

Università della Calabria

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

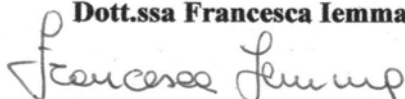
Tesi di Dottorato di Ricerca in
Metodologie per lo Sviluppo di Molecole di Interesse Farmacologico

Settore Scientifico-Disciplinare CHIM/09
(XX Ciclo)

***Polimeri funzionali: aspetti strutturali, sintesi ed
applicazioni nel settore tecnologico-farmaceutico***

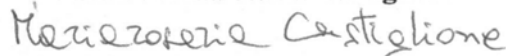
SUPERVISORE

Dott.ssa Francesca Iemma



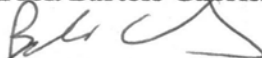
CANDIDATA

Dott.ssa Mariarosaria Castiglione



COORDINATORE

Prof. Bartolo Gabriele



Anno Accademico 2006-2007

Università della Calabria

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche



Settore Scientifico-Disciplinare CHIM/09
(XX Ciclo)

Borsa di studio finanziata da RTC



RTC
RICERCHE
E TECNOLOGIE
COSMETOLOGICHE

per conto di:



ZSCHIMMER & SCHWARZ
ITALIANA S.p.A.

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

Introduzione	1
Capitolo I	
Polimeri per applicazioni cosmetiche e farmaceutiche	
1.1 Premessa	5
1.2 Ruolo degli aminoacidi nella dermocosmesi	6
1.3 Substrati polimerici per applicazioni biomediche ed industriali	8
1.4 Caratteristiche strutturali dei polimeri a blocchi e proprietà delle dispersioni acquose	10
1.5 Tensioattivi polimerici	13
1.5.1 Gemini e tensioattivi polimerici	14
1.5.2 Tensioattivi multi funzionalizzati	15
1.6 Caratteristiche di tensioattivi e tensioliti	17
1.6.1 Surfattanti anionici	20
1.6.2 Surfattanti cationici	21
1.6.3 Surfattanti non ionici	22
1.6.4 Surfattanti anfoteri	23
1.7 Proprietà dei tensioattivi	24
1.7.1. Abbassamento della tensione superficiale	24
1.7.2 Azione schiumogena	25
1.7.3 Azione bagnante (umettante)	25
1.7.4 Attività emulsionante	26
1.7.5 Potere detergente	26

1.7.6	Potere battericida	27
1.8	Composti dell'ammonio quaternario	27
1.9	Applicazione dei composti quaternari come biocidi	29
1.9.1	Meccanismo dell'azione antibatterica	31

Capitolo II

Nuovi sistemi polimerici a base di aminoacidi funzionalizzati

2.1	Premessa	35
2.2	Caratteristiche degli aminoacidi neutri	36
2.3	Processo di funzionalizzazione dell'amminoacido glicina	38
2.4	Diglicina derivatizzata	39
2.5	Glicina e diglicina metacrilata nel processo di polimerizzazione radicalica	40
2.5.1	Processo di poli-addizione radicalica	40
2.5.2	Sintesi del polimero C1	42
2.5.3	Sintesi del polimero C2	43
2.6	Polimerizzazione con composti all'azoto quaternario	43
2.7	Caratterizzazione dei polimeri sintetizzati	46
2.8	Valutazione delle proprietà tensioattive dei polimeri sintetizzati	51
2.8.1	Definizione della tensione superficiale	51
2.8.2	Principi di funzionamento del tensiometro	53
2.8.3	Misure della tensione superficiale	54

Capitolo III

Drug delivery systems: microsfere di destrano e profarmaci

3.1	Premessa	59
3.2	Forme dosaggio a base di destrano	61
3.2.1	Microsfere	62
3.2.2	Idrogel	63
3.3	Studio di carriers di destrano per il rilascio colon specifico	63
3.4	Matrici di destrano basate su interazioni di natura fisica	64
3.5	Realizzazione di idrogel pH-sensibili mediante formazione di ponti esterei	65
3.6	Profarmaci e rilascio sito specifico	67
3.6.1	Bioprecursori	68
3.6.2	I profarmaci tipo carrier	69
3.7	Profarmaci macromolecolari e polimerici	69
3.7.1	I macromolecolari coniugati	70
3.7.2	Strategie di coniugazione farmaco-polimero	71
3.8	Meccanismo di rilascio del principio attivo	72
3.9	Dinamiche di rilascio colon-specifico	74
3.10	Azo-coniugati	75

Capitolo IV

Microsfere pH-sensibili di destrano derivatizzato

4.1	Premessa	78
4.2	Derivatizzazione del destrano mediante glicidil metacrilato	80

4.2.1	Dialisi per ultrafiltrazione	82
4.3	Microsfere di destrano da polimerizzazione radicalica	83
4.4	Caratterizzazione delle microsfere	86
4.4.1	Determinazione del grado di rigonfiamento	86
4.4.2	Analisi FT-IR	87
4.4.3	Analisi dimensionale	89
4.4.4	Analisi morfologica	90
4.5	Caratteristiche del 5-Fluorouracile e suo rilascio	90
4.6	Impregnazione del 5-FU su microsfere di destano	92
4.7	Valutazione del rilascio mediante analisi HPLC	92
4.8	Impregnazione della Teofillina e rilascio da microsfere di destano	94
4.9	Conclusioni	95

Capitolo V

Rilascio colon-specifico di 5-ASA da microparticelle derivatizzate

5.1	Premessa	96
5.2	Realizzazione del supporto microparticellare	97
5.3	Caratterizzazione della matrice epossidica	99
5.3.1	Determinazione dei gruppi ossirancici disponibili	102
5.4	Apertura degli anelli epossidici mediante paranitroanilina	103
5.5	Riduzione dei nitrogruppi	105
5.6	Determinazione dei gruppi amminici liberi su supporti polimerici	107
5.7	Reazioni di diazotazione ed attacco dell'acido salicilico	109
5.8	Conclusioni	111

Capitolo VI

Proprietà antiossidanti di polimeri funzionali

6.1 Introduzione	112
6.2 Derivato acrilico o vinilico della vitamina E	114
6.3 Flavonoidi	115
6.3.1 Polirutina	115
6.3.2 Coniugati polimeri-flavonoidi	118
6.4 Polimeri chelanti	119
6.4.1 Derivato formaldeidico dell'8-idrossichinolina	119
6.4.2 Derivato dell'acido fitico	121
6.5 Resine antiossidanti	124
6.5.1 Resina avente derivati fenolici	124

Capitolo VII

Studio sull'acido fitico come agente antiossidante

7.1 Introduzione	126
7.2 Proprietà antiossidanti dell'InsP ₆	126
7.3 Complessi Fe ³⁺ -InsP ₆	128
7.4 Inibizione delle reazioni ossidative	130
7.5 Effetti cellulari dell'InsP ₆	133
7.6 Interazione InsP ₆ -proteine	134
7.7 Proprietà anticancro dell'InsP ₆	135
7.8 Applicazioni biomediche dell'InsP ₆	136

7.9 Applicazioni industriali dell'InsP ₆	137
---	-----

Capitolo VIII

Microsfere polimeriche di *myo*-inositolo fosforilato: chelazione del

Fe³⁺ ed attività antiossidante

8.1 Introduzione	138
8.2 Sintesi del monomero	139
8.3 Preparazione delle microsfere	140
8.3.1 Polimerizzazione per precipitazione	140
8.4 Analisi del materiale ottenuto	142
8.4.1 Analisi dimensionale	143
8.4.2 Analisi morfologica	143
8.4.3 Determinazione quantitativa dei gruppi fosfato nelle microsfere	144
8.5 Determinazione dell'attività antiossidante	146
8.6 Conclusioni	149

Parte Sperimentale	151
---------------------------	------------

INTRODUZIONE

I più recenti sviluppi della ricerca in ambito farmaceutico sono incentrati non solo sulla realizzazione di nuovi principi attivi ma anche sullo sviluppo di sistemi in grado di interagire con i comparti biologici ottimizzando la somministrazione e gli effetti terapeutici dei farmaci.

Grazie agli evidenti progressi compiuti nell'ambito delle tecnologie farmaceutiche, negli ultimi anni è diventato d'uso comune l'applicazione clinica di una serie di sistemi di natura polimerica finalizzati al miglioramento dell'interazione tra farmaco ed organismo. Basti pensare alle molteplici applicazioni dei Drug Delivery System (DDS) capaci di controllare la velocità ed il periodo di rilascio, oppure ai numerosi profarmaci che veicolano nell'organismo i principi attivi intatti e consentono a questi il raggiungimento di aree specifiche del corpo.

L'interesse mostrato dalla ricerca scientifica verso le molecole polimeriche è dovuto in particolar modo alla consapevolezza che tali materiali mostrano migliore applicabilità, per aspetti diversi, rispetto alle convenzionali molecole di basso peso molecolare, nel settore farmaceutico ma anche in quello cosmetico. Il profilo essenzialmente ricercato dei polimeri per applicazioni farmaceutiche e cosmetiche è senza dubbio rappresentato dalla biocompatibilità in entrambi i settori e la presenza di peculiari caratteristiche che consentono il miglioramento delle formulazioni nelle quali essi sono impiegati. Tali proprietà sono insite in molti polimeri attualmente in uso che possono essere sia di origine naturale che sintetica e semisintetica. L'applicazione di polimeri "attivi" potrebbe offrire maggiori garanzie di sicurezza in termini di assenza di tossicità per assorbimento ed accumulo rispetto ai sistemi tradizionali.

Il denominatore comune di questo lavoro di ricerca triennale è identificabile appunto nei polimeri funzionali, sintetizzati mediante tecniche differenti ed applicabili per specifiche finalità in campo farmaceutico o cosmetico.

Nella prima parte della tesi sono stati realizzati dei materiali polimerici, a partire dagli amminoacidi glicina e diglicina, che si configurano come prodotti con potenziali applicazioni condizionanti, tensioattive o comunque adjuvanti nelle

formulazioni cosmetiche o farmaceutiche. L'amminoacido è stato inizialmente funzionalizzato con dei gruppi metacrilici allo scopo di porre il materiale base nelle condizioni più idonee per dar luogo ad un successivo processo di polimerizzazione radicalica. Sono stati coinvolti nel processo di polimerizzazione anche dei composti d'ammonio quaternario come comonomeri, infatti questi ultimi risultano necessari per ottenere materiali caricati positivamente idonei per le formulazioni cosmetiche. I prodotti ottenuti rivelano anche una tendenza ad abbassare la tensione superficiale.

La seconda parte di questa tesi è stata incentrata sulla realizzazione di nuovi DDS con potenziali applicazioni nel settore farmaceutico-sanitario testate in vitro.

Esattamente ci siamo concentrati su due importanti settori della ricerca sui DDS:

- sintesi di un idrogel di destrano derivatizzato con funzione di sistema carrier per il rilascio di farmaco;
- realizzazione di un profarmaco di tipo polimerico a base di un agente terapeutico antinfiammatorio.

È stato progettato, sintetizzato e caratterizzato un sistema polimerico a base di destrano, di forma microsferica, ed in seguito valutato il rilascio di due agenti terapeutici da tale polimero.

Il destrano è un polisaccaride di origine batterica che è soggetto alla degradazione enzimatica ad opera della destranasi, un enzima prodotto dalla microflora batterica del colon. Tale polisaccaride è stato inizialmente funzionalizzato con glicidilmetacrilato, al fine di introdurre gruppi funzionali in grado di subire reazioni di polimerizzazione. Il destrano derivatizzato è stato quindi sottoposto a polimerizzazione radicalica, mediante la tecnica dell'emulsione in fase inversa, sia con acido metacrilico come comonomero, sia con acido metacrilico come comonomero e N,N'-etilenbisacrilamide come agente reticolante. Sono state in tal modo realizzate delle microsfele in seguito caricate, mediante il metodo dell'impregnazione, con 5-fluorouracile, un farmaco impiegato nel trattamento del carcinoma colon-rettale, e con teofillina, un derivato dimetilico della xantina usato soprattutto per la sua potente azione broncodilatatrice, antiasmatica. Infine è stato valutato il rilascio di questi farmaci dalle matrici, ricreando in vitro le condizioni dell'ambiente gastrico ed intestinale.

Un approccio differente è stato seguito per la realizzazione di un profarmaco di tipo polimerico a base di acido 5-amminosalicilico (5-ASA), un agente terapeutico utilizzato per malattie infiammatorie dell'intestino come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa.

Tale profarmaco si ottiene in seguito alla copolimerizzazione di due monomeri commerciali: glicidilmetacrilato e divinilbenzene, quest'ultimo con funzione di reticolante che essendo in possesso di un determinato grado di idrofobicità conferisce al supporto polimerico la capacità di non rigonfiare in mezzi acquosi. In tal modo si costituiscono delle microparticelle (munite di gruppi epossidici) che vengono opportunamente funzionalizzate in modo da consentire alla struttura il legame del principio attivo mediante formazione di un ponte diazo.

Un polimero, così fatto, è in grado di percorrere inerte il transito all'interno dello stomaco ed eludendo il forte pH, ha la capacità di raggiungere l'intestino.

All'interno del colon, dove l'abilità della microflora è in grado di operare riduzioni metaboliche che sono considerate una importante via per la detossificazione, si avrà la scissione del ponte diazo grazie alla presenza delle azoreduttasi, una colonia batterica presente all'interno del lume intestinale, che riveste un ruolo essenziale nella liberazione dell'acido 5-amminosalicilico il quale in tale sede svolge la sua funzione di tipo antinfiammatoria.

L'ultima parte della tesi descrive la sintesi di un potente materiale antiossidante, anch'esso di tipo polimerico, specifico per la chelazione di ioni ferrici. Si tratta di microsfeere polimeriche contenenti dei derivati dell'acido fitico che conferiscono ad esse spiccata attività antiossidante nei sistemi biologici. La strategia di sintesi delle microsfeere prevede: la funzionalizzazione del myo-inositolo, materiale di partenza, con un gruppo suscettibile di polimerizzazione radicalica, la copolimerizzazione con etilenglicoldimetacrilato mediante tecnica di polimerizzazione per precipitazione e, infine, la fosforilazione dei gruppi ossidrilici presenti.

La capacità antiossidante del materiale sintetizzato è stata testata su membrane microsomiali di fegato di ratto. Tale prodotto risulta molto interessante in quanto capace di chelare gli ioni Fe^{3+} , i quali, grazie alla loro chimica di ossidoriduzione e all'elevata affinità per l'ossigeno, se liberi nei fluidi biologici mediano la

formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) ossidanti e pericolose. L'acido fitico presente nel polimero, complessando il metallo, lo rende totalmente non reattivo e ne impedisce la partecipazione alle reazioni ossidoriduttive che portano alla generazione di ROS.

Il materiale realizzato mostra, pertanto, delle interessanti potenzialità per delle applicazioni in ambito farmaceutico e cosmetico. In campo farmaceutico, in particolare, gli antiossidanti polimerici rappresentano una soluzione al problema dell'instabilità metabolica di alcuni antiossidanti a basso peso molecolare, in quanto i derivati polimerici hanno maggiore stabilità metabolica e, essendo degradati più lentamente, rivelano una più lunga durata d'azione. Inoltre, grazie alla possibilità di ancorare un antiossidante ad una matrice polimerica mediante legami labili, è possibile realizzare sistemi che permettono una migliore veicolazione dell'antiossidante e un suo rilascio mirato.

CAPITOLO I

POLIMERI PER APPLICAZIONI COSMETICHE E FARMACEUTICHE

1.1 Premessa

Negli ultimi tempi è sempre più facile imbattersi in articoli e servizi, più o meno specialistici che fanno riferimento a temi quali quello della “*cosmesi naturale*” ovvero del “*prodotto verde*”, tuttavia non risulta altrettanto semplice approfondire queste tematiche su testi specifici che affrontino l’argomento in termini teorici ed applicativi. Ciò non toglie che il campo della ricerca scientifica finalizzata alla cosmesi naturale risulti sempre più oggetto di applicazione del Marketing. A fare da contesto e anche da concausa allo sviluppo di tale fenomeno sono stati i cambiamenti nell’ambito della domanda del consumatore. Negli ultimi anni si è verificata una crescente attenzione rivolta al cosmetico bio-ecologico¹, indubbiamente questa tendenza scaturisce dalla saturazione dei bisogni di base ma anche da una forte crescita d’importanza dei bisogni di carattere psico-sociologico. Nella ricerca scientifica-tecnologica in campo cosmetico diventa sempre più crescente l’interesse verso formulazioni capaci di svolgere la loro funzionalità cosmetica e contemporaneamente proteggere i tessuti sui quali sono applicati². Ne deriva una responsabilità delle imprese in termini di impiego di materie prime, imballaggi, tecniche di produzione che devono risultare a basso impatto ambientale ed in grado di tutelare la salute del consumatore. Il panorama della ricerca che propone i nuovi cosmetici naturali risulta molto vario ma sicuramente punta ad una strategia di differenziazione rispetto alla cosmesi tradizionale sia per l’utilizzo di fonti naturali come materie prime che per l’obiettivo di ottenere prodotti ecologici e biosostenibili.

Inizialmente tali cosmetici erano semplicemente additivati con un componente naturale, ma oggi questo settore si è notevolmente evoluto introducendo i

¹ K. Holmberg, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (2001), 6, 148-159.

² M. O. Barker, *American Journal of Contact Dermatitis*, (1998), vol 9, 2, 130-135.

cosmetici completamente naturali o fito-cosmetici, pertanto si può parlare non soltanto di cosmetico ecologico, ma anche biologico, dati i suoi componenti.

La finalità di questo lavoro di ricerca triennale risiede nello studio, nella realizzazione e nella caratterizzazione di nuovi materiali polimerici contenenti proteine d'origine naturale e molecole con proprietà appropriate per l'impiego cosmetico. Il nostro l'obiettivo era quello di sintetizzare sistemi macromolecolari che risultino:

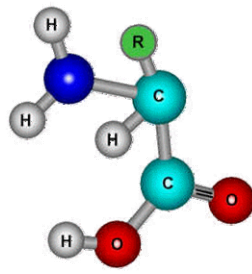
- *Naturali*: ovvero sistemi modellati sulla base di sostanze di provenienza vegetale, nel caso specifico abbiamo selezionato proteine del grano ed aminoacidi che mantengono inalterate le proprietà strutturali (proteine e prodotti di lisi finora impiegati nelle formulazioni cosmetiche non mantengono gli aspetti strutturali tipici delle proteine native e questo ne modifica notevolmente le caratteristiche e le potenziali applicazioni)
- *Idrosolubili*: prodotti versatili che ben si prestano alle applicazioni cosmetiche
- *Biocompatibili*: materiali non aggressivi sulle superfici biologiche d'azione (epidermide, capelli, etc.)

Negli ultimi anni nelle formulazioni cosmetiche sono state utilizzate sempre più frequentemente amminoacidi, gli idrolizzati proteici ed i materiali polimerici. Proteine ed amminoacidi si configurano come materiali estremamente idonei a questo scopo in quanto dotati dell'essenziale proprietà di legarsi a molecole d'acqua e quindi funzionare sulla pelle da agente d'idratazione.

1.2 Ruolo degli amminoacidi nella dermocosmesi

Gli idrolizzati proteici e gli amminoacidi sono da tempo considerati preziosi ingredienti di formulazioni cosmetiche in quanto si tratta di sostanze fortemente igroscopiche che aumentano la capacità dello strato corneo di trattenere acqua.

Con il termine amminoacido si definisce un acido organico comprendente uno o più gruppi amminici, come mostrato nella figura sottostante:



Gli amminoacidi conosciuti sono circa una ventina, tra questi si ricordano i 2- o α -amminoacidi, molti dei quali si formano per idrolisi delle proteine. Alcuni di essi sono essenziali per l'uomo (metionina, tirosina, leucina, valina, treonina, triptofano, ecc.), non essendo sintetizzabili dall'organismo umano devono essere introdotti mediante la dieta. Tali molecole sono estremamente importanti in quanto fondamentali precursori di proteine ed acidi nucleici. Possono essere prodotti in quattro modi fondamentali: estrazione, sintesi chimica, fermentazione e catalisi enzimatica. Tra gli utilizzi si possono citare l'integrazione alimentare (per integrare diete povere in amminoacidi essenziali), l'additivazione di alimenti (per il sapore o l'aroma), la nutrizione animale, la farmaceutica e la cosmetica. Sono presenti anche utilizzi nell'industria chimica, come monomeri per resine epossidiche, additivi per materie plastiche, agenti indurenti per resine acriliche. Gli amminoacidi vengono considerati dei veri e propri principi attivi per cosmetica per via delle loro proprietà emollienti, cicatrizzanti, restitutive del volume e della robustezza del capello. Inizialmente erano impiegati in pomate dermatologiche, successivamente sono divenuti di frequente utilizzo anche nei cosmetici come attivi in creme e lozioni antirughe, formulazioni idratanti³. Tra gli amminoacidi più diffusi in cosmetica si ricordano: cisteina, metionina, acetamidacaproico, ma anche la prolina, la glicina e la lisina come sostanze idratanti.

L'idratazione della pelle è fondamentale perché essa mantenga le sue proprietà plasto-elastiche, le qualità estetiche della pelle, come la morbidezza, la levigatezza e la sua compattezza, dipendono proprio da queste e quindi sono direttamente dipendenti dall'idratazione. I prodotti dermocosmetici in cui sono presenti

³ D. Häussinger, *Ital J Gastroenterol*, (1993), 25(1), 42-48.

aminoacidi trovano largo impiego nel trattamento non tanto del cronoinvecchiamento quanto del fotoinvecchiamento, il rationale del loro uso risiede nel poter ripristinare soprattutto la funzione di barriera dell'epidermide e con questa l'idratazione e una efficace protezione della cute⁴. Tali sostanze funzionali, che fungono da componenti delle formulazioni cosmetiche ad azione antiaging, fanno parte dei cosiddetti (NMF), un gruppo di sostanze organiche contenute soprattutto nell'epidermide, collocate fra lo strato granuloso e corneo che hanno proprio il compito di legare l'acqua negli strati più superficiali.

Inoltre l'utilità degli aminoacidi nei cosmetici è legata anche alla presenza di aminoacidi solforati come la metionina e la cisteina, che risultano indicati nel trattamento dei capelli e del cuoio capelluto.

1.3 Substrati polimerici per applicazioni biomediche ed industriali

Il proficuo impiego delle molecole polimeriche sia nel settore cosmetico che in quello farmaceutico è dovuto in particolar modo alla migliore applicabilità di tali materiali, per numerosi aspetti, rispetto alle convenzionali molecole di basso peso molecolare. Il profilo essenzialmente ricercato in tali composti è senza dubbio rappresentato dalla biocompatibilità in entrambi i settori e la presenza di peculiari caratteristiche che consentono il miglioramento delle formulazioni cosmetiche/farmaceutiche nelle quali essi sono impiegati. Tali proprietà sono insite in molti polimeri attualmente in uso, che possono essere sia di origine naturale, come polisaccaridi (ciclodestrine, cellulosa, chitosano, acido ialuronico, ecc), proteine (caseina, gelatina, albumina, collagene, ecc.) sia di origine sintetica e semisintetica (poliammidi, poliesteri, poliaminoacidi, poliacrilati, derivati della cellulosa, ecc.). L'applicazione di polimeri "attivi" potrebbe offrire maggiori garanzie di sicurezza in termini di assenza di tossicità per assorbimento ed accumulo.

I polimeri sono materiali estremamente utilizzati in una molteplicità di applicazioni (Tabella 1.1) che spaziano dalla stabilizzazione di dispersioni

⁴ F. Gioia, L. Celleno, *Skin Research and Technology*, (2002), 8, 178-186.

colloidal⁵ alle applicazioni in campo biomedico⁶.

APPLICAZIONI INDUSTRIALI E BIOMEDICHE DI MATERIALI POLIMERICI	
modificatori reologici	Di fluidi semplici
	di fluidi complessi
	fluidi per il recupero secondario di petrolio
	componenti di vernici ⁷ e inchiostri
	tensioattivi polimerici ⁸
Agenti	Schiumogeni ⁹
	Antischiumogeni
	Emulsionanti
	Solubilizzanti
	Flocculanti
	Disperdenti di sospensioni solide
Adiuvanti	in formulazioni cosmetiche ¹⁰
	negli alimenti
	veicoli per il rilascio controllato di farmaci

Tabella 1.1

In campo cosmetico ma anche farmaceutico, si sono rivelati molto versatili i polimeri a blocchi o segmentati con caratteristiche anfifiliche, ossia costituiti da una porzione idrofoba e da una porzione idrofila. Questi si configurano come interessanti alternative ai tensioattivi tradizionali.

