catione, la bis(trifluoro-

metilsulfonil)immide (NTf₂) e l'ottilsolfato (OctSO₃) sono gli anioni più tossici, con valori di EC₅₀ (EC₅₀: effective concentration, la concentrazione che permette di ottenere il 50% dell'effetto massimo) inferiori di un ordine di grandezza rispetto ad altri tipi di anioni [12]. L'ottilsolfato in particolare risulta essere il più tossico, probabilmente a causa della sua più elevata lipofilità rispetto ad altre specie anioniche.

Le alghe sono organismi molto importanti per una valutazione eco-tossicologica negli ecosistemi acquatici poiché svolgono il ruolo di produttori primari e forniscono energia per sostenere livelli trofici superiori (Tab. 3). Gli studi compiuti su alghe verdi d'acqua dolce, diatomee e cianobatteri hanno rivelato che la tossicità dei liquidi ionici è strettamente correlata alla struttura delle pareti cellulari algali. Le diatomee, in particolare, mostrano gruppi funzionali carichi negativamente sulla superficie cellulare che le rendono efficaci bio-assorbenti per sostanze cationiche, quali metalli pesanti e liquidi ionici. Di conseguenza, le diatomee hanno una sensibilità maggiore delle alghe verdi e, tra queste ultime, quelle con parete cellulare di cellulosa (come il genere *Scenedesmus*) sono meno resistenti rispetto a quelle con una parete cellulare di glicoproteine (come il genere *Chlamydomonas*). Oltre alla composizione chimica della parete cellulare, anche altri parametri, come la salinità, risultano essere fattori cruciali, in quanto un'elevata forza ionica potrebbe ridurre la permeabilità dei cationi dei liquidi ionici attraverso le pareti cellulari.

Sintesi ed eco-tossicità di liquidi ionici polietossilati

La relazione lipofilità-tossicità evidenziata finora rappresenta anche una linea guida per la progettazione di liquidi ionici più "green" rispetto a quelli di prima generazione. Ad esempio il nostro gruppo di ricerca di Green

Tab. 2 - Effetti tossicologici di vari liquidi ionici sul batterio *Vibrio fischeri*

Liquido ionico	logEC ₅₀ mM	Rif.	Liquido ionico	logEC ₅₀ mM	Rif.
C ₄ MIMCl	4,33	[13]	C ₁₄ MIMCl	-0,15	[13]
C ₆ MIMBr	4,01-3,07	[20, 21]	C ₁₆ MIMCl	0,23	[13]
C ₄ MIMBCl	3,34-3,71	[22, 20]	C ₁₈ MIMCl	1,45	[13]
C ₄ MIMPF ₆	3,07	[22]	C ₄ PyCl	3,18-3,41	[13, 20]
C ₄ MIMBF ₄	3,55-3,12	[21, 23]	C ₄ PyBr	3,4	[20]
C ₄ MIMN(CN) ₂	3,67-3,13	[20, 23]	C ₄ PyN(CN) ₂	3,31	[20]
C ₄ MIMNTf ₂	3,39-2,48	[19, 12]	C ₄ MPyBr	2,75	[20]
C ₄ MIM OctSO ₃	1,85	[12]	C ₄ MPyN(CN) ₂	2,66	[20]
C ₆ MIMBr	2,06	[20]	C ₆ MPyBr	2,07	[20]
C ₆ MIMCl	2,91-2,18	[13, 24]	C ₆ MPyBr	0,79	[20]
C ₆ MIMPF ₆	2,11	[24]	C ₄ MMorBr	>4,3	[13]
C ₆ MIMBF ₄	3,18	[21]	C ₄ MMorNTf ₂	2,49	[13]
C ₈ MIMBr	0,63	[20]	C ₄ MPyrCl	>4,3	[13]
C ₈ MIMCl	1,19-0,94	[22, 24]	C ₄ MPyrNTf ₂	2,54	[13]
C ₈ MIMPF ₆	0,7	[24]	TMABr	>5	[19]
C ₈ MIMBF ₄	1,41	[21]	TEABr	>5	[19]
C ₁₀ MIMCl	-0,23	[13]	TBABr	3,27	[19]
C ₁₀ MIMBF ₄	-0,18	[21]	TBPBr	2,71	[19]