⁵ M. Braun, J. Carl, W. Desch, P. Quis, Pat. DE19532229, Chem. Abstract, (1997), 126:251589.

⁶ J. Ma, H. Cao, Ya. Li, Yo. Li, J. Biomat. Sci. Polym. E., (2002), 13, 67.

⁷ K. V. Khais, G. I. Shabaev, G. S. Marova, V.A. Khlyupina, N. A. Karnaukhov, B. V. Naumov, Pat. RU2177489, Chem. Abstract, (2001), 138:123966.

⁸ M. R. Anklam, D A. Saville, R K. Prud'homme, Polym. Advan. Technol., (2001), 12, 70.

⁹ R. Dyllick-brenzinger, G. Glas, P. Lorencak, R. Heger, G. Oetter, Pat.DE19835968, Chem. Abstract, (2000), 132:139125.

¹⁰ C. Matsunaga, Y. Hirano, Pat. JP2000159638, Chem. Abstract, (2000), 133:48679.

Tali sistemi, se opportunamente progettati, possono presentare particolari caratteristiche quali ad esempio la tendenza ad autoassemblarsi in strutture ordinate o ad autodispersersi in mezzo acquoso.

1.4 Caratteristiche strutturali dei polimeri a blocchi e proprietà delle dispersioni acquose

La struttura del polimero può derivare da un singolo monomero o da più monomeri. Queste unità possono essere posizionate in modo da dare copolimeri casuali, alternati o aggraffati (Figura 1.1).

ABABABABABABABABABABAB	copolimero alternato
AABABBBABAABAAABBABBBBAAB	copolimero casuale
AAAAAABBBBBBAAAAAABBBBBB	copolimero a blocchi
AAAAAAAAAAAAAAAA	copolimero aggraffato
B B B	
B B B	
B B B	
B B B	
B B B	

Figura 1.1 Distribuzione dei monomeri

Tali polimeri possono essere inoltre lineari o ramificati (Fig. 1.2).

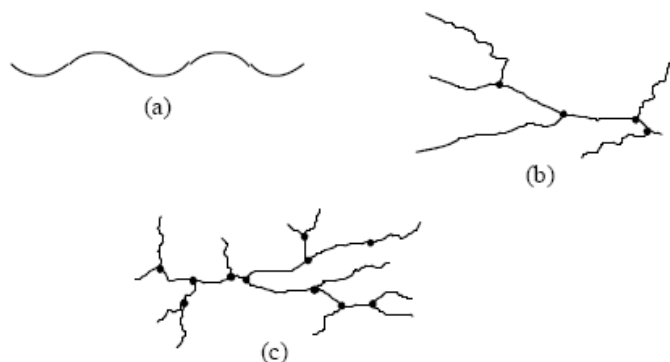


Figura 1.2 (a) copolimero lineare; (b) copolimero ramificato; (c) copolimero ramificato- struttura dendridica

L'affinità per l'acqua può essere data dall'interazione di segmenti ionici, polari o idrofili (Fig 1.3) che si legano tramite legami a idrogeno, oppure può riguardare la solvatazione delle strutture anfifiliche.

Polimeri anfifilici in acqua possono costituire sospensioni, dispersioni o soluzioni, in funzione dello stato di aggregazione, della idrofilia del polimero e del tipo di miscelazione¹¹. Il loro assemblaggio spontaneo varia fortemente con l'architettura del copolimero, tanto che ne consegue un diverso comportamento a seconda delle differenti architetture polimeriche (copolimeri a blocchi, aggraffati e a stella). È importante sottolineare che solo i copolimeri a blocchi mostrano una stretta rassomiglianza con il comportamento dei tensioattivi.

In mezzo acquoso tali polimeri formano generalmente dispersioni colloidali, costituite da aggregazioni di macromolecole, a causa della incompleta solubilità derivante dalle caratteristiche anfifiliche. Un colloide polimerico può a sua volta avere caratteristiche liofiliche o liofobiche, a seconda della maggiore o, rispettivamente, minore tendenza del polimero ad "assorbire" acqua dal mezzo sospendente¹². All'aumentare delle caratteristiche idrofile della struttura polimerica le particelle vengono rigonfiate dall'acqua in misura crescente, fino al punto in cui l'affinità per l'acqua rende le macromolecole completamente solubili ed il sistema perde le caratteristiche tipiche di una dispersione colloidale.

¹¹ D. Dieterich, *Prog. Org. Coat.*, (1981), 9, 281.

¹² R.M. Fitch, *Polymer colloids: a comprehensive introduction*. Academic Press, (1997), UK.

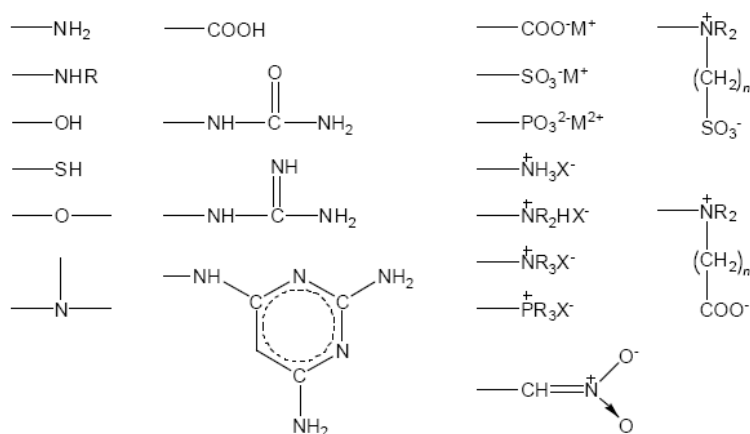


Figura 1.3 Gruppi funzionali che impartiscono idrofilia

La letteratura scientifica del vasto campo dei materiali polimerici suddivide questi ultimi in tre tipologie strutturali caratterizzate da una ampia variabilità delle caratteristiche liofile/liofobiche e, conseguentemente, della natura delle rispettive dispersioni acquose.

Le possibili strutture sono:

- **copolimeri anfifilici a blocchi**, in grado di dar luogo a soluzioni, aggregazioni micellari o particelle strutturate (sfere stratificate di tipo *core-corona*) di maggiori dimensioni in funzione della natura dei comonomeri e del peso relativo dei singoli blocchi;
- **polimeri ionomerici** (ossia contenenti una frazione non trascurabile ma comunque inferiore al 10-15% di comonomeri ionizzabili), in grado di autodisperdersi in mezzo acquoso senza l'ausilio di tensioattivi o disperdenti;
- **polimeri sostanzialmente idrofobi** contenenti piccole quantità di gruppi funzionali polari o ionizzabili, che possono essere disperdibili in acqua come tali oppure, più frequentemente, grazie all'ausilio di additivi tensioattivi o disperdenti (questi ultimi sono comunemente noti come lattici polimerici).

Come è stato sopra evidenziato, i polimeri anfifilici possono dar luogo, analogamente ai tensioattivi a basso peso molecolare, ad una varietà di strutture che includono lamelle, sfere, cilindri e micelle. Grazie alla loro efficacia di adsorbimento all'interfaccia liquido/solido, possono essere impiegati come additivi per lattici polimerici; tuttavia la maggior parte dei lattici polimerici è costituita da macromolecole esse stesse con caratteristiche anfifiliche, che ne favoriscono la dispersione e stabilizzazione colloidale in un mezzo acquoso anche in assenza di additivi disperdenti. I lattici sintetici hanno a loro volta una vastissima varietà di applicazioni. Lattici che formano film sono impiegati come componenti principali della matrice legante in vernici, in rivestimenti e impregnanti per pavimenti e substrati porosi, inchiostri da stampa, adesivi, sigillanti e sempre più in applicazioni dove sostituiscono i tradizionali prodotti a solvente come conseguenza di norme ambientali più restrittive.

1.5 Tensioattivi polimerici

Come precedentemente esposto, un'importante applicazione dei polimeri è quella di tensioattivi. La scienza dei surfattanti è un campo importante dal punto di vista delle tecnologie; oggi tale settore ha acquistato maturità fornendo un'ampia varietà di molecole sul mercato ma c'è ancora spazio per nuove strutture progettate per propositi specifici e lavori innovativi, in questo ambito si collocano perfettamente i polimeri ad attività tensioattiva. Gli attuali sviluppi¹³ sono mossi da nuove applicazioni specifiche come le nanotecnologie, ma anche dalla necessità di disporre di tensioattivi innocui per l'ambiente (biodegradabili o a bassa irritabilità). L'osservazione che le proprietà dei tensioattivi siano aumentate permette di utilizzarne una minore quantità nelle formulazioni. I moderni tensioattivi polimerici sono considerati sostanze ausiliarie in quanto possiedono prerogative che migliorano l'atto lavante, aumentano l'effetto bagnante, sostengono la schiuma e solubilizzano più velocemente lo sporco.

¹³ Y. Cao, H. Li, *European Polymer Journal*, (2002), 38, 1457–1463.

1.5.1 Gemini e tensioattivi polimerici

I surfattanti polimerici consistono in tensioattivi convenzionali attaccati l'un l'altro tramite dei bracci che li legano a livello delle teste polari. Questo tipo di legame, che si incontra molto frequentemente in tali macromolecole, lascia libere le catene alchiliche e il core micellare liquido.

La chimica fisica dei tensidi dimerici, anche chiamati gemini (fig. 1.4), è stata studiata approfonditamente negli ultimi dieci anni¹⁴, i più recenti risultati hanno condotto alla sintesi di composti anionici o non ionici. I gemini cationici sono più semplici da realizzare a livello di sintesi organica, tuttavia trovano scarsa applicazione a causa della loro tossicità.

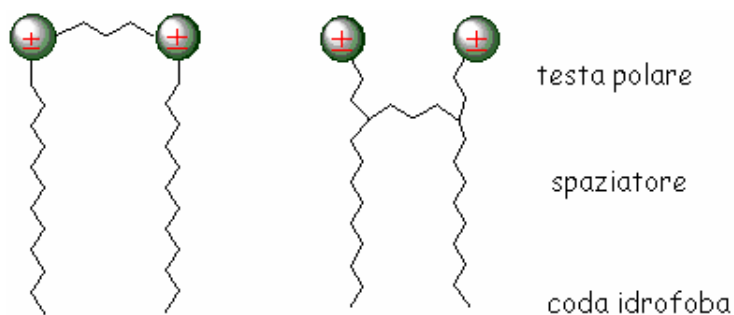


Figura 1.4

Un parametro importante da considerare nella progettazione di un surfattante polimerico è la natura e la lunghezza del braccio spaziatore che lega le unità monomeriche¹⁵. Spaziatori idrofobici in polimetilene che siano flessibili e lunghi a sufficienza penetrano nel dominio idrofobico dell'interfaccia con una conformazione *loop*.

I tensioattivi polimerici sono ben presenti nel mondo industriale, settore in cui sono usati in tante applicazioni già da anni, al contrario tali composti stanno

¹⁴ R. Zana, *Advances in Colloid and Interface Science*, (2002), 97, 205-253.

¹⁵ T. Yoshimura, Y. Nagata, K. Esumi, *Journal of Colloid and Interface Science*, (2004), 275, 618–622.

assumendo importanza nel mondo accademico della scienza dei surfattanti solo ora.

Il comportamento di surfattanti convenzionali in associazione dipende dalla competizione che si genera tra le interazioni attrattive tra catene alchiliche e le interazioni repulsive esistenti tra le teste polari. Tuttavia possono anche generarsi delle forze attrattive tra le teste polari dovute all'istaurarsi di legami a idrogeno, da questo fenomeno dipende la costruzione di una struttura supplementare bidimensionale. È importante sottolineare come nuove architetture molecolari¹⁶ (fig. 1.5) potrebbero far scaturire un maggior grado di libertà nelle interazioni tra molecole di tensioattivo.

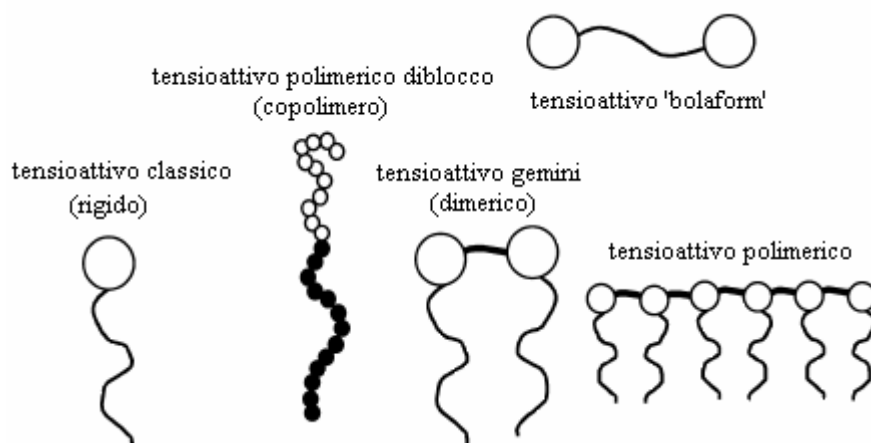


Figura 1.5

Ad esempio, i tensioattivi “*bolaform*” asimmetrici che consistono in due gruppi testa di differente tipo (A e B) connessi da uno spaziatore idrocarburico (H), mostrano quattro differenti interazioni tra le parti molecolari (H-H, A-A, B-B, e A-B) invece delle due interazioni tipiche dei tensioattivi classici.

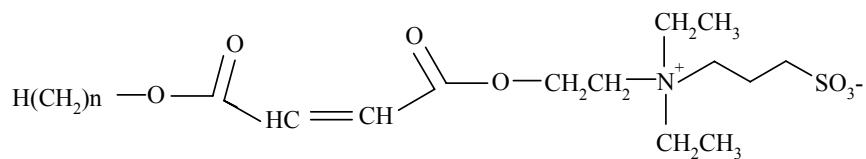
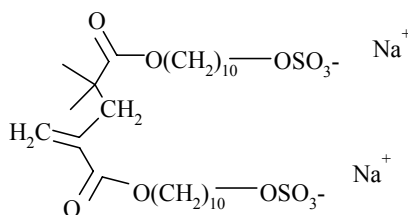
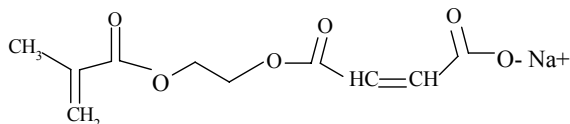
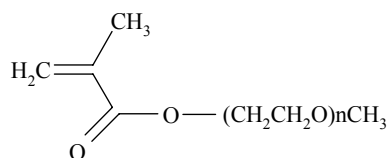
1.5.2 Tensioattivi multi funzionalizzati

Macromolecole surfattanti che incorporano nuove funzioni chimiche innestate alla molecola presenteranno una proprietà specifica all'interfaccia dove essi sono

¹⁶⁻¹⁷ Y. Chevalier, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (2002), 7, 3-11.

adsorbiti¹⁷. I nuovi gruppi funzionali introdotti nella struttura macromolecolare comportano nuove caratteristiche ed attività, tuttavia lo svantaggio che si osserva in questi casi è che sono richieste sintesi chimiche più complesse per produrre il tensioattivo desiderato¹⁸. Un'alternativa economica che impiega meno tempo consiste nel mescolare differenti molecole. I due approcci non sono equivalenti, il vantaggio di una singola macromolecola è il pieno controllo della composizione chimica al sito attivo. Così molecole multi funzionalizzate sono preferibili in formulazioni complesse lavorando in mezzi eterogenei come quelli che operano alle interfacce. Ad esempio queste nuove tipologie di tensioattivi, molto spesso, sono necessarie in caso di polimerizzazioni in emulsione, ma la presenza del surfattante nel polimero provoca molti problemi, specialmente per la loro applicazione in rivestimenti acquosi, infatti potrebbe verificarsi la lenta migrazione di tensioattivo verso la superficie del film polimerico ed il suo rigonfiamento in acqua. Questo problema può essere evitato ancorando la specie tensioattiva al latex durante la polimerizzazione in emulsione. Tensioattivi molto reattivi capaci di avviare polimerizzazioni radicaliche e copolimerizzazioni oppure andare incontro a reazioni di trasferimento di radicali, sono state studiate a questo proposito. Al fine di evitare l'omopolimerizzazione di tensidi polimerizzabili in fase acquosa, un'alta reattività in polimerizzazione radicalica associata all'attività superficiale, seppur moderata, è richiesta. Un'alternativa sono i derivati maleici che non danno luogo ad omopolimerizzazioni ma copolimerizzano con più monomeri vinilici. Tensioattivi zwitterionici mostrano stabilità colloidale molto buona in un ampio range di pH e concentrazione elettrolitica; questi ultimi non hanno porzioni idrofobiche e idrofiliche ben definite a causa della presenza del gruppo polare reattivo poco ingombrante. In figura 1.6 vengono presentate delle possibili architetture molecolari di tensioattivi funzionalizzati capaci di partecipare a processi di polimerizzazione.

¹⁸ A.M. Al-Sabagh, N.S. Ahmed, A.M. Nassar, M.M. Gabr, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, (2003), 216, 9 - 19.

**Tensioattivo zwitterionico****Tensioattivo bolaform****Tensioattivo a corta catena (simile bolaform)****Tensioattivo PEO***Figura 1.6***1.6 Caratteristiche di tensioattivi e tensioliti**

Le sostanze ad azione di superficie dotate di proprietà schiumogene, bagnanti, detergenti e solubilizzanti vengono definite tensioattivi e sotto la terminologia “tensioliti” raggruppiamo tutte le forme cosmetiche contenenti tensioattivi e destinate alla detersione della pelle e dei capelli.

I tensioattivi possono essere definiti come corpi a doppia affinità in cui la frazione idrofila ha comunque un peso predominante su quella lipofila. La frazione lipofila è abitualmente costituita da una catena di acidi grassi (C12-C14) per esempio acido miristico o laurico. Tale porzione organica della molecola risulta affine ai grassi, infatti tende a sciogliersi in essi e nelle sostanze organiche in genere, dunque riesce a bagnare le superfici unte ed in questo modo a detergere¹⁹.

La frazione idrofila è di molteplice natura chimica ad esempio carbossilica, solfonica, solfata, amminica e polietossietilenica. Queste funzioni possono essere presenti anche contemporaneamente nella stessa molecola tensioattiva.

Il primo tensioattivo usato come detergente è stato il comune sapone (sale alcalino di acido grasso). I tensioattivi si distinguono in saponi e tensioattivi sintetici (anionici, cationici, non ionici e anfoteri). In natura esistono sostanze tensioattive note come “saponine” in quanto, emulsionate con acqua, producono schiuma. Sono ben note le saponine della *Saponaria* e della *Quillaja* (*legno di Panamà*), tuttavia queste non trovano applicazione in quanto irritanti per la pelle e poco schiumogene. I tensioattivi sintetici sono quelli maggiormente impiegati per scopi puramente detergenti.

I tensioattivi vengono generalmente realizzati dalla idrofilizzazione di sostanze lipidiche. Come grasso di partenza si impiega l'olio di cocco, di palma, di palmisto, oli vegetali più pregiati e oli di derivazione animale preventivamente idrogenati.

I saponi modificati o “eterosaponi”, rispetto i saponi classici, hanno il vantaggio di non subire idrolisi alcalina e quindi di detergere la pelle senza modificare il pH cutaneo. Il prodotto di condensazione degli acidi grassi vegetali con idrolizzati proteici vegetali (soia, frumento, mais, avena) da origine ai tensioattivi lipoproteici (ad esempio: Sodium Cocoyl Hydrolyzed Soy Protein); questi sono ottenuti partendo dai cloruri degli acidi grassi e da polipeptidi vegetali. Con i suddetti composti è possibile ottenere una elegante combinazione delle caratteristiche dei derivati proteici con quelle dei sali di acidi grassi nel senso di un tenside non aggressivo.

¹⁹ F.J. Wortmann, et al., *International Journal of Cosmetic Science*, (2004), 26, 61-69.

Dal punto di vista chimico e biochimico, i tensioattivi lipoproteici sono considerati altrettanto “naturali” dei saponi, con il vantaggio di presentare nella loro molecola dei gruppi proteoderivati dotati di molta affinità verso la cute, la cui superficie è di natura eminentemente proteica. Sono altrettanto validi i tensioattivi lipoaminoacidi derivati dalla condensazione degli acidi grassi di cocco e aminoacidi di grano o di Avena (Sodium Cocoyl Wheat Amino Acids, Sodium Cocoyl Oat Amino Acids). Questi ultimi sono prodotti molto delicati e ben tollerati dalla pelle, essendo in pratica costituiti da acidi grassi e aminoacidi.

Partendo dal glutamato di sodio è stato messo a punto quello che molti ritengono il detergente più fisiologico e dermocompatibile attualmente esistente, facendo reagire i cloruri di acidi grassi con l'acido glutamico (Sodium Lauroyl Glutamate).

I tensioattivi lipoproteici e lipoamminoacidi della nuova generazione²⁰ detergono delicatamente senza irritare, possiedono elevata tollerabilità oculare e inoltre, per la parte proteica nella loro struttura, riducono l'aggressività dei tensioattivi tradizionali, come dimostra il grafico 1.1:

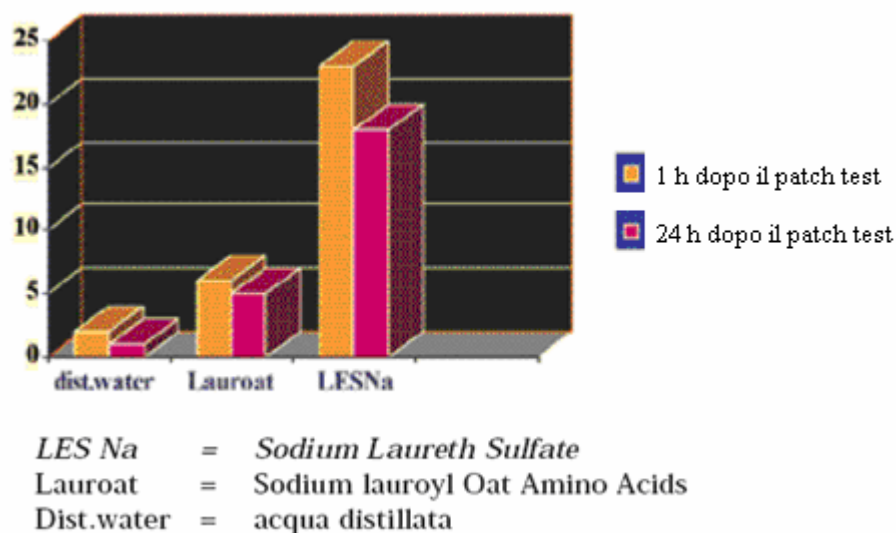


Grafico 1.1

²⁰ H. Sedghi-Zadeh, *Natural1*, (2002), anno II, num 15, 64-67.

Spesso i tensioattivi speciali e particolarmente compatibili sono stati oggetto di critica in quanto non risultano molto schiumogeni. Per alcuni di questi tensioattivi sono stati misurati i valori relativi della schiuma e da questa indagine risulta che il potere schiumogeno dei tensioattivi lipoproteici è perfettamente paragonabile a quello dei tensioattivi classici.

Da un punto di vista formulativo²¹ è bene ricordare che i tensioliti sono in maggioranza in forma fluida, talora in struttura gel trasparente o in massa cremosa - perlacea.

Le voci comprese sotto il gruppo dei tensioliti sono: shampoo, shampoo doccia, bagnoschiuma, bagno doccia, olio da bagno, detergente viso mani, detergente intimo, pediluvi e prodotti per la rasatura. I detergenti hanno come struttura portante una soluzione acquosa di uno o più tensioattivi, completata dall'aggiunta di sostanze migliorative, ausiliarie o specializzanti di vario tipo, oltre ad un adeguato sistema preservante, la necessaria dose di profumo e l'eventuale aggiunta di colore. Per trasformare il sistema da limpido ad opaco si impiegano sostanze opacizzanti soprattutto di derivazione stearica oppure, quando è richiesto un aspetto latteo, emulsioni polimeriche.

Si riporta di seguito una sintetica descrizione di tutte le classi di tensioattivi studiate.