CnMIM = 1-alcil-3-metilimidazolio; CnPy = N-alcilpiridinio; CnMPy = 1-alcil-3-metilpiridinio; TMA = tetrametilammonio; TEA = tetraetilammonio; TBA = tetrabutilammonio; TBP = tetrabutilfosfonio

Tab. 3 - Effetti tossicologici di vari liquidi ionici su diverse specie algali [25-32]

Liquido ionico		EC ₅₀ (μM, 48 h)		Liquido ionico		EC ₅₀ (μM, 24 h)	
<i>S. capricornutum</i>				<i>Scenedesmus sp</i>			
C ₃ MIMBr	2884	C ₄ PyCl	367	C ₂ MIMX	603	C ₁₀ MIMX	0,0003
C ₄ MIMBr	2884	C ₄ PyBr	2884	C ₄ MIMBF ₄	130	C ₁₄ MIMX	0,003
C ₄ MIMPF ₆	158	C ₄ PyrBr	4677	C ₄ MIMCl	140	C ₁₈ MIMX	>0,01
C ₄ MIMCl	220	TBA Br	933	C ₄ MIMOctSO ₃	60	C ₁₈ MIMX	>0,01
C ₆ MIMBr	371	ECOENG500	0,07	C ₄ MIMNTf ₂	50	C ₁₈ MIM BF ₄	0,005
C ₈ MIMBr	45	TBPBr	79	C ₄ MIMX	178	C ₄ PyX	389
C ₁₂ MIMCl	0,004	CY169	16	C ₆ MIMX	1	C ₄ MPyrX	2344
C ₁₆ MIMCl	0,01	CY101	0,08	C ₈ MIMX	0,002	C ₄ MMorX	>1000
C ₁₈ MIMCl	0,03						
Liquido ionico		EC ₅₀ (μM, 72 h)					
		<i>S. marinoi</i>	<i>C. meneghiniana</i>	<i>B. paxillifer</i>	<i>G. amphibium</i>	<i>C. vulgaris</i>	
C ₂ MIMCl	112	59	34	31	60331		
C ₄ MIMCl	3	7	6	4	1026		
C ₆ MIMCl	1	2	2	0,9	64		
C ₈ MIMCl	0,4	0,7	1	0,1	15		
C ₁₀ MIMCl	0,08	0,3	0,9	0,02	4		
C ₄ MPyCl	-	-	-	-	2110		

CnMIM = 1-alcil-3-metilimidazolio; C4MPy = 1-butil-3-metilpiridinio

Chemistry ha studiato come l'introduzione di catene laterali ossigenate in cationi metilimidazolio (MOEMIM, e omologhi superiori) di liquidi ionici sia correlata ad una generale diminuzione degli effetti biologici a vari livelli di organizzazione cellulare (Tab. 4).

Questo tipo di liquidi ionici rappresenta una classe di solventi molto interessante: hanno buone proprietà solventi per carboidrati e cellulosa [33-34], sono ottimi mezzi di reazione per processi biocatalitici e di catalisi asimmetrica [35-36] e possono sciogliere CO₂ in elevate concentrazioni [37]. L'aspetto più saliente, in questo contesto, è la ridotta tossicità intrinseca che questi cationi polietossilati mostrano, a confronto con i più comuni alchil metilimidazolio. Esperimenti di misura della tossicità acuta da noi effettuati su *Daphnia magna* e microalghe marine (una diatomea comune, *Skeletonema marinoi* e una diatomea particolare, *Phaeodactylum tricornutum*, caratterizzata da una parete cellulare organica e non silicea) indicano che MOEMIM risulta meno tossico di un ordine di grandezza rispetto a C₄MIM, indipendentemente dall'anione. Un'ulteriore introduzione di unità etossilate (M(OE)₂MIM, M(OE)₃MIM, M(OE)₄MIM) tuttavia non contribuisce a diminuire ulteriormente la tossicità, che resta più o meno simile a quella di MOEMIM. Per il batterio *Vibrio fischeri*, MOEMIM, contenente un solo ossigeno nella catena laterale, è il catione meno tossico della serie. In questo caso, però, il polietossilato M(OE)₄MIM mostra un'elevata tossicità, superiore a quella di C₄MIM.