1.6.1 Surfattanti anionici

Si tratta di molecole che presentano il gruppo idrofilo con carica negativa. I limiti d'impiego di tali composti consistono nella sensibilità verso le cariche di segno opposto (che possono favorire la precipitazione), ed al pH (potrebbe indurre la dissociazione). I tensioattivi anionici sono i più utilizzati a livello industriale.



Figura 1.7 Laurilsolfato sodico

²¹ G. Proserpio, *Tensioattivi in Cosmesi, Sinerga, Pero, (1988)*.

Hanno un forte potere detergente, emulsionante, battericida, schiumogeno ma sono molto aggressivi, può essere utile nel soggetto seborroico (per la rimozione delle squame), ma può indebolire la struttura del fusto pilifero. Fanno parte di questo gruppo i saponi, gli acidi carbossilici (a bassi valori di pH non presentano una carica negativa netta, questa aumenta proporzionalmente al pH), ma anche esteri solfonici e solfati. Questi ultimi sono caratterizzati dall'aver un nucleo solforico ($O-SO_3^-$) o solfonico ($R-SO_3^-$) legato alla catena alifatica. Il più noto fra detti esteri è il laurilsolfato sodico (SLS; fig. 1.7) o sodio dodecilsolfato. Tali saponi solfonici non risentono come gli altri del pH e della durezza delle acque (vanno bene anche con acqua di mare) in quanto tanto l'acido che la base da cui sono formati, sono forti.

Anche i tensioattivi solforati sono composti anionici, consistono in alcani o alchilaril solfonati; nel secondo caso, la catena alchilica (3 o 7 atomi di carbonio) legata all'anello permette di equilibrare le caratteristiche altrimenti scarsamente lipofile dell'anello aromatico.

1.6.2 Surfattanti cationici

Sono composti caratterizzati da un gruppo idrofilo recante carica positiva ed hanno limiti analoghi ai tensioattivi anionici. Questi composti non presentano una carica positiva netta a pH elevato, mentre aumenta col diminuire del pH²².

I cationici sono molto importanti in quanto la loro attività come tensioattivi produce anche un'azione disinfettante, tuttavia sono aggressivi e possono sensibilizzare la cute. Queste sostanze, fissandosi all'interfase tra la superficie della cellula batterica ed il liquido extracellulare, modificano la permeabilità della membrana producendo una lisi parziale, con conseguente liberazione di materiale endocellulare. Un esempio di questa classe di tensioattivi è in figura 1.8.

²² M.V. de Paz Bãñez, K.L. Robinson, M. Vamvakaki, S.F. Lascelles, S.P. Armes, *Polymer*, (2000), 41, 8501–8511.

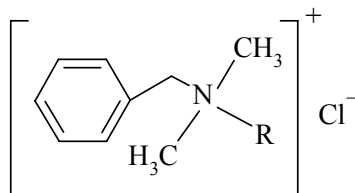


Figura 1.8 Benzalconio cloruro

1.6.3 Surfattanti non ionici

Questa categoria di tensioattivi deriva dall'associazione della porzione apolare ad una funzione non ionizzabile ma con caratteristiche polari, pertanto il gruppo idrofilo non presenta una carica netta, come ad esempio il sorbitolo con acidi grassi. Hanno forte potere emulsionante, ma possono favorire lo sviluppo di batteri se sono già presenti sul cuoio capelluto.

I surfattanti non ionici possono essere ulteriormente classificati in funzione della loro struttura chimica.

- 1) Eteri: presentano una catena poliossietilenica ($R-O-(CH_2CH_2O)_n-H$) direttamente legata alla catena apolare, oppure con interposto un nucleo aromatico.
- 2) Esteri: contengono una catena poliossietilenica ma con una funzione carbossilica invece che alcolica; un esempio di questa categoria è il glicerilmonostearato che, più propriamente, si definisce un poliolio. Altri polioli sono gli exitani, nei quali il tensioattivo si forma esterificando gli ossidrili con acidi grassi. I più noti tensioattivi di questo tipo sono gli *SPAN* (sorbitan-mono-oleato, sorbitan-mono-stearato, sorbitan-mono-palmitato, sorbitan-di-oleato, ecc). Tali composti sono individuati tramite numeri (ad esempio: SPAN 20, 40, 60, 80) che stanno ad indicare la presenza di una o due catene di acido grasso ed il tipo di acido grasso in questione. Sempre tra i tensioattivi con legame estere, troviamo composti in cui la parte idrofila è costituita da uno zucchero esterificato con un acido grasso; si ottengono così tensioattivi con sapore meno sgradevole e adatti per alimenti e preparazioni farmaceutiche orali.
- 3) Eteri-Esteri: sono composti simili agli SPAN, dove gli ossidrili non impegnati vengono condensati con ossido di etilene, formando quindi un legame etere oltre a quello estere tipico degli SPAN (fig. 1.9). Queste sostanze note come

polisorbati (denominazione derivante dalla contrazione del nome chimico *poliossi-etilen-sorbitan-mono-stearato*) prendono il nome commerciale di *TWEEN*, sono gli unici a poter essere usati per preparazioni iniettive in quanto non pirogeni, non emolitici, non irritanti. Anche per i *TWEEN* vale la catalogazione in base ai numeri 20, 40, 60, 80, inoltre troviamo anche numeri intermedi (quali 21, 43, ecc.) per indicare la presenza o meno di una seconda catena di acido grasso apolare ed un numero "n" relativo alla/e catene poliossietileniche.

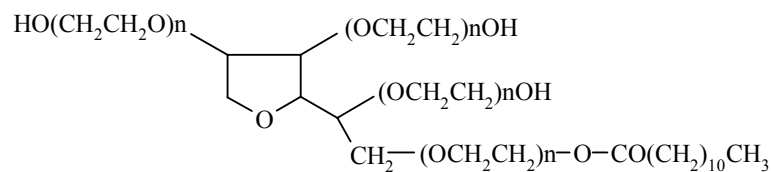


Figura 1.9 Sorbitan (20)OE monolaurato

4) Copolimeri tra poliossietilene e poliossipropilene: PEG-PPG-PEG = Pluronic, PPG-PEG-PPG = Poloxaleni; questi tensioattivi (PEG = polietilenglicoli, PPG = polipropilenglicoli) hanno notevole affinità per la fase acquosa e vengono utilizzati per scopi particolari, come ad esempio, per ottenere detersivi a "schiuma frenata" per lavatrici.

1.6.4 Surfattanti anfoteri

In questo caso la carica elettrica del gruppo idrofilo cambia al variare del pH. La carica è positiva in ambiente acido, mentre diventa negativa in ambiente alcalino. Tensioattivi anfoteri sono i composti betainici ed imidazolici. Hanno un buon potere detergente ed emulsionante pur essendo meno aggressivi degli altri. In particolar modo i betainici (si riportano in figura 1.10 delle strutture caratteristiche), specie se tamponati con acido lattico, sono particolarmente rispettosi dello strato idrolipidico. Sono inoltre battericidi e producono schiuma.

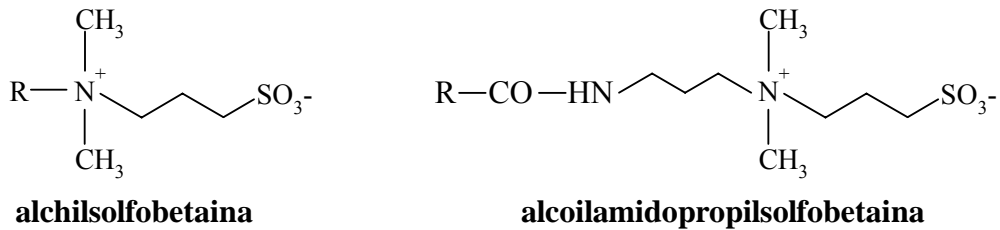


Figura 1.10

1.7 Proprietà dei tensioattivi

Con il termine tensioattivi si identifica un gran numero di strutture caratterizzate dalla proprietà fondamentale di abbassare la tensione superficiale tra olio e acqua, ciò rende le sostanze grasse dispersibili in mezzo acquoso e, conseguentemente, lavabili. Tale comportamento è dovuto al fatto che le molecole surfattanti hanno dei gruppi polari e gruppi non polari contrapposti i quali permettono al tensioattivo di disporsi tra acqua e olio, ciò riduce la tensione superficiale all'interfaccia e rende il sebo disperdibile in acqua. I tensioattivi sono composti largamente impiegati anche per la detergenza di superfici biologiche, tuttavia bisogna tenere presente che possono essere più o meno aggressivi nei confronti della pelle, in quanto rimuovono lo sporco, ma spesso allontanano anche altre sostanze positive e protettive per la nostra pelle. La detersione della pelle, dei capelli e del cuoio capelluto è necessaria per asportare lo sporco (forfora, polvere, sebo, sudore) e per esigenze estetiche, ma qualsiasi detergente usato deve rispettare il fattore di idratazione naturale (N.M.F.) e lo strato idrolipidico. Si riportano a questo punto le numerose attività dei tensioattivi.

1.7.1. Abbassamento della tensione superficiale

La molecola d'acqua presenta una polarizzazione negativa a livello dell'ossigeno e positiva a livello dell'idrogeno, ciò fa sì che l'ossigeno di una molecola attragga l'idrogeno di un'altra molecola, si crea un legame dipolo-dipolo detto legame idrogeno. Una molecola all'interno di un liquido subisce attrazioni simmetriche da parte delle molecole che la circondano, mentre le molecole che si trovano sulla superficie, sono attratte solo verso l'interno del liquido e l'area superficiale del liquido tende ad un valore minimo. Questo comportamento spiega la forma sferica delle gocce di un liquido. La tensione superficiale è la misura di questa forza di

superficie che agisce verso l'interno, forza che deve essere superata per espandere l'area superficiale.

La tensione superficiale dipende sia dalla natura delle sostanze, e cioè dalla struttura delle molecole che le costituiscono, sia dalla temperatura e dalla pressione. Con l'aumentare della temperatura la tensione superficiale dei liquidi diminuisce, fino ad annullarsi alla temperatura critica del liquido considerato, oltre la quale, esso può esistere solo allo stato gassoso (al di sotto di questa temperatura esiste invece il vapore, aeriforme condensabile per semplice aumento di pressione).

I tensioattivi abbassano la tensione superficiale dell'acqua attenuando o rompendo i legami idrogeno in quanto la testa polare si dispone verso l'interno e quella apolare verso l'esterno.

1.7.2 Azione schiumogena

Le molecole di tensioattivo tendono ad accumularsi alla superficie del liquido con la parte polare rivolta verso l'interno e la parte idrocarburica rivolta verso l'esterno; questo determina un abbassamento della tensione superficiale in quanto le forze intermolecolari che agiscono tra le catene idrocarburiche sono più deboli rispetto a quelle tra le molecole d'acqua. Di conseguenza le forze che impediscono alla superficie di ampliarsi vengono meno, per cui risulta facilitata la formazione di schiuma, che consiste appunto in un aumento, per mezzo dell'agitazione meccanica, della superficie libera del liquido che può così inglobare quantità notevoli di aria sotto forma di bolle. Le bolle di gas vengono a galla per spinta idrostatica e si dissolvono lentamente a contatto con l'ambiente gassoso esterno. Esse concorrono alla detergenza inglobando lo sporco, ma un eccessivo schiumaggio provoca inconvenienti facilmente verificabili soprattutto nell'allestimento di una formulazione cosmetica.

1.7.3 Azione bagnante (umettante)

Il fenomeno della bagnabilità, riveste significativa importanza nella cosmetica, in particolar modo nella preparazione di prodotti reidratanti, in quanto il composto deve stendersi e lasciare una sensazione d'idratazione della pelle, di fresco, di

bagnato; il più delle volte la pelle non è stata reidratata ma è ricoperta da una pellicola che trattiene l'acqua sulla sua superficie.

Se mettiamo delle gocce d'acqua su di una superficie ricoperta da teflon (materiale antiaderente) queste scivolano su di essa senza espandersi ossia senza bagnare la superficie. Se aggiungiamo del detersivo l'acqua si espande sulla superficie bagnandola e ciò è dovuto all'abbassamento della tensione superficiale dell'acqua grazie al tensioattivo che fa da collegamento fra un materiale apolare (il teflon) ed uno polare (l'acqua). Teniamo presente che con opportuni tensioattivi già a concentrazioni dello 0.01% la tensione superficiale dell'acqua viene ridotta del 70%.

1.7.4 Attività emulsionante

Un'emulsione è la finissima dispersione di un liquido in un altro, nel quale è insolubile; le emulsioni sono sistemi dispersi, cioè eterogenei, costituiti da due fasi liquide immiscibili tra loro.

I tensidi favoriscono la formazione di emulsioni, in quanto, abbassando la tensione interfacciale tra i due liquidi, permettono che si estenda la superficie di contatto fra le due fasi, con formazione di un gran numero di goccioline di uno dei due liquidi disperse nell'altro²³.

1.7.5 Potere detergente

È un fenomeno strettamente collegato ai precedenti. La detergenza è quell'operazione mediante la quale viene allontanato dai tessuti (o dalla superficie di altri materiali, anche biologici) lo sporco che vi si accumula soprattutto a causa di un velo di grasso che aderisce fortemente sulla parte da pulire. Il meccanismo della detergenza è piuttosto complesso in quanto ad esso concorrono diversi fattori, e precisamente: l'azione meccanica, della temperatura e l'azione del detergente. L'azione del detergente è dovuta all'abbassamento della tensione interfacciale tra i due liquidi (l'acqua di lavaggio e il grasso aderente sul tessuto) e di quella tra l'acqua di lavaggio e la superficie da pulire: questo determina una modifica dell'angolo di contatto grasso-solido, la parte grassa tende a rigonfiarsi e

²³ X. Li, H. Kunieda, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, (2003), 8, 327–336.

a sollevarsi intorno ai margini per la diminuzione delle forze di adesione tra le due fasi; quando l'angolo diventa maggiore di 90° , è possibile il distacco delle particelle di unto dalla superficie. La spiegazione di tale effetto risiede nella particolare azione del tensioattivo, che si dispone con la parte idrofoba nell'unto in cui è solubile la catena idrocarburica e con il gruppo idrofilo nella fase acquosa: in questo modo diventa possibile distaccare dalla superficie dell'oggetto da detergere la sporcizia grassa che, intrappolata nelle micelle, rimane dispersa nell'acqua di lavaggio ed infine allontanata per azione meccanica.

L'azione favorevole della temperatura sul meccanismo della detergenza può essere spiegata se si tiene conto che la tensione superficiale dei liquidi diminuisce all'aumentare della temperatura.

1.7.6 Potere battericida

In generale, i tensioattivi hanno azione battericida (variabile a seconda che agiscano su Gram+ o Gram-) ma non sporicida. Molto efficaci sono i tensioattivi cationici e quelli clorurati. Un indice convenzionalmente usato per evidenziare il potere battericida dei tensioattivi è il “*valore di diluizione*”, ovvero il livello di diluizione di una soluzione di un tenside che risulta necessario per uccidere il batterio; maggiore è tale valore maggiore è il potere battericida del prodotto.

1.8 Composti dell'ammonio quaternario

Composti largamente usati nell'industria farmaceutica e cosmetica per la loro struttura chimica e per la spiccata azione disinfettante sono i quaternari d'ammonio, chiamati anche quaternari o QUAT (QAS). I composti dell'ammonio quaternario sono tensioattivi cationici, le loro caratteristiche chimico-strutturali ne definiscono l'impiego e dipendono dal tipo e dal numero di radicali alchilici e arilici presenti nella molecola²⁴. I più impiegati a livello industriale sono: Benzalconio cloruro e Cloruro di dimetildidecilammonio. Fanno parte di questo gruppo anche il benzoxonio e la cetrimide.

Come tensioattivi cationici possiedono le seguenti proprietà: riducono la tensione superficiale nel punto d'assorbimento; sono prontamente attratti e rapidamente

²⁴ R. Enomoto et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2007), 1095, 1–6.

assorbiti su superfici che abbiano carica elettrica negativa (lana, vetro, proteine, batteri, capelli, etc.); formano aggregati ionici o micelle con concomitanti variazioni nella conducibilità elettrica, tensione superficiale e solubilità.

Come disinfettanti possiedono le seguenti proprietà antimicrobiche²⁵: effetto denaturante, complessante e precipitante sulle proteine; effetti sulle reazioni metaboliche, con particolare azione sulla respirazione aerobica e anaerobica del glucosio in vari batteri e sull'ossidazione del lattato in alcuni batteri; effetti sulla permeabilità cellulare (citolisi e perdita di fosforo; danno di membrana e perdita di potassio); effetto sull'enzima che mantiene dinamica la membrana citoplasmatica; interazione con l'intera cellula microbica; effetto collassante sulla forza motrice protonica attraverso cortocircuitazioni della membrana citoplasmatica²⁶ (flusso inverso di protoni attraverso la membrana stessa); queste caratteristiche li rendono adatti alla formulazione di prodotti ad attività detergente e disinfettante combinata, l'elevato potere schiumogeno ne ostacola il risciacquo. In funzione della concentrazione presentano differenti azioni, come mostrato in tabella 1.2:

<u>CONCENTRAZIONE</u>	<u>ATTIVITA'</u>
BASSA	<ul style="list-style-type: none"> - azione batteriostatica - inibizione della crescita delle alghe e dei micobatteri - inibizione del fenomeno della escrescenza delle spore
MEDIA	<ul style="list-style-type: none"> - azione battericida - alghicida - fungicida - azione di rilievo verso i virus lipofilici

²⁵ B. Gao, X. Zhang, Y. Zhu, *J Biomater Sci Polym Ed.* (2007), 18(5), 531-44.

²⁶ S. Lenoir, C. Pagnoulle, C. Detrembleur, M. Galleni, R. Jérôme, *Journal of Polymer Science: Part A*, (2006), Vol. 44, 1214–1224.

<u>CONCENTRAZIONE</u>	<u>ATTIVITA'</u>
ELEVATA	- nessuna azione sporicida, micobattericida - nessuna azione verso i virus idrofilici

Tabella 1.2

È opportuno evidenziare che i composti quaternari risultano attivi sui Gram+ e muffe, poco nei confronti dei Gram- (soluzioni di composti d'ammonio quaternario troppo diluite o non recenti possono favorire la crescita di batteri Gram-); mediamente sui virus e nulli sulle spore, i micobatteri e lo *Pseudomonas aeruginosa*; contro i G + sono più efficaci a 120-130 ppm in ambiente alcalino; alcuni psicrofili (ad esempio: nelle vasche di raffreddamento del latte crudo alla stalla) possono manifestare una certa resistenza ai composti d'ammonio quaternario. I QUAT manifestano la loro attività sia in ambiente acido che alcalino, con maggiore attività in soluzioni alcaline; la concentrazione d'uso dipende dalla specifica struttura chimica di ogni composto, l'efficacia aumenta con l'aumentare della lunghezza della catena ($> C_{12-14}$); in generale tali prodotti si dimostrano più attivi in soluzione alcolica che in soluzione acquosa.

1.9 Applicazione dei composti quaternari come biocidi

L'attacco di polimeri da parte di batteri, funghi e altri microrganismi si manifesta attraverso la perdita di proprietà meccaniche, degradazione della superficie, decolorazione, macchie e alterazioni delle caratteristiche estetiche dei polimeri in questione a causa di reazioni di varia natura²⁷, generalmente di tipo idrolitico, causate dai metaboliti prodotti dai microrganismi. Particolarmente sensibili all'attacco di microrganismi sono le emulsioni acquose, le dispersioni ed i materiali con una o più componenti di origine naturale²⁸.

²⁷ G. Sauvet, S. Dupond, K. Kazmierski, J. Chojnowski, *J. Appl. Polym. Sci.*, (2000), 75, 1005.

²⁸ A. Böhringer, J. Rupp, A. Yonenaga, *ITB International Textile Bulletin*, (2000), 5, 12.

Nel caso in cui il materiale polimerico sia il costituente di un rivestimento superficiale (ad esempio protettivo, vernice, prodotto di rifinizione) l'aggiunta di un biocida in fase di formulazione risulta essere il sistema più consueto per prevenire la colonizzazione dei polimeri da parte dei microrganismi. Nel caso in cui la specie ad attività biocida non sia legata chimicamente al polimero, il suo rilascio può essere un pericolo per l'ambiente, inoltre l'effetto protettivo è limitato nel tempo. Fissare il biocida sullo scheletro polimerico attraverso un legame idrolizzabile provoca soltanto un miglior controllo della durata ed efficacia dell'effetto biocida, ma non risolve il problema della tossicità. I sali di ammonio quaternari, ed in particolare quelli con un sostituente a lunga catena alchilica avente almeno otto atomi di carbonio, sono noti da molto tempo come biocidi attivi in acqua.

È noto che i QAS esercitano la loro attività biocida per interazione con la parete cellulare dei batteri²⁹ (fig. 1.11). La rottura della membrana citoplasmatica, seguita dal rapido rilascio di ioni K^+ e altri costituenti citoplasmatici è lo stadio cruciale nell'azione biocida di queste specie anfifiliche cationiche.

Il meccanismo di azione non è noto con precisione, tuttavia l'importanza della loro interazione con le specie cariche negativamente presenti nella membrana, come i fosfolipidi acidi e le proteine di membrana, è già stata riportata in letteratura³⁰.

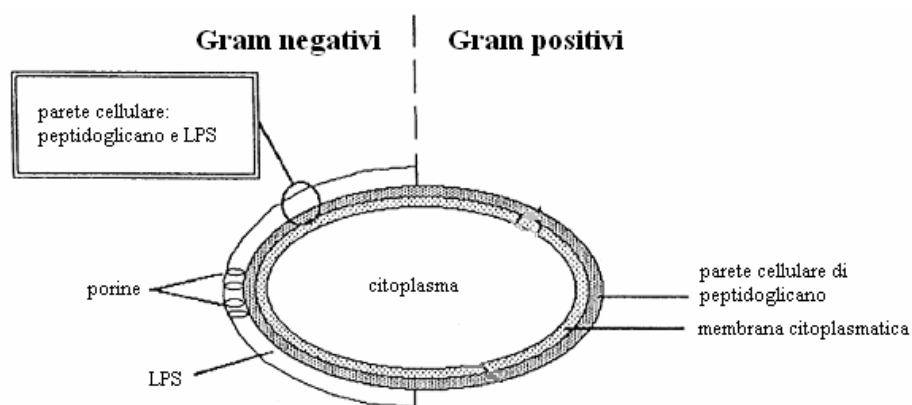


Figura 1.11

²⁹ S.P. Denyer, G.S.A.B. Stewart, *International Biodeterioration & Biodegradation*, (1998), 41, 261.

³⁰ T. Ikeda, S. Tazuke, *Makromol. Chem.*, (1984), 185, 869.

Nella ricerca di biocidi non pericolosi per l'ambiente sono stati studiati prodotti biocidi costituiti da QAS legati covalentemente ad un polimero. Polimeri solubili che portano QAS sono stati trovati essere biocidi più attivi dei monomeri corrispondenti, questa evidenza sperimentale può essere spiegata dalla maggiore densità di carica locale sul polimero che rende l'interazione con la parete cellulare più efficace. A causa dell'alta densità di carica, i polielettroliti sono capaci di interagire fortemente con cariche opposte. I polimeri interagiscono quindi più fortemente con la membrana citoplasmatica di quanto facciano i corrispondenti cationi monometrici.

1.9.1 Meccanismo dell'azione antibatterica

La sequenza degli avvenimenti elementari nell'azione biocida dei sali d'ammonio quaternari³¹ può essere schematizzata come segue:

- adsorbimento sulla superficie della cellula batterica
- diffusione attraverso la parete cellulare
- assorbimento sulla membrana citoplasmatica
- rottura della membrana citoplasmatica
- perdita dei costituenti citoplasmatici
- morte della cellula

È ben noto che la superficie della cellula batterica è di solito carica negativamente, come evidenziato dalla sua suscettibilità all'elettroforesi³². L'adsorbimento di polimeri sulla superficie colloidale carica negativamente è ovviamente facilitata dall'effetto cooperativo rispetto ai cationi monomerici. È quindi ragionevole assumere che nei processi elementari la cinetica del primo stadio sia molto aumentata per i polimeri in confronto a quella per i monomeri.

Per quanto riguarda il secondo stadio, va considerato che c'è molta differenza nella struttura delle pareti cellulari tra batteri Gram-positivi e Gram-negativi³³. I

³¹ R. Yeaman and N.Y. Yount, *Pharmacol. Rev.*, Vol. 55, (2003), 27–55.

³² J.P. Powers and R.E.W. Hancock, *Peptides*, Vol. 24, (2003), 1681–1691.

³³ R.E.W. Hancock, D.S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 43, (1999), 1317–1323.

primi hanno una struttura della parete cellulare semplice; fuori dalla membrana citoplasmatica c'è solo uno strato rigido di peptidoglicano che dota le cellule batteriche delle ben note forme di cocci, bacilli, ecc. Lo strato di peptidoglicano, benché relativamente spesso, è composto da reticoli porosi, che permettono a molecole di dimensioni non eccessivamente grandi di penetrare all'interno della cellula senza difficoltà. Infatti anche i polimeri con pesi molecolari relativamente bassi si ritiene possano diffondere facilmente attraverso le pareti della cellula dei batteri Gram+. D'altra parte, i batteri Gram- hanno pareti cellulari molto più complesse, comprendenti una seconda membrana fuori dello strato di peptidoglicano, chiamata membrana esterna, la cui struttura è simile a quella della membrana citoplasmatica. A causa della struttura a doppio strato, la membrana esterna è una potenziale barriera contro molecole esterne ad alto peso molecolare³⁴.

Generalmente, più alto è il peso molecolare e più difficile risulta la diffusione attraverso la parete cellulare, in particolare nei batteri Gram-.

Sono stati proposti più modelli³⁵ per spiegare il meccanismo d'azione dei QAS sui batteri G-; uno schema riassuntivo si riporta in figura 1.12.

È ipotizzabile che tali composti si associno alla membrana esterna del batterio caricata negativamente attraverso:

- la neutralizzazione delle cariche presenti su una zona di tale superficie
- la forte interazione con il catione bivalente che lega i siti sui lipopolisaccaridi (LPS).

³⁴ J.M. Sanderson, *Org. Biomol. Chem.*, Vol.3, (2005), 201–212.

³⁵ A. Giuliani, G. Pirri, S. F. Nicoletto, *Central European Journal of Biology*, (2007), 2(1), 1–33.

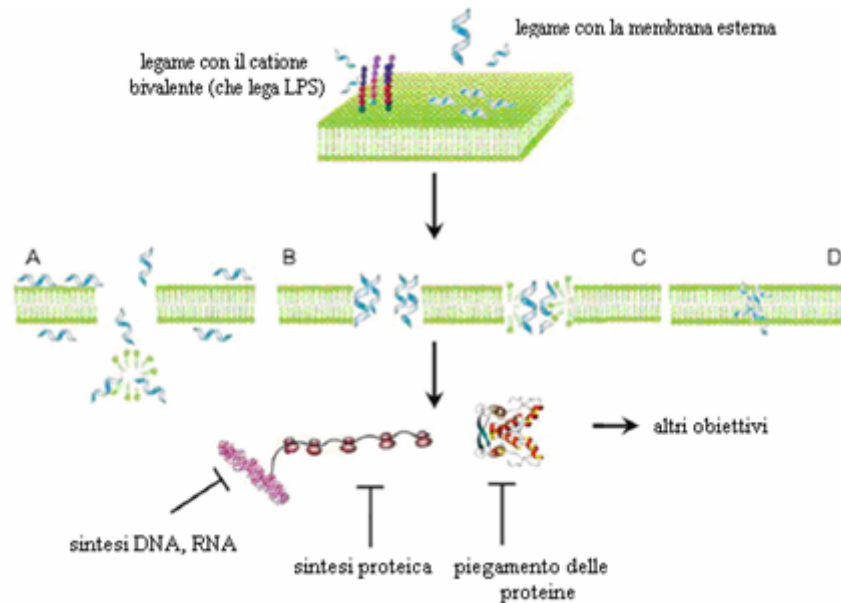


Figura 1.12

I modelli proposti per spiegare il meccanismo di permeabilizzazione della membrana sono nominati come:

- A) tappeto³⁶
- B) doga di botte
- C) foro a vite
- D) canali aggregati

Con tutti i meccanismi sopra citati il risultato che si osserva consiste nella traslocazione nel citoplasma di alcuni monomeri, i quali ostacolano la vita della cellula batterica in vari modi. Questi ultimi possono legarsi a polianioni cellulari come DNA ed RNA, inibire l'attività enzimatica, la sintesi proteica, la funzione delle unità *chaperone* che assistono il piegamento delle proteine, infine anche la sintesi del peptidoglicano.

³⁶ Y. Shai and Z. Oren, *Peptides*, Vol. 22, (2001), 1629–1641.

Dunque i polimeri, sebbene potenzialmente più attivi degli analoghi composti a basso peso molecolare in quanto vengono meglio adsorbiti sulla membrana citoplasmatica, sono tuttavia svantaggiati nella diffusione attraverso le pareti della cellula, specialmente per quanto concerne i batteri Gram-. Di conseguenza, l'efficacia dei polimeri, teoricamente maggiore di quella dei QAS a basso peso molecolare è di fatto regolata dalle proprietà di trasporto e/o diffusione attraverso la parete cellulare.

CAPITOLO II

NUOVI SISTEMI POLIMERICI A BASE DI AMMINOACIDI FUNZIONALIZZATI

2.1 Premessa

Gli amminoacidi sono delle molecole biologiche presenti in tutti gli organismi indifferentemente dal loro livello di complessità. È pensabile che nessun altro tipo di molecola biologica potrebbe esplicare tutte le funzioni che gli amminoacidi hanno accumulato attraverso miliardi di anni di evoluzione. Le loro azioni sono molteplici e riguardano diversi ambiti, ad esempio costituiscono delle riserve di energia degradabili in momenti di carenza di risorse nell'organismo, oppure rivestono il ruolo di segnalatori biochimici e, ancora più importante, sono i costituenti principali delle proteine. Le proteine costituiscono la base strutturale e funzionale di tutti i sistemi viventi; tali complesse macromolecole esibiscono una notevole diversità funzionale che permette loro di svolgere una miriade di attività fondamentali per la vita.³⁷

Come il nome stesso suggerisce, gli aminoacidi sono molecole aventi sia un gruppo funzionale amminico (NH_2) che carbossilico (COOH).

La funzione amminica, in particolare, può essere presente sia sul carbonio α che sul carbonio β tuttavia, in natura, gli aminoacidi costituenti le proteine sono presenti nella loro forma α .

Tutti gli aminoacidi hanno una struttura in comune alla quale si lega il residuo che caratterizza l'aminoacido stesso. La struttura fissa è rappresentata da un carbonio tetraivalente che lega un carbossile ed un'ammina, in addizione ad un idrogeno.

Il residuo può essere polare, apolare oppure carico in base alla struttura molecolare. Pertanto possiamo vedere gli amminoacidi come degli ioni dipolari (zwitterioni) in quanto molecole capaci sia di accettare protoni che donarli.

Il lavoro di seguito esposto è partito dallo studio preliminare di una serie di amminoacidi per poi incentrarsi sulla possibilità di modificare chimicamente gli

³⁷ T.M. Devlin, *Textbook of biochemistry with clinical correlation*, IV edition, 26.

amminoacidi più opportuni al fine di coinvolgerli in processi di polimerizzazione. I materiali polimerici ottenuti in seguito ai processi sintetici sperimentati sono finalizzati a versatili applicazioni sia in ambito farmaceutico che in campo cosmetico.

2.2 Caratteristiche degli amminoacidi neutri

La glicina (Gly; fig. 2.1; tab. 2.1) è un amminoacido neutro, a catena non polare. È il più semplice dei 20 amminoacidi ordinari poichè il suo gruppo laterale consiste solo in un atomo di idrogeno. Avendo due atomi di idrogeno legati all'atomo di carbonio α non è chirale³⁸. A causa del suo ridotto gruppo laterale, presenta minimo ingombro sterico pertanto può inserirsi in molti spazi a differenza degli altri amminoacidi. Ad esempio, solo la glicina può essere l'amminoacido interno di un'elica di collagene.

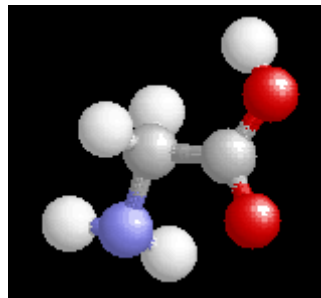


Figura 2.1 Gly

La maggior parte delle proteine è costituita da piccole quantità di glicina. Una notevole eccezione è il collagene, di cui invece ne costituisce circa un terzo. L'evoluzione ha preservato la glicina³⁹ per molto tempo in alcune posizioni di alcune proteine (ad esempio nel citocromo C, nella mioglobina e nell'emoglobina), dato che la sua mutazione ad un amminoacido più ingombrante potrebbe portare ad un'alterazione consistente della struttura della proteina. Sulla base di simulazioni condotte al computer ed esperimenti di laboratorio, si

³⁸ T.M. Devlin, *Textbook of biochemistry with clinical correlation*, IV edition, 30.

³⁹ G. Berger, *Medical Hypotheses*, (2003), 61(5-6), 586-592.

ipotizza che la glicina si sia formata per esposizione alla luce ultravioletta di ghiaccio d'acqua contenente semplici molecole organiche (metano, ammoniaca). Per quanto riguarda le funzioni fisiologiche è opportuno evidenziare che la glicina è un neurotrasmettitore inibitorio nel sistema nervoso centrale, specialmente attivo nel midollo spinale. Quando i recettori della glicina sono attivati, gli ioni cloruro entrano nel neurone che, in tal modo, subisce una *iperpolarizzazione* per la quale la cellula tende a rimanere in uno stato inibito. La *strychnina*⁴⁰, un farmaco convulsante, agisce bloccando i recettori della glicina. La glicina è anche un agonista dei glutammati per l'attivazione dei recettori dell'NMDA.

Caratteristiche generali	
<u>Formula bruta</u> o molecolare	C ₂ H ₅ NO ₂
<u>Massa molecolare</u> (uma)	75,07
<u>Aspetto</u>	solido cristallino bianco
Proprietà chimico-fisiche	
<u>Temperatura di fusione</u> (K)	505 (232°C) con decomposizione
<u>Costante di dissociazione acida</u> a 293 K	pK ₁ : 2,35 pK ₂ : 9,78
<u>Punto isoelettrico</u>	6,06
<u>Solubilità</u> in <u>acqua</u>	225 g/l a 293

Tabella 2.1

Per il seguente lavoro di tesi è stato scelto tale molecola come materiale di partenza in quanto, dopo la sua comparazione con gli altri amminoacidi, la glicina è risultata decisamente idonea grazie alle piccole dimensioni e alla natura neutra della catena laterale⁴¹. Dunque la glicina si configura come un materiale versatile,

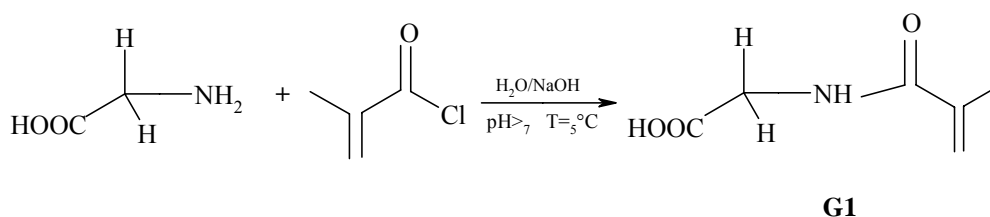
⁴⁰ C. Casella, V. Taglietti, *Principi di fisiologia*, (1996), vol II, 167.

⁴¹ G.L. Perlovich, L.K. Hansen, A. Bauer-Brandl, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, (2001), vol 66, 699-715.

ben indicato per le applicazioni sperimentali in seguito a derivatizzazione. Nei nostri esperimenti è stata coinvolta anche un'altra struttura: si tratta della diglicina, un dipeptide costituito da due residui di glicina. Anche la diglicina (Gly-Gly) ha subito processo di funzionalizzazione ed è stata in seguito polimerizzata.

2.3 Processo di funzionalizzazione dell'amminoacido glicina

L'amminoacido glicina è stato funzionalizzato applicando la reazione di *Schotten-Baumann*⁴² (schema 2.1), quest'ultima prevede che il substrato venga disciolto in una soluzione acquosa di NaOH 1 M. A solubilizzazione avvenuta è stata aggiunta una quantità equimolare di cloruro di metacrilile ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COCl}$), in tal modo si genera il monomero N-metacrililglicina (NMGly) corrispondente alla sigla G1.



Schema 2.1

Affinché la derivatizzazione vada a buon fine è necessario sottoporre la miscela di reazione ad una forte agitazione magnetica fissando la temperatura del sistema a 5°C; la reazione va a completezza nell'arco di 3 ore. È importante sottolineare che durante il corso del processo è strettamente necessario tenere sotto controllo il pH in quanto potrebbe incorrere in consistenti variazioni che sfociano nell'acidità. La presenza di acido nell'ambiente di reazione potrebbe compromettere il buo esito della reazione in quanto comporterebbe la protonazione della funzione amminica dell'amminoacido impedendo in tal modo l'attacco nucleofilo di quest'ultimo sull'acile del cloruro di metacrilile.

⁴² B.S. Furniss, A.J. Hannaford, V. Rogers, P.W.G. Smith, A.R. Tatchell, *Vogel Chimica Organica Applicata*, (1988), 718-720.

L'abbassamento del pH è dovuto alla formazione di HCl nella miscela di reazione. È possibile evitare tale inconveniente lavorando con un eccesso di soluzione acquosa di NaOH capace di tamponare le eventuali oscillazioni di pH.

Il composto di sintesi (G1) viene recuperato mediante un'estrazione a più tempi fino ad ottenere un solido cristallino bianco.

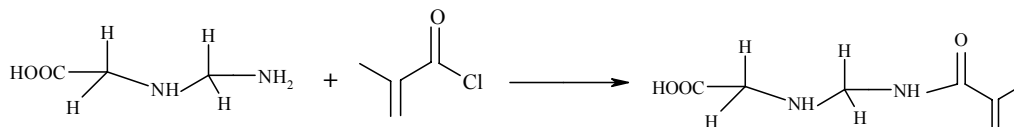
I dati sperimentali si riportano in tabella 2.2.

Gly	CH ₂ =C(CH ₃)COCl	NaOH (1 M)	T	sigla
g	ml	ml	°C	Prodotto
2	2,56	80	5	G1

Tabella 2.2

2.4 Diglicina derivatizzata

Il processo di funzionalizzazione del dipeptide diglicina si svolge in maniera analoga a quanto descritto per la glicina. Riportiamo di seguito lo schema di reazione (sch. 2.2) e i dati sperimentali (tab. 2.3) che conducono alla sintesi del monomero N-metacriloidiglicina (G2).



Schema 2.2

G2

Anche G2 si presenta come materiale solido di colore bianco che mostra una lieve tendenza all'igroscopia.

Gly-Gly	CH ₂ =C(CH ₃)COCl	NaOH (1 M)	T	sigla
mg	ml	ml	°C	Prodotto
2	1,46	40	5	G2

Tabella 2.3

2.5 Glicina e diglicina metacrilata nel processo di polimerizzazione radicalica

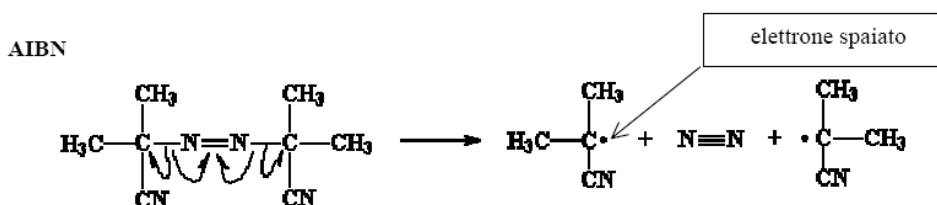
Il passaggio successivo di questo lavoro di tesi è stato copolimerizzare i monomeri G1 e G2, precedentemente funzionalizzati, con opportuni comonomeri al fine di ottenere polimeri idrosolubili e biocompatibili

2.5.1 Processo di polimerizzazione radicalica

La strategia di sintesi per ottenere i polimeri da noi progettati prevede lo sviluppo di una reazione di poli-addizione radicalica.

La polimerizzazione radicalica prevede un meccanismo di crescita a catena che ha inizio con la generazione di radicali primari in seguito alla scissione di un opportuno iniziatore⁴³. Questi radicali andranno poi a reagire con le funzioni metacriliche presenti sulle molecole di glicina determinandone la reticolazione progressiva.

Si usano come iniziatori molecole che si decompongono in modo che la coppia di elettroni del legame che viene scisso si separi. Quando si verifica questa scissione, rimangono due frammenti della molecola originaria, denominati frammenti di iniziatore, ognuno dei quali ha un elettrone spaiato (sch. 2.3a; 2.3b). Le molecole come queste vengono dette radicali liberi e sono molto reattive, dal momento che cercano di formare un nuovo legame chimico per accoppiare l'elettrone spaiato⁴⁴. Gli iniziatori più comuni sono: il persolfato di ammonio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$, l'AIBN (2,2'-azo bisisobutirronitrile; scema 2.3a), ed i perossidi (composti che vanno incontro a processi redox come nel caso del perossido di benzoile o del butilidroperossido; schema 2.3b).

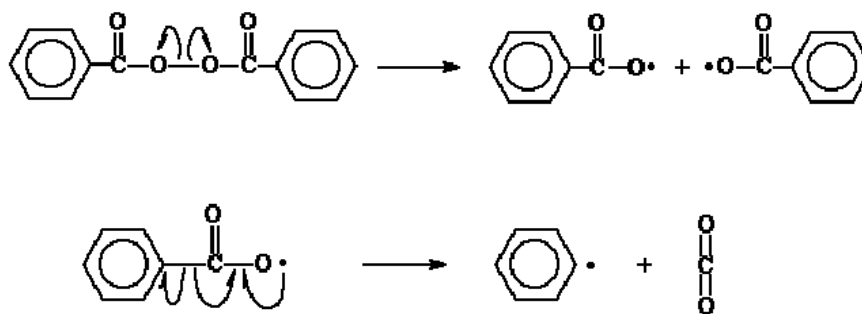


Schema 2.3a

⁴³ Iemma F, Spizzirri U G, Puoci F, Muzzalupo R, Trombino S, Picci N, *Drug Delivery*, (2005), **12**, 179-184.

⁴⁴ B.S. Furniss, A.J. Hannaford, V. Rogers, P.W.G. Smith, A.R. Tatchell, *Vogel Chimica Organica Applicata*, (1988), 646.

PEROSSIDI



Schema 2.3b

Il doppio legame covalente insaturo carbonio-carbonio in un gruppo polimerizzabile (come la funzione metacrilica) viene facilmente attaccato dal radicale libero. Ciò porta alla rottura del doppio legame C-C ed alla formazione di un nuovo legame tra il frammento di iniziatore ed uno degli atomi di carbonio del doppio legame della molecola di monomero. L'atomo di C del monomero che non si è legato all'iniziatore ha ora un elettrone spaiato, in questo modo si è generato un nuovo radicale libero che reagirà in modo analogo al frammento di iniziatore dando luogo ad un processo di propagazione della catena. Una volta che la catena è iniziata, la reazione procede spontaneamente, in quanto il processo è energeticamente favorevole⁴⁵.

La velocità e la cinetica del processo di polimerizzazione all'inizio sono lente, ma progressivamente tendono ad aumentare sempre più rapidamente (fig. 2.2). Ciò è dovuto al fatto che la liberazione di energia fa aumentare la temperatura e ciò favorisce lo svolgersi del processo.

⁴⁵ G. Xu et al., *Journal of Colloid and Interface Science*, (2006), 302, 659–661.

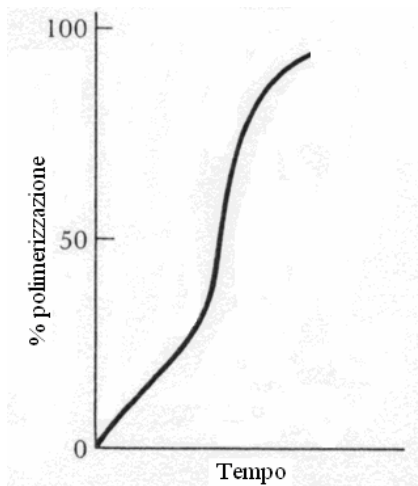


Figura 2.2

Quando la polimerizzazione è quasi completa, la velocità diminuisce nuovamente, dal momento che le poche molecole di monomero residue devono diffondere nella soluzione alla ricerca dell'estremità attiva della catena radicalica per poter dar luogo alla reazione con conseguente allungamento della catena.

Con tale meccanismo di giunge alla formazione della matrice polimerica.

2.5.2 Sintesi del polimero C1

Tra i possibili iniziatori radicalici sopra citati, la scelta è ricaduta sull'AIBN essendo tale molecola compatibile con le condizioni di reazione richieste nel nostro caso.

Il processo prevede che la glicina metacrilata (monomero) venga disciolta in THF e che alla soluzione risultante sia aggiunta una quantità molare di N,N-dimetilacrilammide (DMAA; fig. 2.3) in qualità di comonomero in rapporto 1:1 molare.

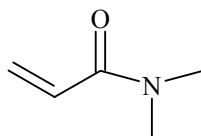


Figura 2.3

Per tutto lo svolgimento della reazione è richiesta un'atmosfera inerte.

È opportuno ricordare che la scissione dell'AIBN si osserva in seguito al raggiungimento di un determinato livello energetico; in questo caso l'energia è

fornita da una fonte di calore, infatti la reazione procede sotto riscaldamento. Pertanto risulta essenziale che la temperatura si mantenga costante (60°C) per tutta la durata del processo.

La reazione termina dopo 90 minuti dando luogo alla formazione di un polimero gelatinoso di colore ambrato (C1; tabella 2.4).

2.5.3 Sintesi del polimero C2

Il suddetto processo sintetico procede allo stesso modo dell'esperimento che conduce al prodotto C1. Anche in questo caso si tratta di una polimerizzazione radicalica che interessa la diglicina funzionalizzata e la DMAA; la sintesi si svolge in THF, alla temperatura di 60°C, in un intervallo di tempo di 1 ora; come iniziatore si utilizza AIBN. Il prodotto, siglato come C2, si presenta sotto forma di gel di colore ambrato.

In tabella 2.4 sono disponibili le informazioni relative a tale polimerizzazione.

Monomero	Comonomero	Solvente	Sistema Iniziatore	Resina	
g	DMAA ml	THF ml	AIBN mg	Sigla	Mg
G1: 1,67	1,20	6,5	141	C1	596
G2: 0,91	0,47	5	6,8	C2	955

Tabella 2.4

2.6 Polimerizzazione con composti all'azoto quaternario

Il successivo obiettivo del nostro progetto è stato quello di coinvolgere sali d'ammonio quaternario nel processo di polimerizzazione al fine di produrre materiali carichi positivamente, costituenti ideali per le formulazioni cosmetiche⁴⁶.

⁴⁶ G. Proserpio, *Chimica e tecnica cosmetica 2000*, (1999), vol II, 702-715.

Perseguendo tale scopo sono state testate numerose polimerizzazioni con più monomeri di natura quaternaria⁴⁷.

Questi esperimenti mostrano che i migliori risultati si ottengono in presenza dei monomeri commerciali: N,N-(dimetilammino)etil acrilato metil cloruro (noto come ADAMEQuat®; fig. 2.4) e N,N-(dimetilammino)etil metacrilato metil cloruro (MADAMEQuat®; fig. 2.5), le cui caratteristiche chimico-fisiche vengono riportate nella tabella 2.5.

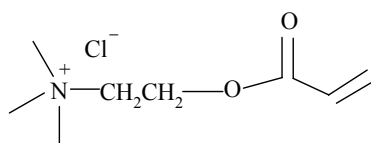


Figura 2.4

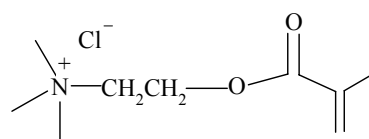


Figura 2.5

	ADAMEQuat®	MADAMEQuat®
Stato Fisico	liquido	liquido
Colore	quasi incolore	incolore, lievemente giallo
Odore	assente	caratteristico
Punto di ebollizione	> 100°C	187 °C
Punto di congelamento/fusione	< -18°C	-50 °C
Solubilità in acqua	solubile	completamente solubile
Tensione di vapore	18 mmHg (T=20°C)	< 1 mmHg (T=20°C)
PM	143,17	157,21
Densità relativa (20°C)	1,132 g/ml	0,933 g/ml

Tabella 2.5

⁴⁷ M.V. de Paz Báñez et al., *Polymer*, (2000), 41, 8504–8505.