Effetti dei liquidi ionici su sistemi cellulari

La tossicità di una sostanza verso le strutture cellulari si può spiegare in quattro modi principali:

- interazioni aspecifiche con le strutture lipidiche delle membrane;
- interazioni specifiche con costituenti cellulari proteici, come recettori o proteine strutturali;

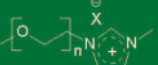
c) reattività a livello molecolare con enzimi;

d) danno specifico agli acidi nucleici.

In questa ottica si rende opportuno l'utilizzo di gruppi di test che impiegano indicatori di funzionalità sia a livello cellulare che sub-cellulare. L'effetto di un ampio numero di liquidi ionici sulla vitalità cellulare è stato investigato impiegando differenti linee cellulari tra cui cellule epiteliali umane di tipo HeLa, cellule HT-29 e Caco-2 [18, 39-42] cellule promielotiche e IPC-81, glioma cells C6 [21, 43-44]. Questi studi hanno rilevato che sia la natura del catione che quella dell'anione possono contribuire alla riduzione della vitalità cellulare. Tuttavia, la lipofilicità del catione non sembra essere il principale elemento determinante della tossicità se la catena alchilica laterale del catione non supera i sei atomi di carbonio; catene più lunghe però portano ad un deciso aumento della lipofilicità del catione ed a un conseguente aumento nella tossicità (Tab. 5).

Il nostro ed altri gruppi di ricerca [40] hanno esteso le indagini al confronto tra liquidi ionici con catene polietossilate e quelli con catene puramente alchiliche impiegando vari test che rappresentano diversi livelli di organizzazione biologica di un organismo. Impiegando cellule da feocromocitoma di ratto da linee cellulari PC12 in test di vitalità MTT-test è stato

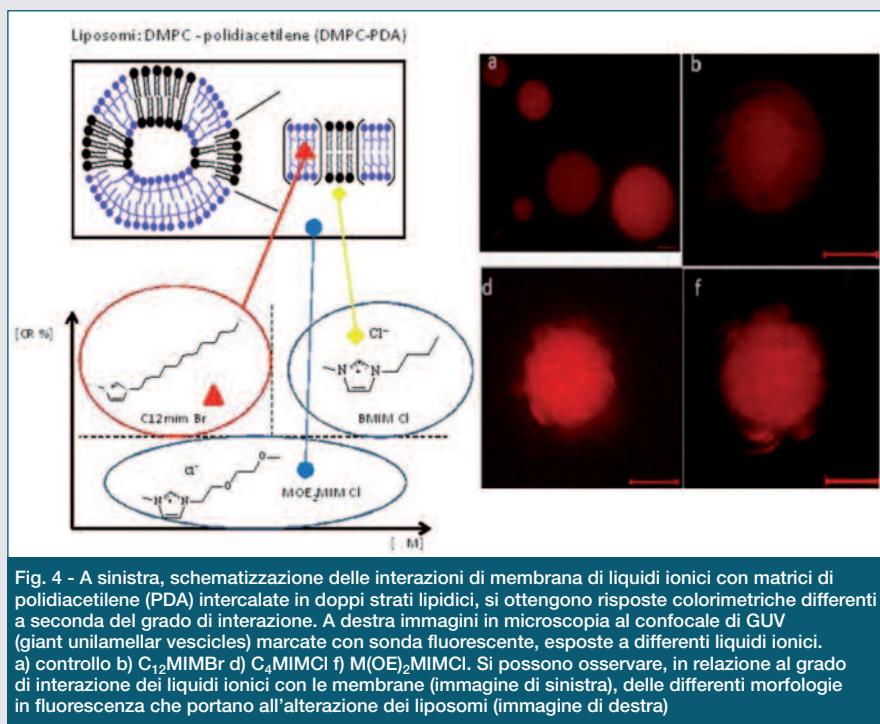
Tab. 4 - Effetti tossicologici dei liquidi ionici ossigenati su diverse specie di organismi acquatici

Liquido ionico		EC ₅₀ μM				
	<i>n</i>	<i>D. magna</i> [16-23]	<i>S. marinoi</i> [38]	<i>P. tricornutum</i> [38]	<i>V. fischeri</i> [16-23]	
C ₄ MIMCl	-	-	120	1260	-	
C ₄ MIMBF ₄	-	54	-	-	1635	
C ₄ MIMN(CN) ₂	-	72	-	-	1353	
MOEMIMCl	1	-	2980	>20000	-	
MOEMIMBF ₄	1	774	-	-	8093	
MOEMIMN(CN) ₂	1	862	-	-	12078	
M(OE) ₂ MIMCl	2	-	4640	>20000	-	
M(OE) ₂ MIMBF ₄	2	930	-	-	6151	
M(OE) ₂ MIMN(CN) ₂	2	1140	-	-	8253	
M(OE) ₃ MIMBF ₄	3	650	-	-	2823	
M(OE) ₃ MIMN(CN) ₂	3	808	-	-	5311	
M(OE) ₄ MIMN(CN) ₂	4	926	-	-	488	