Entrambi i composti sono stati purificati prima dell'uso al fine di rimuovere l'inibitore di polimerizzazione ad essi associato oltre ad eventuali impurezze.

A questo punto è stato possibile copolimerizzare la glicina derivatizzata, in una piccola quantità di acqua bidistillata, utilizzando una quantità equimolare di composto quaternario. In entrambi i casi abbiamo riscontrato una spiccata reattività dei monomeri, ciò permette di ottenere materiali polimerici (C3, C4) in tempi brevi (tab. 2.6).

La reazione di polimerizzazione è generata a partire dalla scissione di un iniziatore e prosegue con la formazione di specie radicaliche che reagiscono con le funzioni metacriliche presenti sull'amminoacido derivatizzato, ciò ne determina la reticolazione progressiva. Come sistema iniziatore è stato impiegato persolfato d'ammonio oppure una coppia di composti ad azione redox: sodio formaldeide solfossilata ("RED"; 0,2% p/p) e t-butilidroperossido ("OX"; 0,5% p/p).

Monomero	Comonomero		Solvente	Sistema Iniziatore		Resina	
	g	ml		ml	Mg		mg
2,52	ADAME	3,15	3,5	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	50	C3	240
1,18	MADAME	1,38	2,5	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	50	C4	140
0,88	MADAME	1	3	"RED"	3,6	C5	150
				"OX"	9		

Tabella 2.6

L'alta reattività è particolarmente evidente quando le sintesi vengono condotte utilizzando in qualità di iniziatore il sistema redox. In queste condizioni infatti la polimerizzazione si verifica istantaneamente, senza esporre la miscela di reazione a fonti di calore (come nel caso del prodotto C5).

2.7 Caratterizzazione dei polimeri sintetizzati

I prodotti ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi di spettrofotometria FT-IR.

È stato realizzato uno spettro IR di un campione di glicina polimerizzata con DMAA (figura 2.8) al fine di confermare la presenza di tale comonomero nella resina. Si riportano anche gli spettri dei reagenti di partenza (fig. 2.6; fig. 2.7) al fine di stabilire un confronto con il prodotto C1.

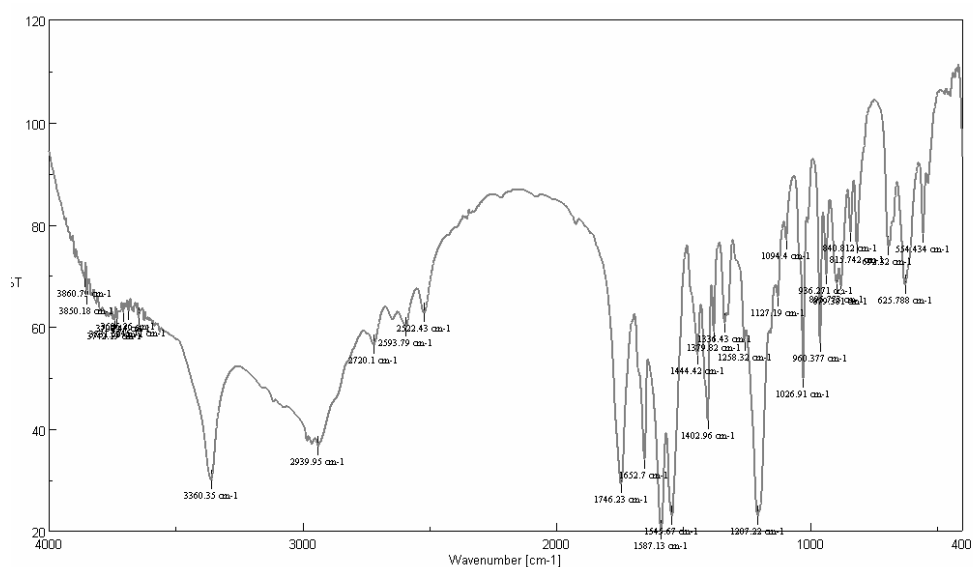
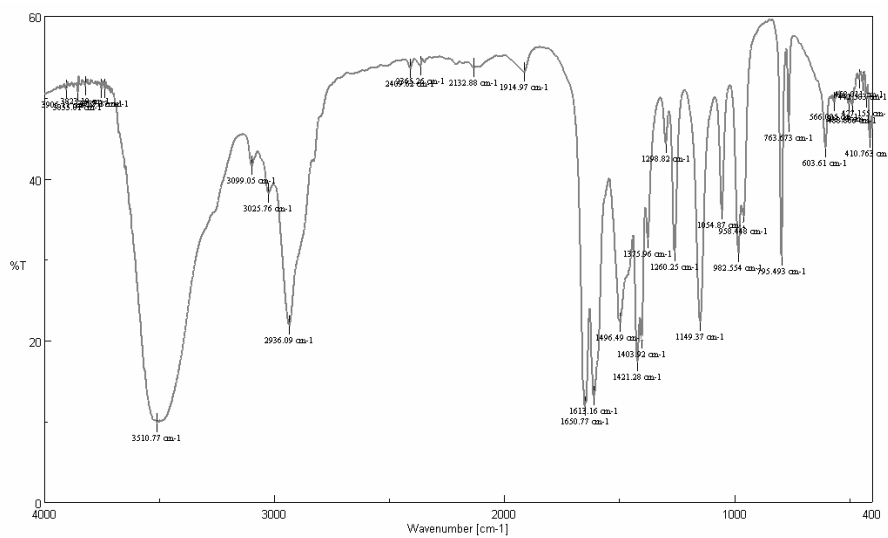
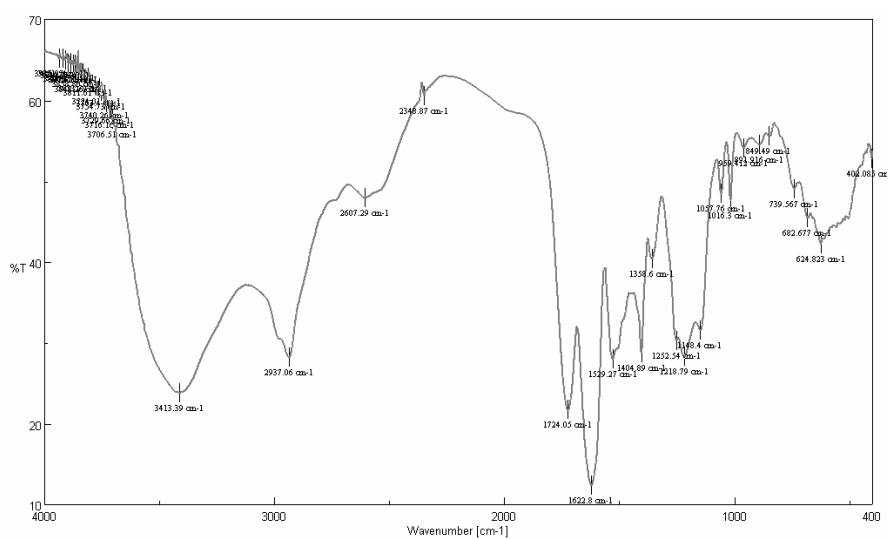


Figura 2.6 *G1*

Figura 2.7 *DMAA*Figura 2.8 *CI*

Nello spettro è stata rilevata una banda a 2924 cm^{-1} , caratteristica dei gruppi metilici della DMAA.

La medesima strategia di caratterizzazione è stata seguita per caratterizzare i prodotti C2, C3, C4 e C5 di cui si riportano gli spettri nelle figure 2.9 - 2.15.

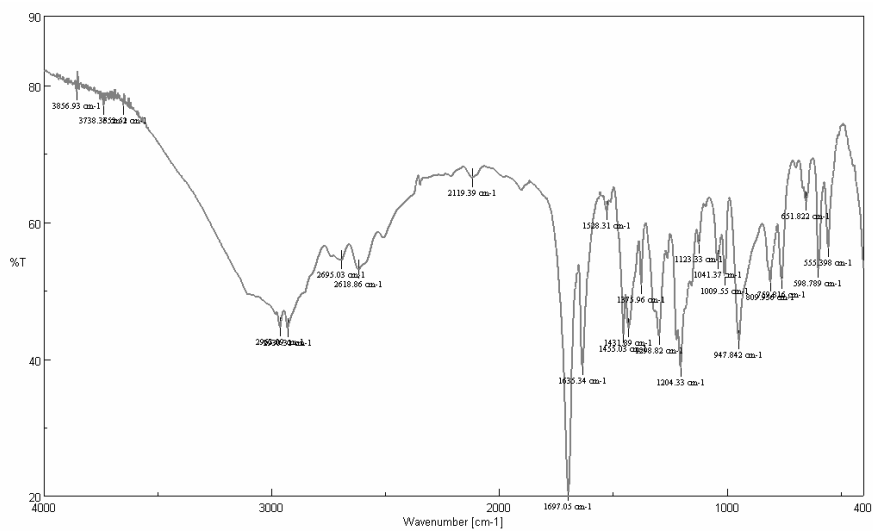


Figura 2.9 G2

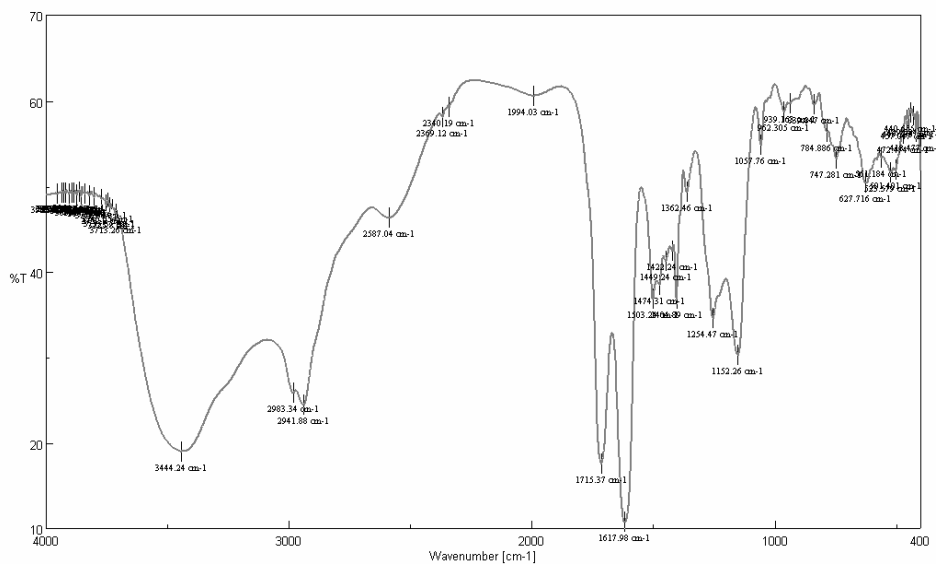


Figura 2.10 C2

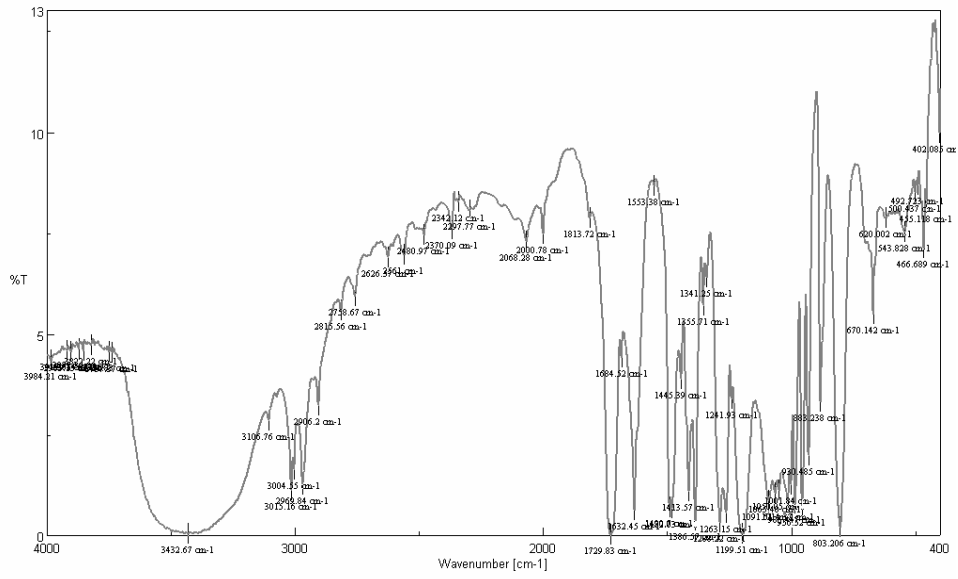


Figura 2.11 ADAME

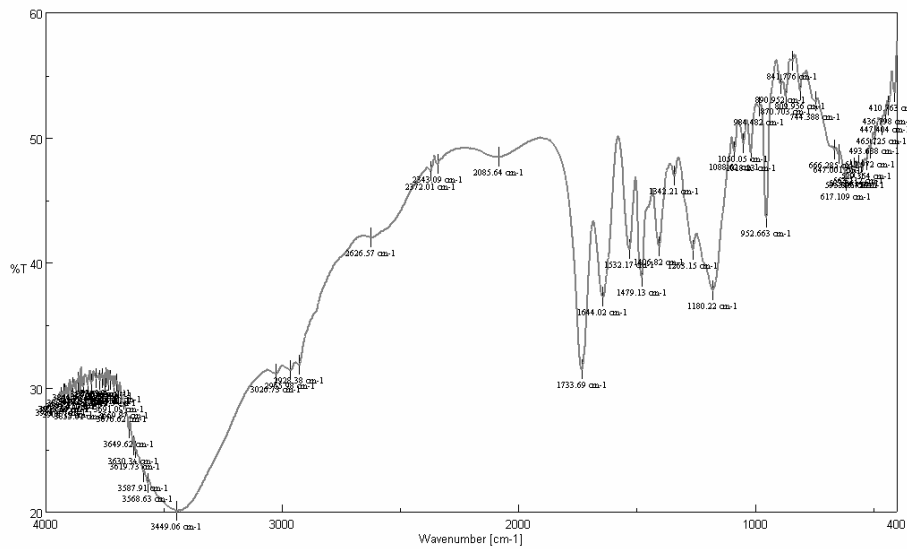


Figura 2.12 C3

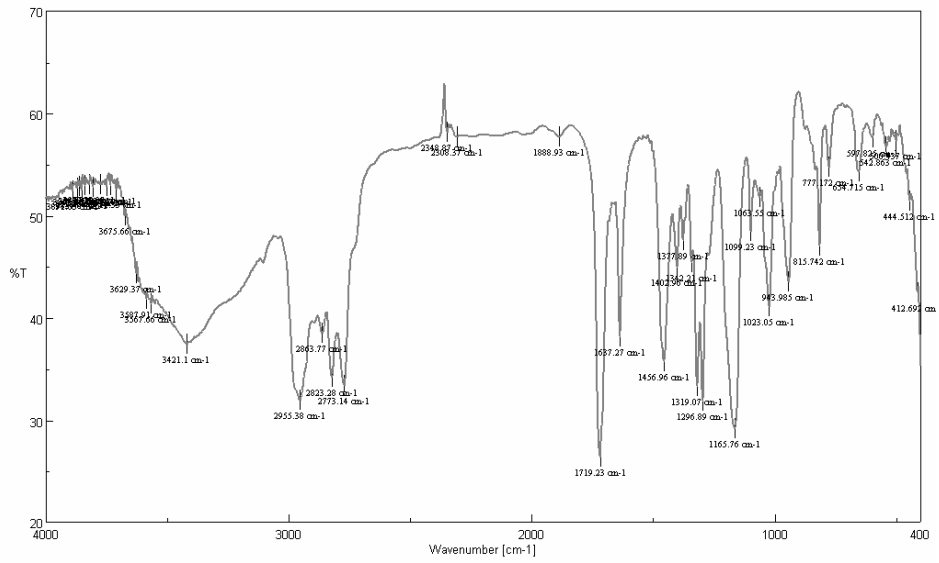


Figura 2.13 MADAME

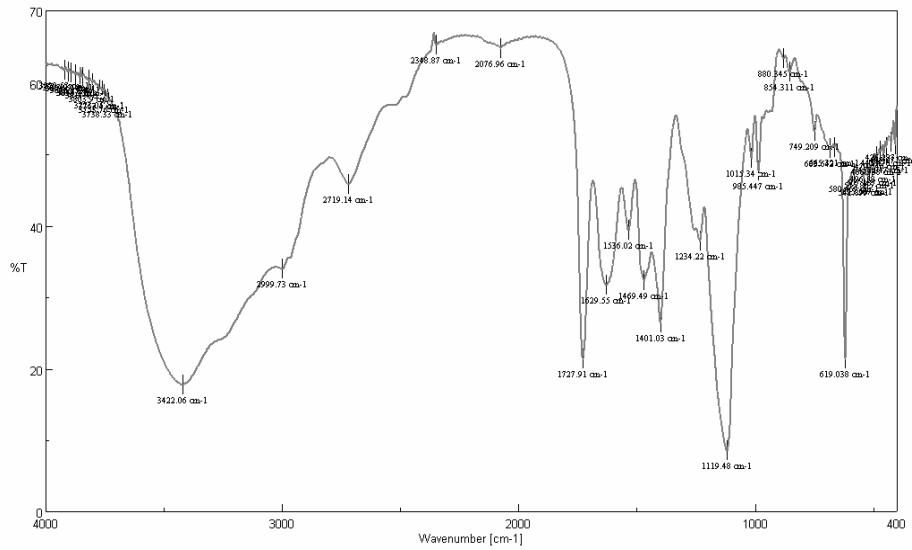


Figura 2.14 C4

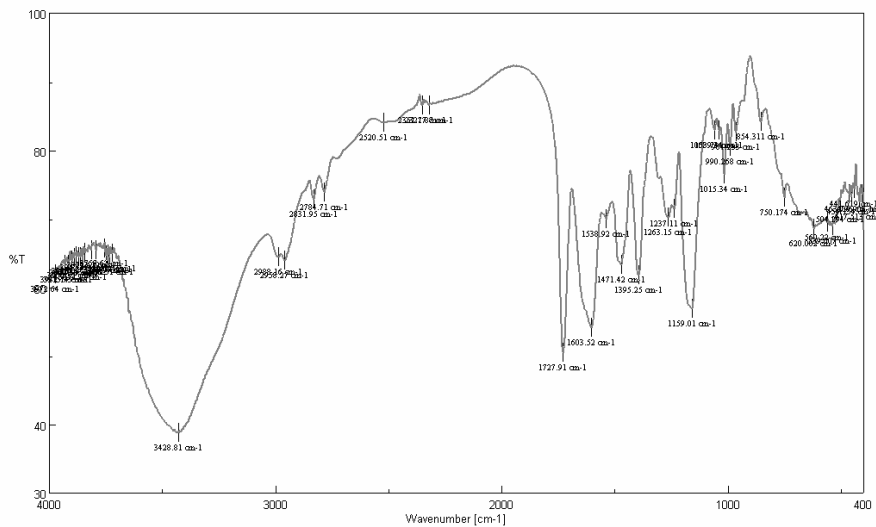


Figura 2.15 C5

Dall'analisi effettuata si evince, negli spettri FT-IR dei polimeri, la presenza delle bande caratteristiche dei monomeri di partenza, ovvero delle funzioni ammidiche e carbossiliche, a riprova dell'avvenuta polimerizzazione.

2.8 Valutazione delle proprietà tensioattive dei polimeri sintetizzati

La fase successiva della caratterizzazione dei materiali sintetizzati in questo lavoro è stata incentrata sulla potenziale applicazione di questi ultimi come tensioattivi. A tale scopo sono state eseguite delle misure sulla variazione di tensione superficiale rilevate in presenza dei polimeri C1, C3 e C4.

2.8.1 Definizione della tensione superficiale

La tensione superficiale (generalmente indicata con γ) è una particolare proprietà dei fluidi che opera lungo la superficie di separazione (interfaccia) tra il fluido stesso ed un materiale di un'altra natura, ad esempio un solido, un liquido o un gas. Dal punto di vista termodinamico può essere definita come il lavoro per unità di area richiesto per formare una nuova superficie⁴⁸, come mostrato nella seguente equazione:

⁴⁸ - ¹¹ J.P Hurley, C. Garrod, *Principles of physics*, (1992), 205-206.

$$\gamma = \left(\frac{dG}{dA} \right)_{P,T}$$

eq. 2.1

dove G è l'energia libera di Gibbs e A è la superficie.

Le azioni attrattive tra le molecole di un liquido (le forze di coesione) fanno sì che le molecole dello strato superficiale siano soggette ad una forza risultante non nulla che tende a farle spostare verso l'interno; esse pertanto tendono a sfuggire dalla superficie limite del liquido e di conseguenza questa tende ad assumere la estensione minima possibile (in assenza di altre forze, la superficie minima, è quella sferica). Le molecole sulla superficie possiedono una energia potenziale superiore a quella delle molecole all'interno del liquido, sicché se si vuole aumentare la estensione della superficie libera di un liquido occorre spendere un'energia proporzionale all'aumento di superficie⁴⁹.

Quando si parla di tensione superficiale ci si riferisce principalmente all'acqua ed alla sua interfaccia con l'aria. L'esistenza di tale tensione spiega per esempio il motivo per cui l'acqua forma delle goccioline su una superficie di vetro e non vi si distende, non aderisce cioè alle superfici con cui viene in contatto, ovvero "non bagna". Se si vuole indurre l'acqua a bagnare il substrato (ad esempio: lo sporco nella detergenza), occorre abbassare la tensione superficiale dell'acqua, ciò è possibile con l'ausilio dei tensioattivi; in tal modo si vanno a rompere in buona parte le forze coesive (i legami a idrogeno) che tengono legate le molecole d'acqua. Si devono alla tensione superficiale tutta una serie di fenomeni (fig. 2.16) come quello dell'avanzamento di un liquido in un tubicino capillare con formazione dei menischi, quello del galleggiamento nell'acqua delle polveri di un metallo o di alcuni insetti.



Figura 2.16 La tensione superficiale impedisce alla moneta di affondare

2.8.2 Principi di funzionamento del tensiometro

Lo strumento che registra le variazioni della tensione superficiale e che permette dunque il calcolo della *concentrazione micellare critica* (CMC) dei tensioattivi è il tensiometro che si serve di un anello di Du Noüy in platino⁵⁰. L'anellino di platino è un componente particolarmente delicato; è fondamentale, quindi, mantenerlo sempre pulito e privo di impurezze. Prima di operare, si scalda alla fiamma fino al calor rosso e poi si immerge in una soluzione di HCl concentrata, ad esempio 1 M.

La vaschetta che contiene il portacampione è mantenuta a temperatura costante da un sistema di ricircolo d'acqua Heto, con un'accuratezza di ± 0.1 °C.

Il principio di funzionamento su cui si basa lo strumento è il seguente: ad una estremità della leva è posto l'anellino, all'altra un peso⁵¹. Nel corso della misura, una forza torcente nel fulcro della leva bilancia la forza tra i due bracci; lo strumento misura l'angolo di torsione, che è proporzionale alla forza necessaria per incrementare l'area superficiale di 1 cm^2 , quindi la misura ci fornisce il valore della tensione superficiale con un errore sistematico pari a $\pm 0.1 \text{ mN m}^{-1}$ (fig. 2.17).

⁵⁰ M. Amorosa, *Principi di tecnica farmaceutica*, (1998), V edizione, 261.

⁵¹ M. El Tani, *Transport in porous media*, (1995), 20(3), 235-250.

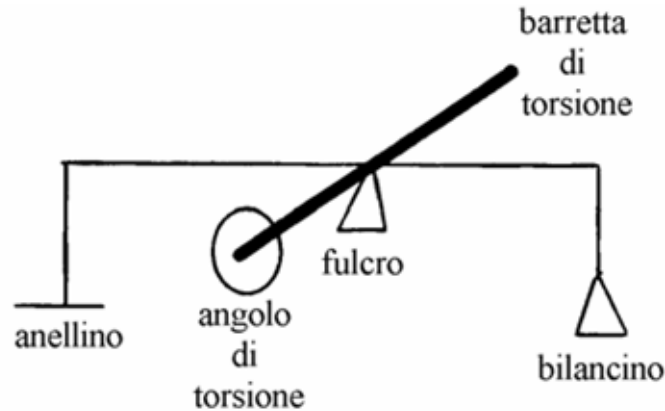


Figura 2.17

2.8.3 Misure della tensione superficiale

Le misure di tensione superficiale sono state eseguite su soluzioni dei polimeri, a varie concentrazioni, disciolti in acqua distillata. È importante sottolineare che bisogna attendere un certo intervallo di tempo prima di eseguire le misure, ciò risulta necessario al raggiungimento dell'equilibrio termico e termodinamico. I valori di tensione superficiale a diverse concentrazioni di polimero sono stati misurati con un tensiometro digitale ad anello TD1 Lauda alla temperatura di cella di misura di 25 °C (incertezza $\pm 0.1^\circ\text{C}$). L'incertezza massima su σ è di $\pm 0.1 \text{ mNm}^{-1}$. Il tempo richiesto per ottenere valori stabili di tensione superficiale è stato inferiore a 5 minuti.

I valori misurati sono successivamente convertiti applicando l'equazione 2.2 in modo da conoscere il valore reale:

$$M = \left(0,8759 + \frac{0,0009188 \cdot \text{misura}}{d} \right) \cdot \text{misura} \quad \text{eq. 2.2}$$

Nelle tabelle 2.7-8-9 sono riportate le concentrazioni delle miscele preparate e i rispettivi valori di tensione superficiale, mentre nei grafici 2.1-2-3 è riportato l'andamento di γ in funzione della concentrazione dei campioni esaminati.

POLIMERO C1	concentrazione mg/ml	tensione superficiale mN/m
Campione 6	$5 \cdot 10^{-7}$	67,27
Campione 5	$5 \cdot 10^{-6}$	64,62
Campione 4	$5 \cdot 10^{-5}$	63,66
Campione 3	$5 \cdot 10^{-4}$	61,68
Campione 2	$5 \cdot 10^{-3}$	58,69
Campione 1	$5 \cdot 10^{-2}$	56,60
Campione p	$5 \cdot 10^{-1}$	52,07

Tabella 2.7

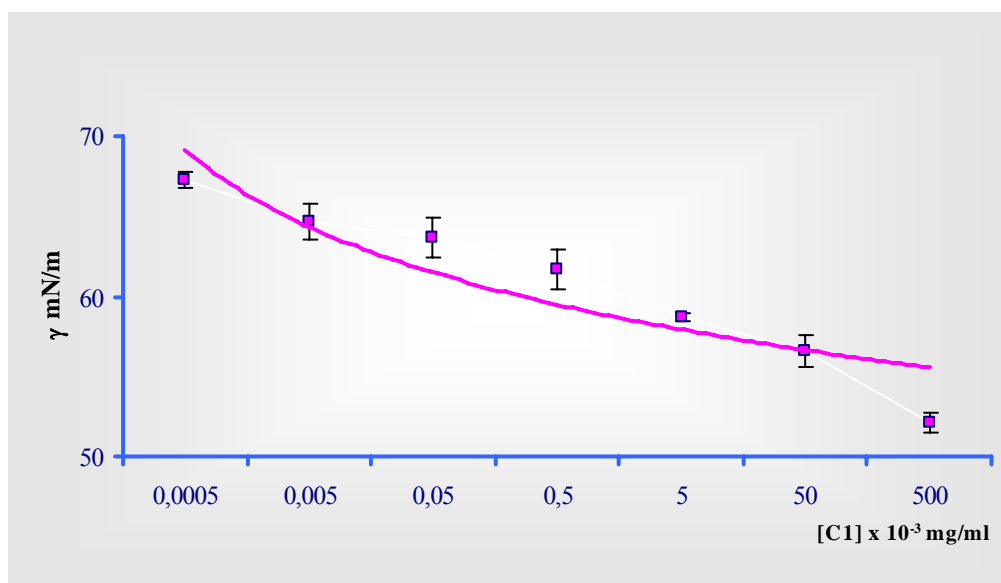


Grafico 2.1

POLIMERO C3	concentrazione mg/ml	tensione superficiale mN/m
Campione 6	$5 \cdot 10^{-7}$	64,30
Campione 5	$5 \cdot 10^{-6}$	61,63
Campione 4	$5 \cdot 10^{-5}$	53,23
Campione 3	$5 \cdot 10^{-4}$	51,85
Campione 2	$5 \cdot 10^{-3}$	50,55
Campione 1	$5 \cdot 10^{-2}$	49,07
Campione p	$5 \cdot 10^{-1}$	48,52

Tabella 2.8

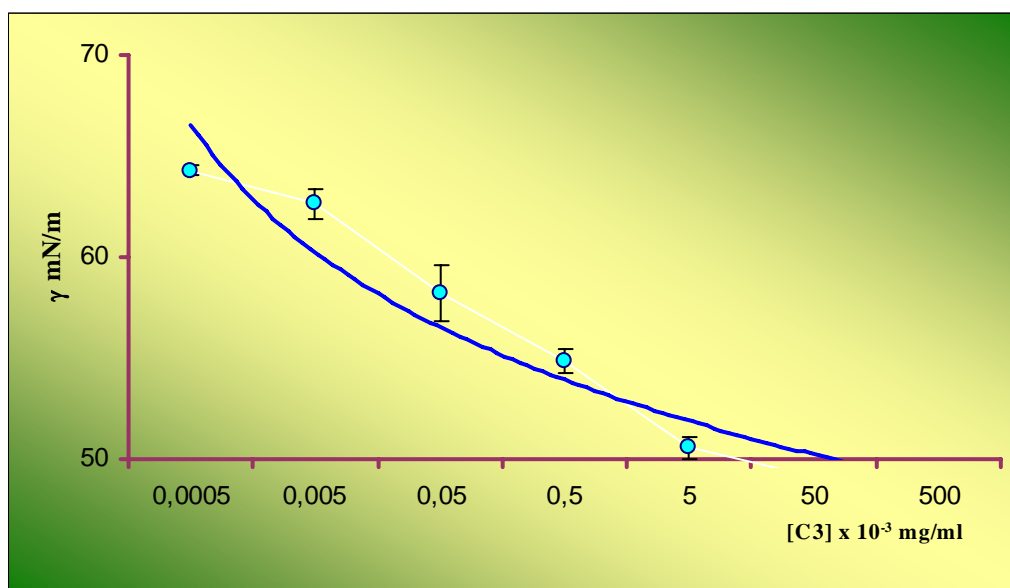


Grafico 2.2

POLIMERO C4	concentrazione mg/ml	tensione superficiale mN/m
Campione 6	$5 \cdot 10^{-7}$	68,79
Campione 5	$5 \cdot 10^{-6}$	68,61
Campione 4	$5 \cdot 10^{-5}$	66,90
Campione 3	$5 \cdot 10^{-4}$	51,01
Campione 2	$5 \cdot 10^{-3}$	49,19
Campione 1	$5 \cdot 10^{-2}$	47,23
Campione p	$5 \cdot 10^{-1}$	44,44

Tabella 2.9

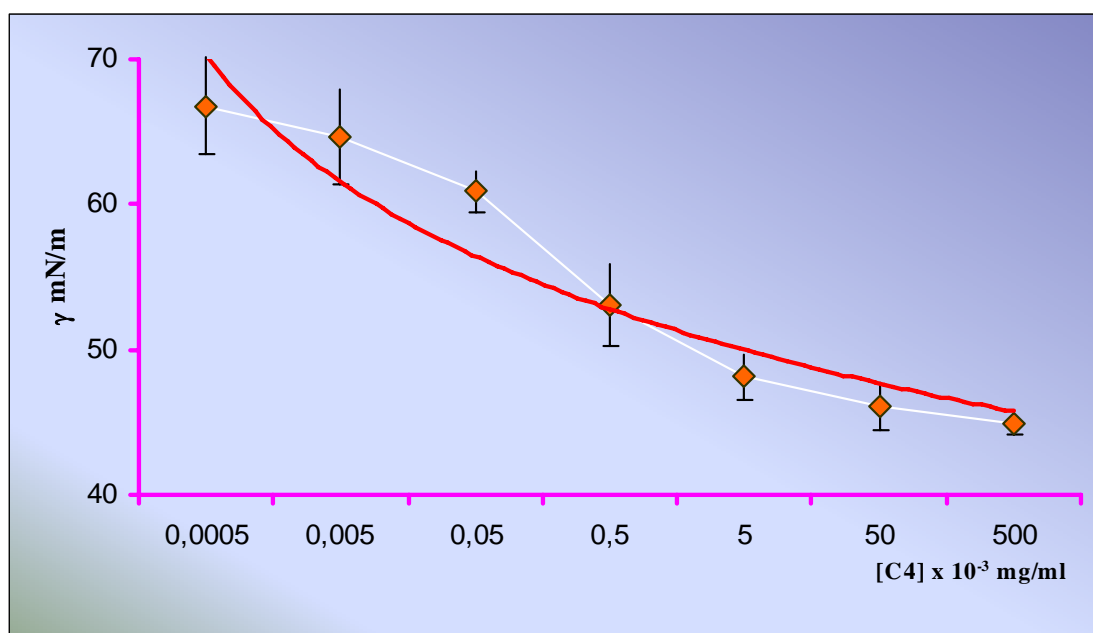


Grafico 2.3

Dall'analisi dei dati sperimentali si evidenzia la natura tensioattiva dei polimeri funzionali prodotti, infatti in tutti i casi esaminati si riscontra un'evidente capacità di abbassare la tensione superficiale. Questa tendenza è molto interessante se pensiamo ad una potenziale applicazione dei suddetti materiali in qualità di coadiuvanti nelle formulazioni cosmetiche: i polimeri potrebbero essere impiegati come condizionanti (in virtù della funzione ammonica quaternaria presente sul network polimerico) ed in più esercitare una azione tensioattiva non aggressiva volta alla detergenza del tessuto biologico.

Le evidenze sperimentali qui presentate costituiscono un'indicazione per procedere con gli ulteriori sviluppi di tale lavoro. Le fasi successive del progetto prevederanno sicuramente la determinazione della CMC del polimero (adeguatamente purificato) e, successivamente, studi sul rapporto di autoaggregazione, determinazione della dimensione e della forma dell'aggregato, misurazione della conducibilità.

CAPITOLO III

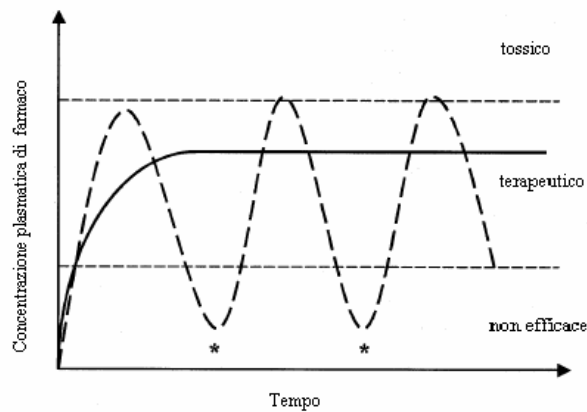
DRUG DELIVERY SYSTEMS: MICROSFERE DI DESTRANO E PROFARMACI

3.1 Premessa

La ricerca nel settore farmaceutico ha puntato molto sulla produzione e sul perfezionamento di sistemi che siano in grado di veicolare i farmaci nell'organismo e rilasciarli in maniera controllata, questi sono noti come Drug Delivery Systems (DDS).

Gli studi di università e centri di ricerca in tutto il mondo non sono più finalizzati unicamente alla sintesi di nuovi agenti terapeutici, ma anche volti alla definizione di nuovi metodi di somministrazione di principi attivi o all'ottimizzazione di quelli già esistenti.

Il sistema a rilascio controllato, oggetto di studio fin dagli anni '70, si è oggi delineato come il metodo di somministrazione farmacologica che meglio riesce a garantire efficacia terapeutica e salvaguardia del benessere del paziente, in quanto consente, per un tempo determinato, una concentrazione per lo più costante del farmaco, efficace e non nociva. A seconda del farmaco da somministrare, può essere richiesto un rilascio di tipo continuo oppure un rilascio di tipo pulsato (come ad esempio in caso di assunzione dei vaccini). Al contrario i sistemi tradizionali, consistenti nella somministrazione a tempi predefiniti della dose prescritta, comportano livelli oscillanti di concentrazione che potrebbero generare intervalli di tossicità ed inefficacia, come riportato nel grafico 3.1.



tratto continuo: curva di concentrazione del farmaco somministrato con un sistema a rilascio controllato

linea tratteggiata: curva di concentrazione del farmaco con somministrazione convenzionale

Grafico 3.1

Un importante vantaggio dei DDS consiste nella possibilità di essere anche selettivi verso l'organo bersaglio: alcuni di questi sistemi sono progettati in modo tale da interagire attivamente con l'organo e con la specifica popolazione cellulare verso cui il farmaco è diretto. In questo caso, farmaci dotati di potente attività, come per esempio gli antitumorali, possono raggiungere, nelle zone dell'organismo colpite da tumore, una concentrazione più elevata rispetto a quella ottenibile con una somministrazione convenzionale. In tal modo si evita la distribuzione del chemioterapico uniforme in tutto l'organismo, condizione che costringerebbe ad usarne dosaggi molto elevati per raggiungere i livelli terapeutici efficaci negli organi bersaglio, con conseguente comparsa di manifestazioni tossiche a livello sistemico⁵².

Una varietà di sistemi di rilascio è stata ampiamente esplorata dalla ricerca scientifica: dai profarmaci a basso peso molecolare, ai trasportatori

⁵² Mills SN, Davis SS, Polymers in controlled drug delivery, (1987), 1-15.

macromolecolari, prendendo in considerazione polimeri di origine naturale e polimeri sintetici.

Microsfere polimeriche⁵³ e micelle realizzate sulla base di polimeri ed idrogel si sono rivelati dei materiali tutti efficaci nell'accrescere la specificità d'azione dei farmaci, abbassare la tossicità sistemica, migliorare la loro velocità di assorbimento e proteggere i chemioterapici dalla degradazione biochimica. I suddetti sistemi prevedono l'inserimento di un principio attivo in un carrier che raggiungerà il sito bersaglio e che sarà poi degradato in tal sede.

La seconda parte di questa tesi è incentrata sulla realizzazione di nuovi DDS con potenziali applicazioni nel settore farmaceutico-sanitario testate in vitro.

Esattamente ci siamo concentrati su due importanti settori della ricerca sui DDS:

- sintesi di un idrogel di destrano derivatizzato con funzione di sistema carrier per il rilascio di farmaco
- realizzazione di un profarmaco di tipo polimerico a base di un agente terapeutico antinfiammatorio

Di seguito sono presentate le più aggiornate informazioni riportate in letteratura a proposito di profarmaci ed idrogel di destrano.

3.2 Forme dosaggio a base di destrano

I polisaccaridi sono polimeri, ampiamente diffusi in natura, costituiti da unità monosaccaridiche. Tali polimeri mostrano elevata biodisponibilità, ottima stabilità, costo accessibile oltre ad una grande varietà di strutture con diverse proprietà⁵⁴, inoltre possono essere facilmente modificati chimicamente e biochimicamente. I polisaccaridi rappresentano una classe di molecole estremamente utilizzata per la realizzazione di sistemi a rilascio controllato. Quelli di origine naturale, in quanto biodegradabili e biocompatibili, costituiscono il materiale di partenza per lo sviluppo di forme solide di dosaggio impiegate nel rilascio di una vasta gamma di farmaci nel colon. Ciò è possibile in quanto la degradazione dei polisaccaridi naturali avviene ad opera della microflora del

⁵³ Crommelin DJA, Hennink WE, Storm G, Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists, (2001), 138–145.

⁵⁴ Hovgaard L., Bronsted H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., (1996), 13, 185-223

colon che è composta in gran parte da batteri anaerobi, i quali secernono diversi enzimi tra i quali: β -D-glucosidasi, β -D-galattosidasi, amilasi, pectinasi, α -1-glicosidasi (destranasi), β -D-xilodasi.

Il destrano è un polisaccaride naturale notoriamente utilizzato come materiale di rivestimento di formulazioni farmaceutiche sia orali che iniettabili; negli ultimi dieci anni si è osservato un incremento della produzione scientifica⁵⁵ che utilizza il destrano come materiale di partenza per la realizzazione di forme di dosaggio a rilascio modificato come idrogel, microsfere o profarmaci.

3.2.1 Microsfere

Le microsfere rappresentano il sistema più moderno per il rilascio modificato di farmaci. Il maggiore vantaggio del loro utilizzo consiste nell'elevata selettività di rilascio del farmaco ad esse associato. Le microsfere possono essere suddivise in due categorie:

- ✓ Sistemi a riserva (Reservoir) che prevedono l'incapsulazione del prodotto farmaceutico all'interno di un involucro polimerico;
- ✓ Sistemi a matrice, in cui il farmaco è fisicamente intrappolato all'interno di un reticolo polimerico.

Le microsfere di destrano si realizzano attraverso una tecnica di emulsione che sfrutta l'immiscibilità in mezzo acquoso di soluzioni contenenti polimeri⁵⁶. Dopo la formazione dell'emulsione, il polimero nella fase dispersa può essere reticolato fino ad ottenere microparticelle con caratteristiche di idrogel. Il coinvolgimento del destrano in una struttura reticolata, come microsfere o idrogel, è possibile solo dopo opportuna derivatizzazione del polisaccaride con un appropriato agente chimico recante gruppi funzionali suscettibili di polimerizzazione radicalica. Il destrano, come altri polisaccaridi, può essere reticolato con agenti bifunzionali (1,6-esametilendiisocianato)⁵⁷ oppure derivatizzato con sostituenti che contengano doppi legami in grado di subire polimerizzazione radicalica, come i composti acrilici e metacrilici.

⁵⁵ *Chu Chih – Chang, Wu A.-T., Lin Y.-F., Polymer, (2001), 42, 1471-1479.*

⁵⁶ *Franssen O., Hennink W. E., Int. J. Pharm., (1998), 168, 1-7.*

⁵⁷ *Hovgaard L., Bronsted H., J. Control. Release (1995), 36, 159-166.*

3.2.2 Idrogel

Idrogel di destrano sono stati studiati come possibili carriers per il rilascio del farmaco nel colon grazie alla loro elevata versatilità. Questi sistemi sono caratterizzati dalla presenza di un farmaco contenuto in una matrice polimerica, ossia destrano derivatizzato chimicamente o reticolato con opportuni agenti. A seconda della struttura della matrice polimerica di tali idrogel il rilascio della specialità medicinale può avvenire attraverso un meccanismo di degradazione oppure in seguito a rigonfiamento della matrice.

3.3 Studio di carriers di destrano per il rilascio colon specifico

Come riportato in letteratura⁵⁸, è stato sintetizzato e caratterizzato un materiale a base di destrano termo- e pH-sensibile parzialmente biodegradabile. È stata progettata e sintetizzata tramite polimerizzazione foto indotta da radiazioni UV una nuova classe di idrogel ibridi composti da destrano funzionalizzato con anidride maleica (figura 3.1 a) e poli-N-isopropilacrilamide (figura 3.1 b). Si tratta di un polisaccaride biodegradabile e termo-sensibile. L'idrogel ibrido risultante è caratterizzato dalle proprietà singole dei componenti precursori combinate.

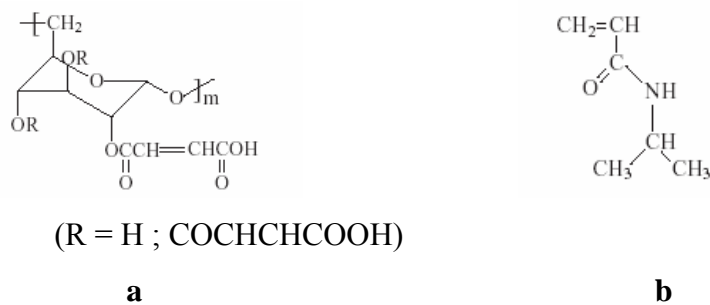


Figura 3.1

Per la presenza di poli-N-isopropilacrilamide essi acquistano la capacità termo-sensibile, mentre la natura biodegradabile del Dex-MA, come pure la presenza di un gruppo libero di acido carbossilico, rende il prodotto parzialmente degradabile e pH-sensibile. Le proprietà degli idrogel ibridi, quali la temperatura critica di

⁵⁸ Zhang Xianzheng, Wu Daqing, Chu Chih – Chang, *Biomaterials*, (2004), 25, 4719-4730.

soluzione più bassa (LCST), la morfologia interna, il grado di rigonfiamento, le cinetiche responsive alla temperatura e la sensibilità al pH, sono esaminate tenendo conto della percentuale di Dex-MA e poli-N-isopropilacrilamide rispettivamente presenti nella formulazione. I dati ottenuti dimostrano chiaramente che la più recente serie di idrogel ibridi sintetizzata a partire da tali materiali è sensibile alla temperatura ed anche al pH. Inoltre si deve osservare che le proprietà di questa nuova classe di idrogel sono modulabili; ad esempio, la loro temperatura di fase di transizione si potrebbe modificare fino a renderla simile alla temperatura corporea, il che risulterebbe molto utile per alcune delle loro applicazioni biomediche.

3.4 Matrici di destrano basate su interazioni di natura fisica

È stato descritto da Hennink⁵⁹ un nuovo idrogel di destrano biodegradabile basato su interazioni fisiche, quest'ultimo è particolarmente adatto per il rilascio controllato di proteine attive farmaceuticamente.

La caratteristica di tale sistema è che la preparazione degli idrogel avviene in una soluzione totalmente acquosa nella quale l'uso di solventi organici non risulta necessario. In questo tipo di idrogel la reticolazione è stabilita fisicamente per formazione di uno stereocomplesso tra catene di oligomeri enantiomerici di acido lattico, pertanto non si richiede l'impiego di specie chimiche.

L'idrogel si ottiene (fig. 3.2) dopo semplice mescolamento di soluzioni acquose di destrano (L)-lattato e destrano (D)-lattato. Gli oligomeri di acido lattico di chiralità opposta si accoppiano al destrano in due gruppi separati, di conseguenza i prodotti finali saranno: destrano con innesto di oligo-L-lattato e destrano con innesto di oligo-D-lattato.

⁵⁹ Hennink W. E., De Jong S. J., Bos G. W., Veldhuis T. F. J., Van Nostrum C. F., *Int. J. Pharm.*, (2004), 277, 99-104.

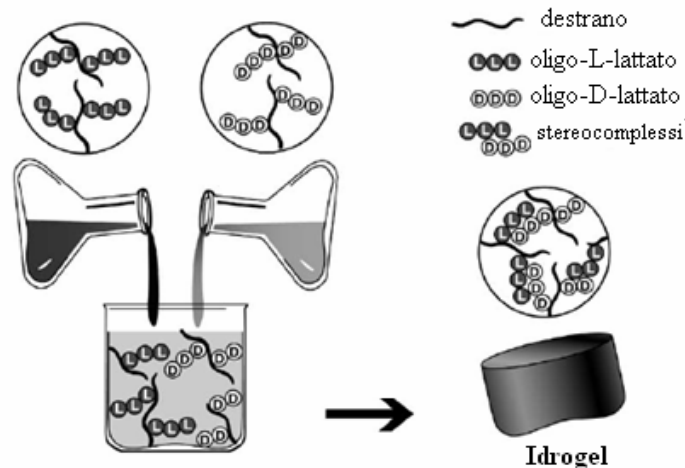


Figura 3.2

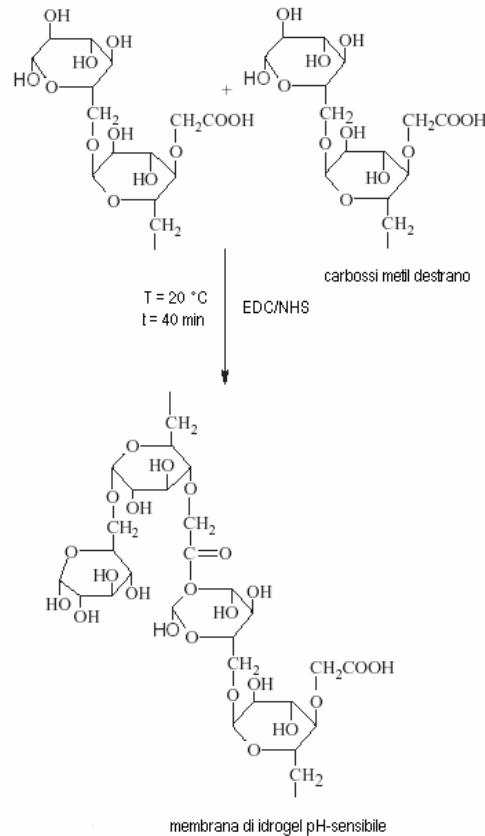
Dal momento che per formare il polimero non vengono usati né solventi organici né agenti reticolanti, questo sistema è molto adatto come matrice per il rilascio controllato di proteine di interesse farmaceutico.