Tab. 5 - Confronto dei valori di EC₅₀ in test di citotossicità ottenuti su differenti linee cellulari

Liquido ionico	Linea cellulare	Tempo (h)	EC ₅₀ mg/L	Rif.
C ₄ MIMCl	HeLa	24	12,5	[39]
	IPC 81	44	3,6	[45]
		44	>10	[21]
C ₄ MIMBF ₄	CaCo ₂	24	28,6	[41]
		48	3,8	[41]
	HeLa	24	0,6	[39]
		44	5,3	[39]
		48	4,5	[46]
	IPC 81	44	1,7	[45]
	PC12	16	1,06	[16]

C₄MIM = 1-butil-3-metilimidazolio



osservato che liquidi ionici a corta catena alchilica come il $C_4MIM \cdot BF_4$ ($EC_{50}=1,06 \pm 0,07$ mM) risultano essere maggiormente tossici dei liquidi ionici con catene ossigenate, contenenti da uno a tre atomi di ossigeno, indipendentemente dal numero di atomi di ossigeno presenti nella catena laterale del catione. Test che valutano il rilascio dell'enzima di membrana lattato deidrogenasi (LDH) sono dei comuni *end-points* che determinano la vitalità cellulare misurando l'integrità di membrana di cellule esposte a molecole anfifiliche quali i liquidi ionici. I valori di EC_{50} da noi ottenuti per i $C_4MIM \cdot BF_4$ ($EC_{50}=1,66 \pm 0,22$ mM) sono nettamente inferiori a quelli di un tipico tensioattivo cationico come CTAB (cetil-trimetilammonio bromuro, $EC_{50}=0,008$ mM) a sostegno del rilevante effetto delle lunghe catene alchiliche. La scarsa tossicità dei liquidi ionici con catene ossigenate è stata confermata in un test di inibizione dell'acetilcolinesterasi, in cui essi hanno mostrato $EC_{50} > 1$ mM [16].

Effetti su modelli di membrane cellulari

In letteratura sono rintracciabili numerosi esempi riguardanti la misura delle proprietà micellari dei liquidi ionici che portano una lunga catena alchilica nel catione, ma poco si sa riguardo a liquidi ionici a corta catena alchilica e di quelli che hanno atomi di ossigeno nella struttura. Manca anche una conoscenza dettagliata dei meccanismi di azione dei liquidi ionici sulle membrane cellulari, che, da quanto abbiamo visto, sembrano essere uno dei principali bersagli della loro attività biologica. Le indagini condotte da Evans su modelli di membrana hanno impiegato principalmente liquidi ionici a catena lunga (più di dieci atomi di carbonio) [47]; i dati hanno evidenziato che questo tipo di liquidi ionici altera profondamente le proprietà delle membrane, determinandone la rottura anche a basse concentrazioni (al di sotto di 100 mM) e può distruggere completamente le membrane a più alte concentrazioni. Liquidi ionici con corte

catene alchiliche (quattro atomi di carbonio), anche a concentrazioni di 500 mM, determinano invece danni di scarsa entità alle membrane. In tutti i casi i dati hanno dimostrato che la capacità di indurre la rottura è fortemente correlata con la lunghezza delle catene alchiliche presenti. Il nostro gruppo di ricerca ha svolto esperimenti volti alla caratterizzazione delle tipologie di interazioni tra liquidi ionici con distinte caratteristiche strutturali e liposomi usati come modelli di membrane biologiche. Abbiamo impiegato vari tipi di sonde fluorescenti: difenilsatriene [16], pirene, matrici di acido polidiacetilencarbossilico. Abbiamo scelto sonde dotate di una diversa dislocazione nelle membrane lipidiche allo scopo di evidenziare quale sia il sito preferenziale dell'interazione dei diversi dei liquidi ionici con le membrane cellulari (Fig. 4).