3.5 Realizzazione di idrogel pH-sensibili mediante formazione di ponti esterei

Sfruttando la reattività della carbodiimide è stato sviluppato un metodo semplice e rapido per la preparazione di idrogel pH-sensibili applicabili come membrane per il rilascio di farmaci o nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Idrogel pH-sensibili sono stati preparati⁶⁰ con successo mediante reticolazione intermolecolare di carbossimetil destrano (CM-dex) usando 1-etil-3,3-dimetilaminopropilcarbodiimide idrocloruro (EDC) ed N-idrossisuccinimide (NHS). Questi agenti reticolanti promuovono la formazione di legami esterei “a lunghezza zero” tra gruppi di acidi carbossilici e gruppi idrossilici nel CM-Dex; in tal modo si crea una struttura reticolata (schema 3.1).

⁶⁰ Zhang Rhongsheng, Tang Mingguo, Bowyer Adrian, Eisenthal Robert, *Biomaterials*, (2005), 26, 4677-4683.



Schema 3.1

È opportuno notare che le funzioni chimiche responsabili della reticolazione delle molecole di destrano funzionalizzato sono sicuramente i gruppi ossidrilici e carbossilici del polisaccaride (la cui presenza nell'idrogel viene accertata tramite FT-IR).

In confronto agli idrogel metacrilati comunemente usati, preparati per polimerizzazione radicalica in presenza di reticolanti, gli idrogel a base di CM-Dex, EDC e NHS hanno diversi vantaggi. Il risultato più importante consiste nella possibilità di controllare facilmente la densità di carica ed il grado di reticolazione nell'idrogel e, di conseguenza, anche l'equilibrio tra le percentuali di degradazione e le sue proprietà meccaniche. Inoltre, secondo questa tecnica, EDC/NHS non vengono incorporati nell'idrogel, a differenza di quanto avviene utilizzando gli agenti reticolanti convenzionali; al contrario queste specie, nel corso della reazione, producono un derivato di urea solubile in acqua che mostra una tossicità molto più bassa ed è facilmente lavabile.

3.6 Profarmaci e rilascio sito specifico

La somministrazione orale di farmaci è considerata la via ottimale in quanto non richiede l'intervento di operatori esterni ma soltanto la disponibilità del paziente; non mancano tuttavia possibili inconvenienti e barriere fisiologiche da superare⁶¹. Alcuni farmaci di uso comune possono determinare irritazione della mucosa gastrica che potrebbe anche degenerare in gastriti erosive ed emorragie gastrointestinali; altri farmaci invece non possono essere assunti per via orale in quanto verrebbero inattivati o degradati dagli enzimi del succo gastrico e/o dalla forte acidità. Per superare questi problemi vengono applicate tecnologie di formulazione avanzata, che trovano un esempio nei profarmaci, atte a migliorare e ottimizzare la somministrazione dei farmaci stessi.

Particolare interesse sta assumendo la realizzazione di forme farmaceutiche capaci di rilasciare l'agente terapeutico in modo selettivo nel colon⁶² (fig. 3.3).

Questo obiettivo riguarda prevalentemente i farmaci:

- necessari per il trattamento di patologie locali: malattie specifiche del colon come la colite ulcerosa, il morbo di Crohn, il cancro rettale, la sindrome dell'intestino irritabile o la stipsi.
- il cui assorbimento deve essere ritardato per poter curare patologie che manifestano attacchi nelle prime ore del mattino (asma, angina pectoris).
- instabili (proteine o peptidi) o scarsamente assorbiti nelle porzioni superiori del tratto gastrointestinale⁶³.

Per profarmaco si intende un derivato, farmacologicamente inattivo, di un farmaco che suscita una risposta terapeutica in seguito alla sua conversione nella corrispondente forma attiva, tale processo richiede trasformazioni spontanee o di tipo enzimatico in vivo.

⁶¹ M.K. Chourasia, S.K. Jain, *J. Pharm.Sci. Review*(2003), 6 (1): 33-66.

⁶² V.R. Sinha, Rachna Kumria; *European J. Pharm. Sci*, (2003), 18, 3-18.

⁶³ P.J. Watts and L. Illum, *Drug Dev. Ind. Pharm*, (1997), 23, 893-913.

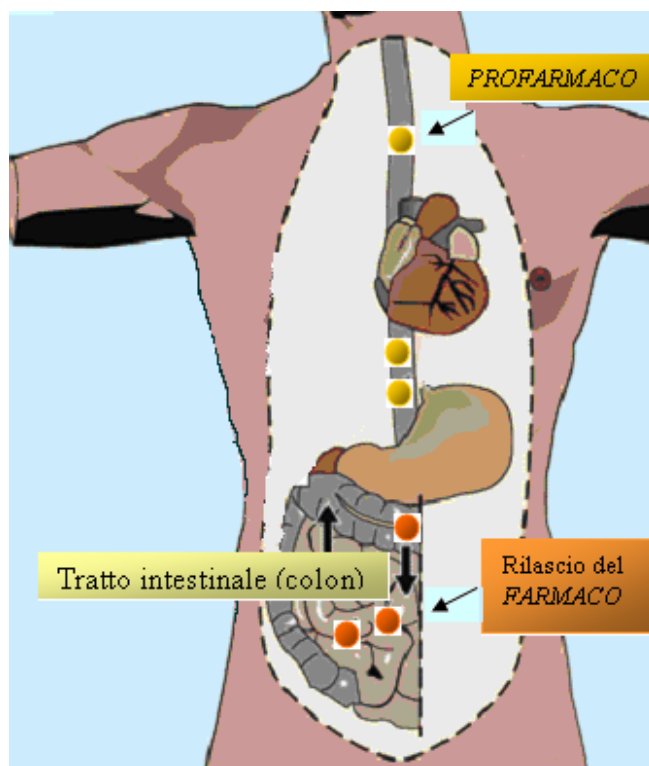


Figura 3.3

Esiste un'ampia varietà di sistemi che, sebbene dotati di caratteristiche differenti, possono essere annoverati nella categoria di profarmaci.

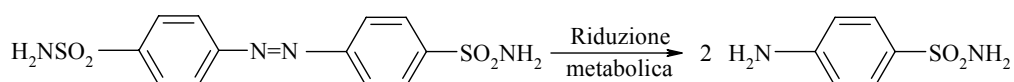
In termini generali i profarmaci possono essere suddivisi in due tipologie: bioprecursori e carriers; successivamente è anche possibile individuare delle sottoclassi di profarmaci in funzione della loro azione.

3.6.1 Bioprecursori

I profarmaci denominati bioprecursori sono composti che contengono originariamente il principio attivo all'interno della loro struttura. La corrispondente forma attiva di un profarmaco bioprecursore si rende disponibile in seguito alle trasformazioni metaboliche che si sviluppano in vivo.

Un esempio di quanto detto è il prontisil⁶⁴ (è stato il primo profarmaco; schema 3.2) che, nell'organismo, viene convertito a sulfanilammide: la sua forma metabolicamente attiva.

⁶⁴ Gareth T, *Medicinal Chemistry*, (2001), 364, Chichester U.K.



Schema 3.2

Un comportamento analogo si osserva nel caso della sulfasalazina: dopo metabolismo in vivo detto profarmaco rilascia l'acido 5-amminosalicilico (5-ASA); così come la ciclofosfamide che in seguito a metabolismo epatico è convertita nella mostarda fosforamidata, che è un agente antineoplastico di uso clinico.

3.6.2 I profarmaci tipo carrier

Queste strutture, diversamente a quanto visto per i bioprecursori, sono costituite dalla combinazione di un principio attivo e di un trasportatore per formare un composto dalle caratteristiche chimiche e biologiche desiderate.

In questo gruppo di profarmaci vi è sempre la presenza di un "gruppo spaziatore": un gruppo funzionale idrolizzabile, come un estere o un ammido, che ha la funzione di connettere il carrier e la specie attiva. In questo modo, dopo l'assorbimento, il sistema risulta facilmente metabolizzabile e di conseguenza il farmaco viene distribuito nei distretti dell'organismo appropriati.

3.7 Profarmaci macromolecolari e polimerici

Negli ultimi vent'anni la ricerca scientifica si è rivolta con crescente interesse verso lo studio dei profarmaci macromolecolari e in modo particolare dei polimeri solubili utilizzabili come carriers per i principi attivi.

Per realizzare un profarmaco di questo tipo è necessario legare il carrier polimerico opportuno all'agente terapeutico attraverso uno spaziatore biodegradabile⁶⁵ come riportato schematicamente in figura 3.4. Il farmaco viene rilasciato successivamente mediante idrolisi o processi enzimatici.

⁶⁵ Ringsdorf H, *J Polym Sci Polym Symp*, (1975), 51, 135.

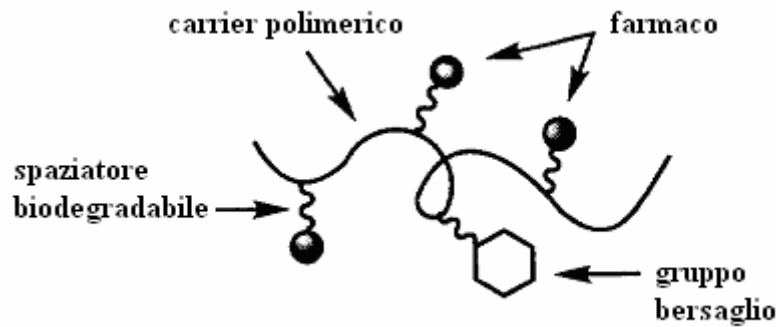


Figura 3.4

I polimeri scelti per la realizzazione di profarmaci macromolecolari possono essere distinti in funzione della natura chimica (polimeri vinilici o acrilici, polisaccaridi, poliamminoacidi), della stabilità della catena principale (in questo caso distinguiamo i polimeri biodegradabili da quelli stabili), dell'origine del polimero (naturale o sintetico) e del peso molecolare (oligomeri o polimeri).

È utile evidenziare che nella struttura di un profarmaco si rende necessaria la presenza di gruppi bersaglio che rendano specifico questo sistema verso un certo tessuto o una cellula. La catena polimerica principale, che solitamente è di natura biodegradabile e talvolta biostabile, presenta almeno tre porzioni funzionali: una porzione ha lo scopo di fissare l'agente terapeutico mediante legami covalenti (permanenti o temporanei), l'altra porzione consiste nello spaziatore che può essere necessario per promuovere la separazione tra farmaco e polimero, mentre la terza funge da gruppo bersaglio che può essere incorporato nel composto per indirizzare il farmaco da rilasciare verso il sito desiderato.

3.7.1 I macromolecolari coniugati

Una classe di profarmaci di particolare interesse è quella dei profarmaci macromolecolari coniugati. Questi composti contengono farmaci a basso peso molecolare e favoriscono il rilascio sfruttando i cambiamenti della solubilità e della dimensione molecolare di tali farmaci.

L'uso dei profarmaci coniugati è finalizzato ad evitare la rapida escrezione del farmaco dall'organismo, la sua metabolizzazione o gli effetti collaterali indesiderati. I coniugati si sono rivelati particolarmente validi in quanto hanno

mostrato ottimi risultati in termini di trasporto sito-specifico grazie alla porzione riconoscimento delle cellule target.

Tali proprietà dei coniugati possono differire in base alle diverse strutture con cui vengono realizzati. I coniugati polimero/farmaco sono riconducibili essenzialmente a tre tipologie strutturali: a pendaglio (figura 3.5 a); a catena principale (b); terminale (c).

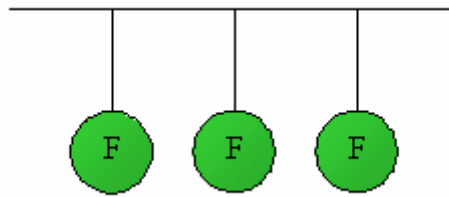


Figura 3.5 a

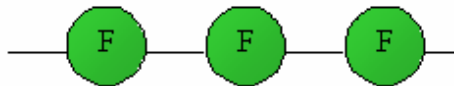


Figura 3.5 b

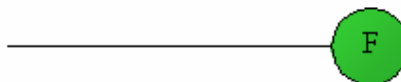


Figura 3.5 c

3.7.2 Strategie di coniugazione farmaco-polimero

Generalmente, il legame di tipo covalente risulta essere il sistema preferito di attacco del farmaco al polimero o al gruppo spaziatore unito alla catena polimerica. Affinché questi processi abbiano successo, le condizioni di reazione devono essere abbastanza blande in modo tale da attaccare al polimero il farmaco evitando di provocare effetti avversi sull'attività biologica del principio attivo. Alla luce di quanto detto, vari metodi di copulazione risultano essere i processi applicati con più successo.

Molti studi sui coniugati macromolecolari riportano l'impiego di gruppi funzionali come amminici, carbossilici e idrossilici per ottenere la coniugazione. Qualora sia coinvolta una struttura proteica, potrebbe occasionalmente reagire il gruppo tiolico libero presente a livello dei residui amminoacidici di cisteina.

Altri esempi sono rappresentati da esteri, ammidi, urea, uretani, e ponti disolfuro che sono generalmente usati per creare il coniugato polimero/farmaco. Come è stato precedentemente menzionato, possiedono una importanza rilevante nella coniugazione i gruppi spaziatori, in tal caso vengono utilizzati sostituenti come mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, esametilene e gruppi oligopeptidici .

3.8 Meccanismo di rilascio del principio attivo

Le molecole di farmaco sono spesso collegate ai loro carriers polimerici tramite gruppi spaziatori, generalmente queste possono raggiungere la cellula target attraverso due modalità alternative (fig. 3.6):

- ✓ durante la permanenza del profarmaco polimerico nella circolazione plasmatica, il farmaco viene rilasciato ed entra nella cellula per diffusione sotto forma di molecola libera
- ✓ l'intero coniugato farmaco-polimero⁶⁶ viene captato dalla cellula e si inserisce mediante processi di endocitosi .

Tra le due vie appena menzionate, la diffusione più idonea per un profarmaco macromolecolare risiede nel processo di endocitosi.

La principale conseguenza del legame covalente instaurato tra farmaco-polimero consiste nella limitazione della captazione cellulare del farmaco.

⁶⁶ Ouchi T, Ohya Y, *Prog Polym Sci*, (1995), 20, 211-257.

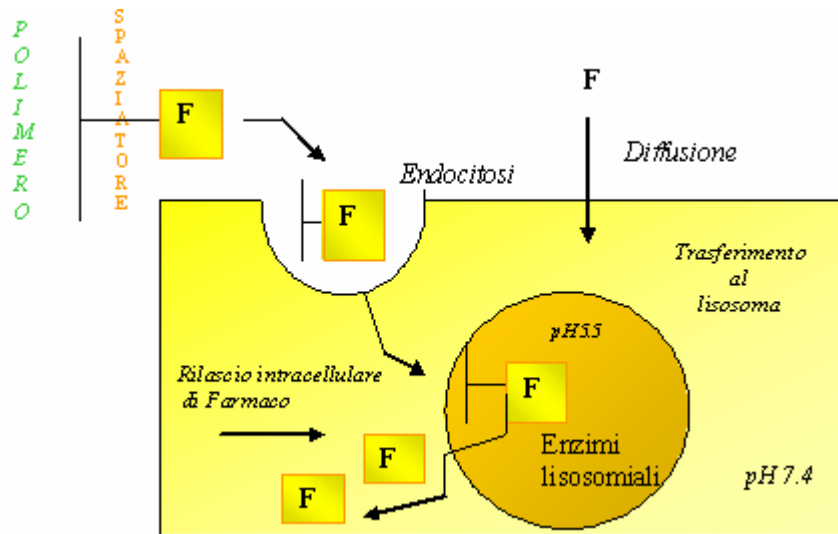


Figura 3.6

L'internalizzazione pinocitotica⁶⁷ coinvolge l'invaginazione della membrana con la concomitante cattura delle macromolecole seguita dal loro trasferimento nel compartimento endosomico della cellula. Successivamente molte macromolecole sono dirette, mediante una serie di eventi di fusione vescicolare, in un compartimento secondario assicurando esposizioni ripetute in ambiente acido.

I lisosomi sono delle vescicole intracellulari che contengono una varietà di enzimi (detti "lisosomiali") capaci di degradare numerose macromolecole naturali. In seguito a tale degradazione enzimatica, i prodotti macromolecolari rilasciati dal coniugato polimerico si riversano nel citoplasma.

Dunque risulta chiaro che la biodegradabilità dello spaziatore da parte degli enzimi lisosomiali è un prerequisito per rilascio di farmaci lisosomotropici (farmaci che possono entrare selettivamente nei lisosomi di certi tipi di cellule; questi possono essere utilizzati in chemioterapia).

In condizioni ideali, le macromolecole dovrebbero esser stabili e farmacologicamente inattive durante la circolazione nel letto vascolare; tuttavia è anche necessario che esse rilascino il composto attivo dopo la captazione nelle cellule.

⁶⁷ Duncan R, *Controlled Drug Delivery : fundamentals and applications*, (1987), 581-621.

Il rilascio del farmaco lisosomotropico dipende dalla scelta del farmaco, del carrier e del legame tra farmaco e carrier. È stato dimostrato che in vicinanza di tumore solido sono presenti livelli molto elevati di proteasi che non si trovano o si trovano in misura minore nei tessuti sani, sembra inoltre che molte proteasi abbiano un ruolo fondamentale nelle metastasi. Se lo spaziatore selezionato è un buon substrato per questi enzimi associati ai tumori è possibile un rilascio del farmaco che abbia tendenza a localizzarsi ed accumularsi in particolari organi e apparati danneggiati dal tumore (tumorotropici)⁶⁸.

3.9 Dinamiche di rilascio colon-specifico

Il colon è uno degli organi maggiormente studiati per il rilascio mirato di farmaci. Questo tipo di ricerca, che riguarda più specificamente le patologie di tipo locale del colon, è mirata non soltanto a ridurre le dosi di farmaco da somministrare ma anche ridurre gli effetti collaterali, obiettivo che si può raggiungere grazie alla realizzazione di profarmaci. Tali sistemi vengono realizzati appositamente per transitare inalterati nel tratto gastrointestinale superiore senza venire assorbiti, successivamente subiscono biotrasformazioni nel colon dove rilasciano il farmaco attivo. Le suddette biotrasformazioni sono eseguite da una diversità di enzimi, principalmente di origine batterica presenti nel colon come le azoreduttasi, glucuronidasi, glicosidasi, destranasi, esterasi, nitroreduzioni, ciclodestranasi. Sono stati valutati e preparati come dispositivi per il rilascio colon-specifico vari tipi di profarmaci con principi attivi legati a differenti carriers.

I parametri presi in considerazione nella progettazione di un opportuno profarmaco includono: scarso assorbimento e buona stabilità del profarmaco nel tratto gastrointestinale superiore; selettività di idrolisi da parte degli enzimi del colon con conseguente aumento di farmaco rigenerato in questo tratto.

Generalmente un profarmaco è idoneo come carrier farmacologico per il colon se è dotato di due importanti requisiti: deve essere idrofilo e di grandi dimensioni al fine di minimizzare l'assorbimento dal tratto gastrointestinale superiore ma, una

⁶⁸ *Connors T A, Knox R J, Stem Cells, (1995), 13, 501-511.*

volta nel colon, deve essere prontamente convertito in un principio attivo più lipofilo il quale risulta essere maggiormente disponibile per l'assorbimento.

Substrati come amminoacidi, glicosidi, glucuronidi, azo, destrani e ciclodestrani, rappresentano alcuni dei coniugati valutati per il rilascio colon-specifico. Focalizziamo l'attenzione su due tipologie di coniugati particolarmente importanti: gli azo-coniugati ed i polimerici.

3.10 Azo-coniugati

Gli ioni diazonio danno una reazione che ha applicazioni pratiche molto importanti nell'industria dei coloranti; si tratta della reazione di copulazione, in cui lo ione diazonio agisce da elettrofilo, dando reazioni di sostituzione sugli anelli aromatici attivati dalla presenza di un gruppo ossidrilico o amminico⁶⁹.

Gli azo composti, in forma di idrogel, sono stati sfruttati come materiale di rivestimento al fine di realizzare profarmaci specifici per il colon⁷⁰, non a caso tali molecole sono largamente metabolizzate dai batteri intestinali (sia da componenti enzimatiche intracellulari che da riduzioni extracellulari⁷¹).

Solitamente il farmaco risulta connesso al carrier mediante azo legami; questi ultimi generalmente sono stabili nel tratto gastrointestinale superiore per poi subire attacco nel colon da parte delle azoreduttasi prodotte dalla microflora colica.

Uno degli esempi più conosciuti riportati in letteratura riguarda la sulfasalazina, agente terapeutico inizialmente impiegato nel trattamento dell'artrite reumatoide e, successivamente, delle malattie intestinali di natura infiammatoria⁷². Tale composto presenta un azo legame tra il 5-ASA e la sulfapiridina (SP); nel colon le azoreduttasi tagliano gli azo legami rilasciando il farmaco 5-ASA ed il carrier sulfapiridina (fig. 3.7).

⁶⁹ Ege S, *Chimica Organica*, 1018, terza edizione.

⁷⁰ Mooter G V D, Maris B, Samyn C, Augustijns P, Kinget R, *J Pharm Sci*, (1997), 86, 1321-1327.

⁷¹ Kopecek J, Kopeckova P, *Oral Colonic Specific Drug Delivery*, (1992), 189.

⁷² Klotz U, *Clin Pharmacokinetic*, (1985), 10, 285-302.

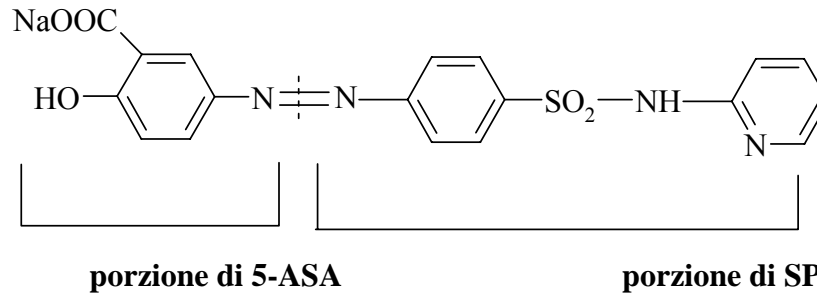


Figura 3.7

In seguito, rilevando che gli effetti avversi associati alla sulfasalazina erano attribuibili al carrier, è stata avviata una nuova linea di ricerca volta a definire un carrier idoneo per il 5-ASA con effetti collaterali minimi. I carriers proposti sono stati il p-amminoippurato (ipsalazide) ed il 4-amminobenzoil- β -alanina (balsalzide). Seguendo una differente strategia, due molecole di 5-ASA sono state unite tramite un azo gruppo per formare un profarmaco conosciuto come disodio azodisalicilato (olsalazina; fig. 3.8). In esso una molecola di 5-ASA è usata come carrier per l'altra molecola.

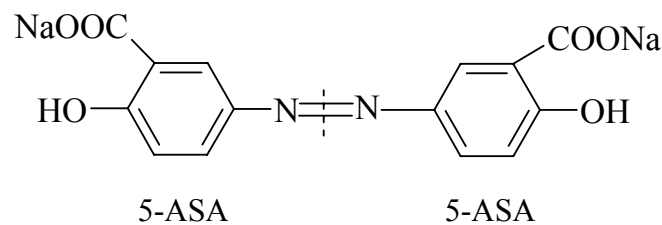


Figura 3.8

In condizioni normali del tratto gastrointestinale e della flora batterica, l'olsalazina rilascia un ammontare di 5-ASA due volte superiore rispetto a quello della sulfasalazina⁷³.

⁷³ Travis S P, Tysk C, De Silva H J, Sandberg-Gertzen H, Jewell D P, Jarnerot G, Gut, (1994), 35, 1282-1286.