I dati raccolti sono stati integrati da test di rottura di membrana, per valutare l'eventuale rilascio di materiale cellulare a seguito del contatto con il liquido ionico, test di FRET, analisi in microscopia su GUV (*Giant Unilamellar Vesicles*) marcate con sonde fluorescenti, test di alterazione delle proprietà dei lipidi di membrana in DSC (*Dinamic Scanning Calorimetry*), svolti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Jelinek dell'Università di BeerSheva in Israele [48].

Nello specifico gli studi hanno mostrato che tutti i liquidi ionici da noi testati presentano delle interazioni ma che vi è un'ampia variazione nel grado e del tipo di interazioni tra liquido ionico e il modello di membrana. Le analisi biochimiche condotte consentono di classificare le sostanze testate in diversi gruppi, in funzione del grado di penetrazione nei doppi strati e di destabilizzazione delle teste lipidiche:

- liquidi ionici che presentano lunghe catene alchiliche (come il $C_{12}MIMBr$) che esibiscono una forte attività di membrana, intercalandosi ai lipidi fino a distruggere i doppi strati fosfolipidici;
- liquidi ionici a corta catena alchilica che risultano mediamente attivi su modelli di membrana;
- liquidi ionici che presentano uno o due atomi di ossigeno nella catena laterale del catione ($MOEMIM$ e $M(OE)_2MIM$) determinano perturbazioni alle membrane di minor grado.

Da analisi svolte su GUV in microscopia al confocale si può comunque osservare come tutti i liquidi ionici testati hanno un'attività di membrana, senza necessariamente portare alla distruzione del doppio strato fosfolipidico. È interessante notare come liquidi ionici a catena ossigenata come $M(OE)_2MIM$ interferiscono con l'organizzazione lipidica, senza però generare pori che causerebbero il rilascio del materiale plasmatico con grave danno cellulare.

Conclusioni

Il crescente numero di indagini sugli effetti biologici avversi dei liquidi ionici effettuate negli ultimi anni sotto la spinta della previsione di un loro crescente impiego anche su larga scala, inizia a delineare un quadro coerente che permette di indirizzare le future ricerche e fornisce le basi per la

progettazione di nuove sostanze. Tra gli aspetti maggiormente associati risulta la capacità dei liquidi ionici di interagire con le membrane cellulari; queste rappresentano quindi uno dei principali bersagli dell'azione tossica, ma probabilmente non l'unico. Sotto questo aspetto, è dunque possibile operare una classificazione dei liquidi ionici in tre classi:

1. liquidi ionici con lunghe catene idrofobiche, potenti tensioattivi che svolgono nei confronti delle membrane una vera azione detergente e distruttiva con conseguente forte tossicità;
2. liquidi ionici con corte catene alchiliche, in grado di danneggiare le membrane ma solo a concentrazioni relativamente alte, la tossicità elevata che mostrano verso certi gruppi di organismi potrebbe essere dovuta all'azione su altri bersagli;
3. liquidi ionici con sostituenti polari, come le catene polietossilate, interagiscono con le membrane ma senza apparenti danni cellulari, sono

in generale poco o per nulla tossici verso molte specie ecologicamente significative, rappresentano un'ottima scelta alternativa ai liquidi ionici più comuni ove le loro proprietà solventi siano adeguate allo scopo previsto.

Il quadro è tuttavia solo abbozzato e l'interazione con i diversi tipi di organismi bersaglio appare complessa e sollecita l'acquisizione di ulteriori dati. Ancora da approfondire dettagliatamente è la valutazione della tossicità algale. Di particolare rilevanza è l'emergere di un importante effetto del mezzo disperdente acquoso, in particolare la sua forza ionica, come era da attendersi data la natura ionica delle sostanze.

I temi che abbiamo ora evidenziato richiedono tutti uno sforzo di ricerca, *in primis* l'individuazione dei bersagli biologici diversi dalle membrane, il che è indice della rilevanza del "campo liquidi ionici" ma anche di un crescente allarme per il rischio connesso alla loro diffusione.

Bibliografia

- [1] N.V. Plechkova *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 123.
- [2] www.intermediates.basf.com/chemicals/ionic-liquids/acid
- [3] R.P. Swatloski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**(18), 4974.
- [4] E.F. Borra *et al.*, *Nature*, 2007, **447**(7147), 979.
- [5] F. Fabregat-Santiago *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**(17), 6550.
- [6] C. Samorì *et al.*, *Bioresource Technol.*, 2010, **101**(9), 3274.
- [7] B. Jastorff *et al.*, *Green Chem.*, 2003, **5**, 136.
- [8] B. Jastorff *et al.*, *Green Chem.*, 2005, **7**, 362.
- [9] J. Ranke *et al.*, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 2183.
- [10] T.P.T. Pham *et al.*, *Water Res.*, 2010, **44**, 352.
- [11] A.S. Wells *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, 2006, **10**, 794.
- [12] M. Matzke *et al.*, *Green Chem.*, 2007, **9**, 1198.
- [13] S. Stolte *et al.*, *Green Chem.*, 2007, **9**, 1170.
- [14] C. Pretti *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2009, **72**(4), 1170.
- [15] S.P.M. Ventura *et al.*, *Aquat. Toxicol.*, 2010, **96**, 290.
- [16] C. Samorì *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2010, **73**, 1456.
- [17] R. Bernot *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, **24**(1), 87.
- [18] J. Wang *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2009, **72**, 1798.
- [19] D. Couling *et al.*, *Green Chem.*, 2006, **8**, 82.
- [20] K. Docherty *et al.*, *Green Chem.*, 2005, **7**, 185.
- [21] J. Ranke *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2004, **58**, 396.
- [22] M.T. Garcia *et al.*, *Green Chem.*, 2004, **6**, 166.
- [23] C. Samorì *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2007, **26**(11), 2379.
- [24] A. Romero *et al.*, *J. Hazard Mater.*, 2008, **151**, 268.
- [25] C. Cho *et al.*, *Chemosphere*, 2007, **69**, 1003.
- [26] T. Pham *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **105**, 425.
- [27] T. Pham *et al.*, *Environ. Tox. Chem.*, 2008, **27**(7), 1583.
- [28] C. Cho *et al.*, *Green Chem.*, 2008, **10**, 67.
- [29] C. Cho *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2008, **71**(1), 166.
- [30] K. Kulacki *et al.*, *Green Chem.*, 2008, **10**, 104.
- [31] A. Latała *et al.*, *Green Chem.*, 2009, **11**, 580.
- [32] A. Latała *et al.*, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1371.
- [33] Q. Liu *et al.*, *Green Chem.*, 2005, **7**, 39.
- [34] A. Pinkert *et al.*, *Chem. Rev.* 2009, **109**, 6712.
- [35] P. Galletti *et al.*, *Green Chem.*, 2007, **9**, 987.
- [36] L. Branco *et al.*, *J. Org. Chem.* 2004, **69**(13), 4381.
- [37] J.E. Bara *et al.*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2007, **46**(16), 5380.
- [38] C. Samorì *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, 2011, **24**(3), 392.
- [39] P. Stepnowski *et al.*, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2004, **23**, 513.
- [40] R.F.M. Frade *et al.*, *Green Chem.*, 2007, **9**, 873.
- [41] A. Garcia-Lorenzo *et al.*, *Green Chem.*, 2008, **10**, 508.
- [42] R.F.M. Frade *et al.*, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1160.
- [43] J. Ranke *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2007, **67**, 430.
- [44] S. Stolte *et al.*, *Green Chem.*, 2006, **8**, 621.
- [45] S. Stolte *et al.*, *Green Chem.*, 2007, **9**(7), 760.
- [46] X.F. Wang *et al.*, *Green Chem.*, 2007, **9**(11), 1191.
- [47] K.O. Evans *et al.*, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2006, **274**, 11.
- [48] N. Gal *et al.*, *BiochimBiophysActa*, 2012, **1818**(12), 2967.

ABSTRACT

Ionic Liquids: Ecotoxicological Features and Biological Interactions

The (eco)toxicological features of ionic liquids, and their biological interactions, have been assessed using different classes of living organisms, including invertebrates, algae, bacteria. A parallel study on artificial membrane models and cultured cell lines has been carried out. The most important trend is dominated by the amphiphilic character of the substances, which determines the kind of interaction with cell membranes, giving rise to roughly three kinds of ionic liquids: long-chain, strongly amphiphilic; short-chain, poorly amphiphilic; polar, non toxic. More specific, enzyme directed effects, however, must be taken into account for completing the toxicological pattern of ionic liquids.