Gli ultimi sviluppi della ricerca in questo ambito ci informano che gli azo coniugati responsabili delle migliori performance sono polimeri connessi a vari tipi di farmaco mediante azo legami, detti sistemi rientrano nel gruppo dei profarmaci polimerici.

CAPITOLO IV

MICROSFERE pH-SENSIBILI DI DESTRANO DERIVATIZZATO

4.1 Premessa

Nel settore dei sistemi a rilascio modificato di farmaco gli idrogel si sono distinti come un materiale molto promettente; lo studio di tali strutture ha avuto origine nel 1960, quando Wichterle e Lim⁷⁴ proposero l'utilizzo di matrici idrofiliche di poli(2-idrossietil metacrilato) nelle lenti a contatto⁷⁵. Da allora l'impiego di idrogel è stato esteso a varie applicazioni biomediche e farmaceutiche⁷⁶, infatti gli idrogel assomigliano ad un tessuto vivo naturale più di qualsiasi altra classe di biomateriali sintetici. È importante osservare che molecole di diversa grandezza possono diffondere verso l'interno di un idrogel (*drug loading*) o fuori da esso (*drug release*), questo suggerisce la possibile applicazione di matrici polimeriche secche o rigonfie come sistemi di rilascio di farmaco per via orale, nasale, rettale, vaginale, oculare e parenterale. Nel caso degli idrogel sensibili agli stimoli, il meccanismo di rilascio controllato di farmaco si innesca quando detto materiale percepisce un determinato stimolo nell'ambiente in cui si trova che può essere il pH, la temperatura, la forza ionica, un campo elettrico, una specifica sostanza o la sua differenza di concentrazione⁷⁷.

⁷⁴ Wichterle O., Lim D., (1960), *Nature*, 185, 117-118.

⁷⁵ Hoffmann A. S., (2002), *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 3-12.

⁷⁶ Peppas N. A. et al., (2000), *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 50, 27-46.

⁷⁷ Kost J., *Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery* (Mathiowitz, E., ed.), (1999), 445-459, John Wiley & Sons.

In figura 4.1 è riportata una rappresentazione schematica del comportamento di un idrogel sottoposto a differenti stimoli⁷⁸.



Figura 4.1

Il presente lavoro si pone l'obiettivo di realizzare un idrogel, di natura polimerica, in grado di veicolare un farmaco nell'organismo e di rilasciarlo in maniera mirata nel sito bersaglio (nel caso specifico a livello del colon).

Come materiale di base per l'allestimento di tali carriers è stato utilizzato il destrano, un polisaccaride di origine naturale ampiamente utilizzato nella realizzazione di forme farmaceutiche a rilascio modificato.

Attraverso un metodo di polimerizzazione radicalica in emulsione in fase inversa abbiamo ottenuto delle matrici di destrano chimicamente modificato in forma di microsfere. La forma sferica dei nostri campioni è necessaria per l'ottenimento di un rilascio uniforme in tutte le direzioni del principio attivo in esse caricato.

Nei sistemi realizzati con tale metodo, le catene di destrano sono reticolate mediante legami covalenti che conferiscono loro stabilità e resistenza meccanica maggiori rispetto ai sistemi in cui le stesse catene sono connesse tramite interazioni deboli. La polimerizzazione radicalica ha un meccanismo di crescita a catena che comincia con la formazione di radicali primari prodotti dalla scissione di un opportuno iniziatore. Affinché la reazione si propaghi sulle catene polisaccaridiche, consentendo la reticolazione, è necessario che siano presenti su tali catene dei gruppi funzionali in grado di interagire con le specie radicaliche e

⁷⁸ Kim S. W. e Bae Y. H., *Transport Processes in Pharmaceutical Systems* (Amidon G. L. et al., eds), (2000), 7-573, Marcel Dekker.

di convertirsi in centri attivi di propagazione. Questi gruppi funzionali, non presenti sulla molecola di destrano, sono introdotti attraverso un agente derivatizzante, il glicidil metacrilato (GMA).

Sono state ottenute matrici con caratteristiche differenti variando il loro grado di reticolazione, che a sua volta è dipendente dalla quantità di comonomero introdotto nella polimerizzazione e dalla percentuale di funzionalizzazione del destrano (DS); quindi le microsfere possono essere considerate un materiale versatile dalle proprietà modulabili. Dei materiali ottenuti è stata valutata, mediante il procedimento del Water Regain (WR), la capacità di assorbire e trattenere acqua nelle proprie maglie, dunque le possiamo classificare come degli idrogel, nonché il loro potenziale utilizzo come carriers terapeutici⁷⁹.

4.2 Derivatizzazione del destrano mediante glicidil metacrilato

Il destrano è un polimero caratterizzato da una struttura di base lineare costituita principalmente da legami 1,6- α -D-glucopiranosidici (fig. 4.2); si tratta di un polisaccaride⁸⁰ di origine batterica ottenuto dalla fermentazione da parte di colture di *Leuconostoc mesenteroides*. È un composto otticamente attivo, fortemente destrogiro e si trova in natura diffuso in numerosi lieviti e batteri.

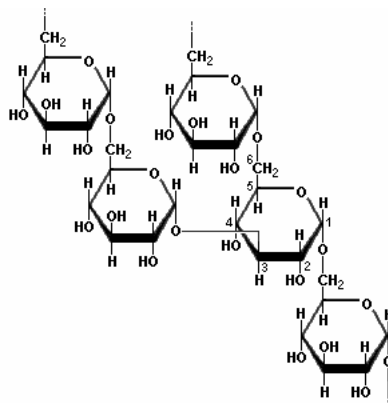


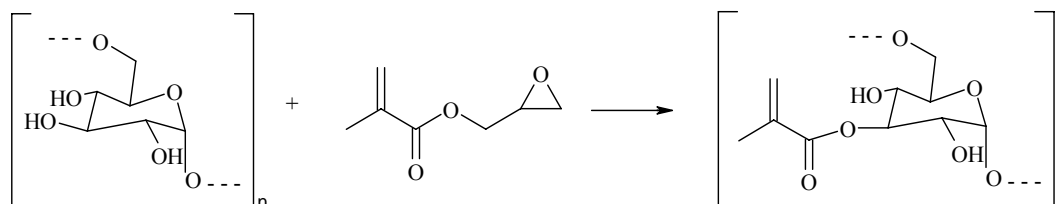
Figura 4.2

⁷⁹ Castiglione M., Puoci F., Iemma F., Privitera L., Spizzirri G.U., Curcio M., Picci N., *Chemistry Today*, (2007), 25(4), 9-11.

⁸⁰ Hovgaard L., Bronsted H., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, (1996), 13, 185-223.

L'inserimento del destrano in una struttura reticolata, come idrogel e microsfere, avviene dopo opportuna derivatizzazione con un agente chimico recante una funzionalità suscettibile di polimerizzazione radicalica. Il destrano, come altri polisaccaridi, può essere reticolato con agenti bifunzionali oppure derivatizzato con sostituenti che contengano doppi legami in grado di subire polimerizzazione, come i composti di tipo acrilico e metacrilico.

In accordo ai dati di letteratura⁸¹ la funzionalizzazione del destrano è stata condotta mediante metacrilazione del polisaccaride con GMA secondo la reazione descritta nello schema 4.1.



Schema 4.1

La reazione viene condotta in dimetilsolfossido (DMSO), a temperatura ambiente per 48 ore sotto costante agitazione⁸². Riproducendo le stesse condizioni sperimentali, abbiamo ottenuto la sintesi di destrano metacrilato (Ma-dex) altamente sostituito. Questo derivato ha infatti un grado di sostituzione teorico (ovvero il rapporto molare tra i gruppi metacrilici ed i residui di glucopiranosio) pari al 50%, cioè metà dei gruppi ossidrilici liberi del polisaccaride sono funzionalizzati con gruppi metacrilici. I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella 4.1.

⁸¹ W. N. E. van Dijk-Wolthuis, J. J. Kettenes-van den Bosch, A. van der Kerk-van Hoof, W. E. Hennink, *Macromolecules*, (1997), 30, 3411-3413.

⁸² van Dijk-Wolthuis W. N. E., Franssen O., Talsma H., van Steenberg M. J., Kettenes-van den Bosch J. J., Hennink W. E., *Macromolecules*, (1995), 28, 6317-6322.

DESTRANO	DMSO	4-DMAP	GMA	T	Ma-Dex	Sigla
g	ml	mg	ml	°C	mg	
1	9	200	450	25	833,74	D ₁

Tabella 4.1

Un'altra reazione di funzionalizzazione del destrano è stata effettuata riproducendo condizioni sperimentali simili a quanto riportato da Edman⁸³; invece di eseguire la reazione in un tampone carbonato a pH 11, si è utilizzata una soluzione di NaOH, di cui è stata variata la molarità per ottimizzare le rese della reazione. Sebbene sia noto che in queste condizioni non è possibile ottenere elevati gradi di sostituzione del destrano, è innegabile che lo svolgimento della reazione in ambiente acquoso piuttosto che in DMSO sia molto più indicato per la realizzazione di un materiale che deve avere applicazioni di tipo farmaceutico. Nella tabella 4.2 sono riportati i risultati ottenuti con questo tipo di derivatizzazione.

DESTRANO	NaOH	GMA	T	Ma-Dex	Sigla
mg	ml/N	μl	°C	mg	
500	15/1.0	225	25	305,45	D ₄

Tabella 4.2

4.2.1 Dialisi per ultrafiltrazione

Al termine del processo di derivatizzazione è stato necessario purificare la soluzione di destrano funzionalizzato dalle tracce di GMA non reagito.

La purificazione si è ottenuta mediante la tecnica della dialisi per ultrafiltrazione che consiste nella diffusione delle impurezze (in funzione delle loro dimensioni e del gradiente di concentrazione) attraverso una membrana semipermeabile.

Si trasferisce la soluzione di destrano in alcuni tubi da dialisi che vengono successivamente immersi in una vasca contenente acqua distillata, in tal modo le

⁸³ Edman P., Ekman B., Sjöholm I., *J. Pharm. Sci.*, (1980), 69 (7), 838-842.

impurezze diffondono continuamente verso l'acqua poiché in essa la loro concentrazione è nulla. La dialisi è stata condotta per 24 ore rinnovando più volte l'acqua della vasca. Infine il destrano funzionalizzato è stato recuperato liofilizzando la soluzione dializzata.

4.3 Microsfere di destrano da polimerizzazione radicalica

La produzione di microsfere di destrano mediante la polimerizzazione di tipo radicalico consente di ottenere sistemi di rilascio dalle caratteristiche versatili che possono trovare numerose ed importanti applicazioni terapeutiche.

La polimerizzazione radicalica prevede un meccanismo di crescita a catena che ha inizio con la generazione di radicali primari in seguito alla scissione di un opportuno iniziatore⁸⁴. Questi radicali andranno poi a reagire con le funzioni metacriliche presenti sulle catene di destrano, precedentemente derivatizzato, determinandone la reticolazione progressiva. Nel nostro caso abbiamo utilizzato la tecnica della polimerizzazione in emulsione in fase inversa al fine di realizzare carriers di destrano microsferici (fig 4.3).

Tale metodo consiste nell'aggiunta di una soluzione acquosa di un monomero e di un comonomero (fase dispersa) in un eccesso di solventi organici miscibili fra loro (fase disperdente). Sotto vigorosa agitazione, si formano piccole gocce di fase dispersa che assumono forma sferica per minimizzare l'energia libera interfacciale. La densità della fase organica viene regolata per aggiunta di uno dei due solventi, fino al raggiungimento di un equilibrio indifferente tra la fase dispersa e quella disperdente.

⁸⁴ Muzzalupo R., Iemma F., Picci N., Pitarresi G., Cavallaro G., Giammona G., *Colloid. Polym. Sci.*, (2001), 279, 688-695.

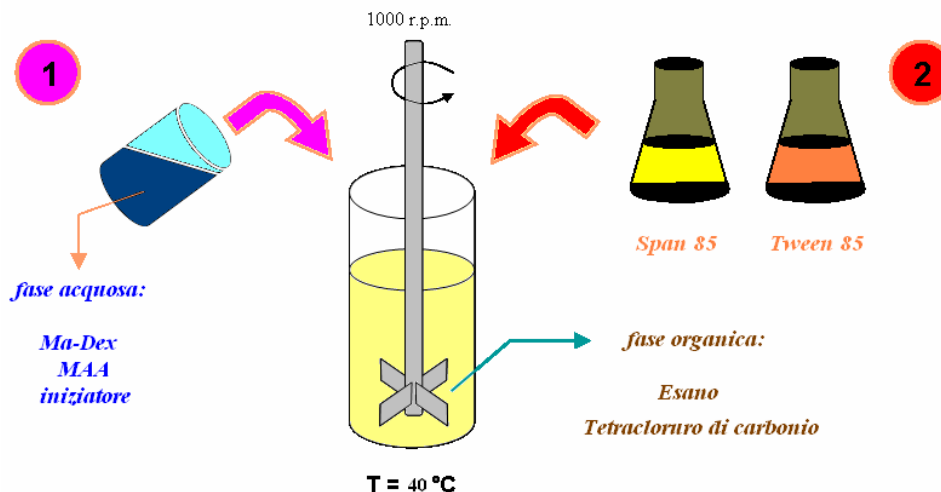


Figura 4.3

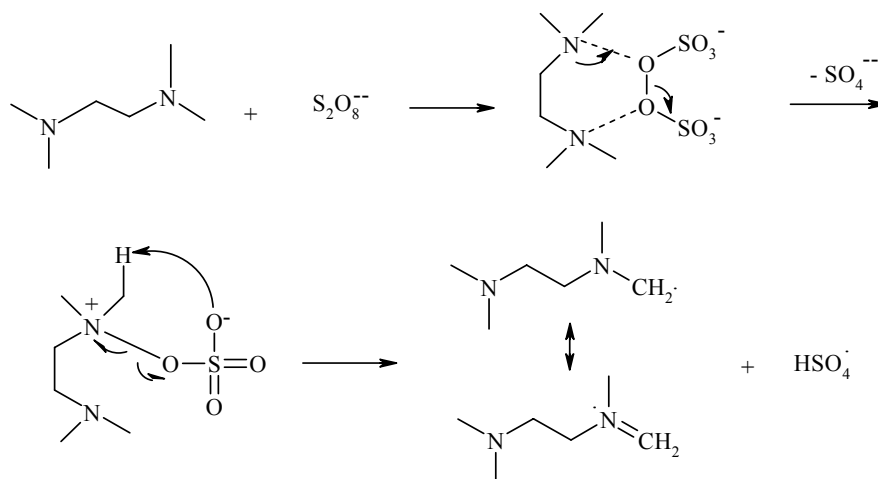
La nostra fase dispersa è costituita da una soluzione acquosa di destrano funzionalizzato (monomero), dall'acido metacrilico (MAA) come comonomero (fig. 4.4 a) ed in alcuni casi da un agente bifunzionale, la N,N'-etilenbisacrilamide (EBA) (fig. 4.4 b).



Figura 4.4

Questa fase è stata sospesa in una miscela di solventi organici composta da tetracloruro di carbonio ed esano. Successivamente sono stati aggiunti come tensioattivi il sorbitan trioleato (Span 85) ed il poliossietilenglicole sorbitan trioleato (Tween 85). La dimensione e la stabilità delle gocce di fase dispersa possono essere regolate sia mediante l'aggiunta di tensioattivi che attraverso l'agitazione. La polimerizzazione è stata avviata in seguito all'aggiunta (sotto agitazione) dell'iniziatore radicalico: il persolfato d'ammonio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ che si

decomporre per formare radicali primari alla temperatura di circa 40 °C. Successivamente, abbiamo aggiunto la N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TMEDA), che agisce da acceleratore nella decomposizione del persolfato d'ammonio (schema 4.2).



Schema 4.2

È stato osservato che la reazione va a completezza dopo circa due ore.

Con il procedimento appena descritto sono stati realizzati cinque tipi di matrici polimeriche di forma microsferica.

I risultati ottenuti dalle varie matrici sono riassunti nelle tabelle 4.3 e 4.4.

Fase Dispersa			Fase Disperdente		Sistema Iniziatore		Resina	
D ₁ mg	MAA μl	H ₂ O ml	CCl ₄ /Esano ml/ml	Span 85 μl	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ mg	TMEDA μl	Mg	Sigla
720	33	3	17/21	150	80	150	746	M1
360	33	3	17/21	150	80	150	488	M2

Tabella 4.3

Fase Dispersa				Fase Disperdente		Sistema Iniziatore		Resina	
D ₁ mg	MAA μl	EBA mg	H ₂ O ml	CCl ₄ /Esano ml/ml	Span85/ Tween85 μl	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ mg	TMEDA μl	mg	Sigla
360	33	100	3	17/21	120/30	80	150	467	M3
360	50	80	3	17/21	120/30	80	150	208	M4
360	150	100	3	17/25	120/30	80	150	663	M5

Tabella 4.4

Come si può notare nelle tabelle sopra riportate, l'acido metacrilico è stato utilizzato come monomero funzionale al fine di ottenere una matrice sensibile ad una variazione di pH.

Sono state realizzate resine pH-sensibili utilizzando anche un ulteriore reticolante (EBA) così da impartire ai materiali una maggiore resistenza meccanica.

4.4 Caratterizzazione delle microsfere

Le matrici polimeriche ottenute sono state caratterizzate attraverso:

- Misure del grado di rigonfiamento in soluzioni acquose a diverso valore di pH
- Spettrofotometria FT-IR
- Analisi dimensionale
- Microscopia elettronica a scansione

4.4.1 Determinazione del grado di rigonfiamento

Per valutare l'affinità delle particelle nei confronti dei mezzi acquosi, è stato determinato il loro grado di rigonfiamento (WR%) ponendo in contatto delle aliquote di matrice esattamente pesate con soluzioni di HCl 0.1 N (pH=1) e PBS 0.01 M (pH=7.4) fino al raggiungimento dell'equilibrio di rigonfiamento. A questo punto ogni campione rigonfio è stato filtrato, recuperato e pesato. Il

contenuto di acqua inglobato dalle matrici è stato determinato secondo l'equazione:

$$WR(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100$$

Dove W_s e W_d rappresentano i pesi dei campioni di resina rigonfi d'acqua e secchi rispettivamente.

I dati ottenuti sono riportati nella tabella 4.5.

VALORI DI WATER REGAIN					
	Matrici				
	M1	M2	M3	M4	M5
Ambiente acido	364%	217%	207%	106%	91%
Ambiente neutro	581%	239%	265%	153%	287%

Tabella 4.5

I dati sopra riportati mostrano che il rigonfiamento delle matrici è pH-dipendente. Tuttavia tra tutti i tipi di resina quello che presenta un maggiore rigonfiamento pH-dipendente è il polimero M5.

4.4.2 Analisi FT-IR

Sono stati realizzati gli spettri FT-IR del destrano, del destrano funzionalizzato (D_1) e di tutte le resine sintetizzate (si riporta unicamente lo spettro della matrice M5 in quanto più caratteristico) (fig. 4.5 - 4.7) con la finalità di valutare: inizialmente l'avvenuta funzionalizzazione del destrano ed in seguito la presenza di tale comonomero nella resina.

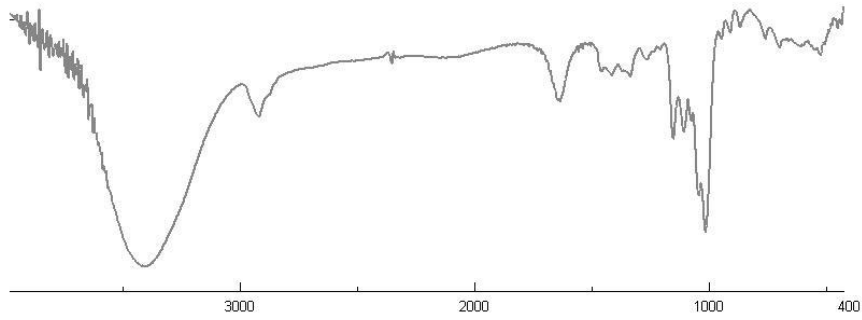


Figura 4.5 Destrano

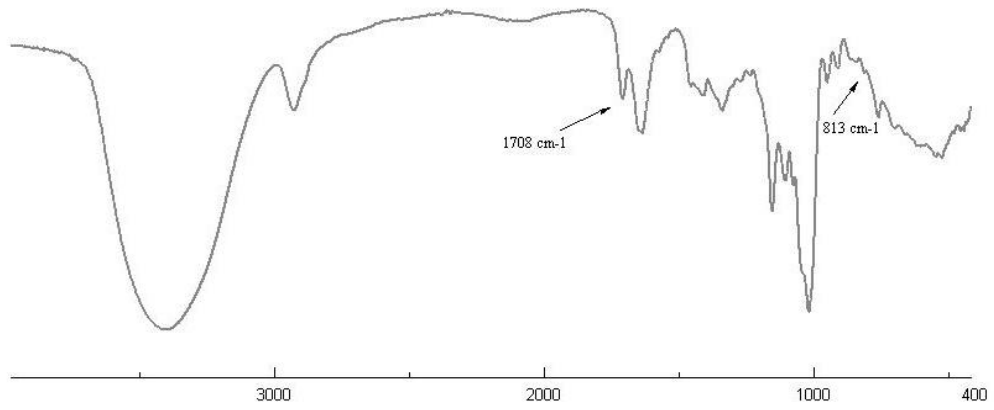


Figura 4.6 D₁

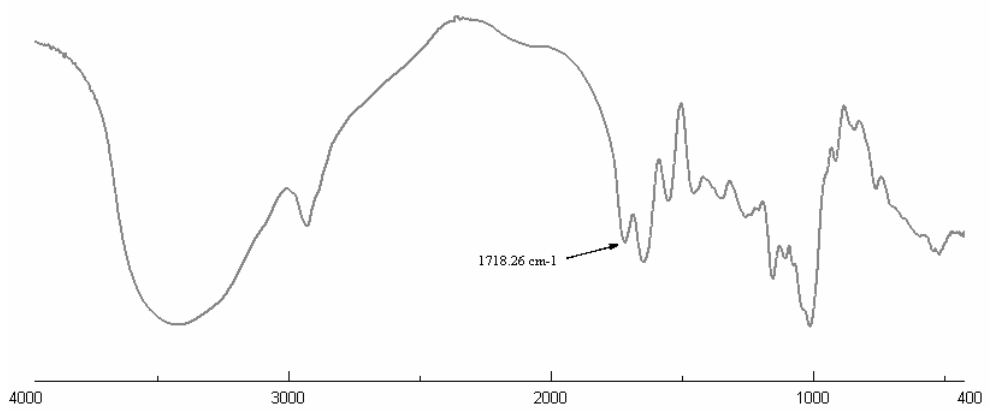


Figura 4.7 M₅

Nel campione D₁ la presenza del gruppo metacrilico è confermata dalla comparsa di due bande, a 1708 cm⁻¹ e a 813 cm⁻¹, corrispondenti rispettivamente al gruppo carbonilico ed al doppio legame della funzione metacrilica. Queste bande sono invece assenti nel destrano non sostituito, e ciò è prova dell'avvenuta funzionalizzazione.

Per quanto riguarda il polimero M5, la presenza del comonomero è evidenziata da una banda netta a 1718 cm⁻¹ che è correlabile al gruppo carbossilico dell'acido metacrilico nella matrice; inoltre scompare la banda a 813 cm⁻¹, caratteristica dello stretching del doppio legame.

4.4.3 Analisi dimensionale

Il diametro medio delle particelle di norma varia da 1 nm fino a 500 μm, ma l'intervallo più comune è rappresentato da 50-60 μm. I fattori principali che influiscono sulla dimensione delle particelle sono riconducibili alla natura ed ai rapporti relativi delle sostanze usate, nonché alla velocità ed al tipo di agitazione, alla forma ed alle dimensioni del reattore. Il diametro medio delle microsfere è direttamente proporzionale alla tensione superficiale tra le due fasi liquide ed alla frazione di volume della fase dispersa, mentre è inversamente proporzionale alla velocità di agitazione, alla densità delle gocce di monomero ed alle dimensioni delle pale di agitazione.

È stata eseguita l'analisi dimensionale della matrice M5, usando uno stereomicroscopio collegato ad un analizzatore di immagini. Le distribuzioni dimensionali sono riportate nel grafico 4.1.

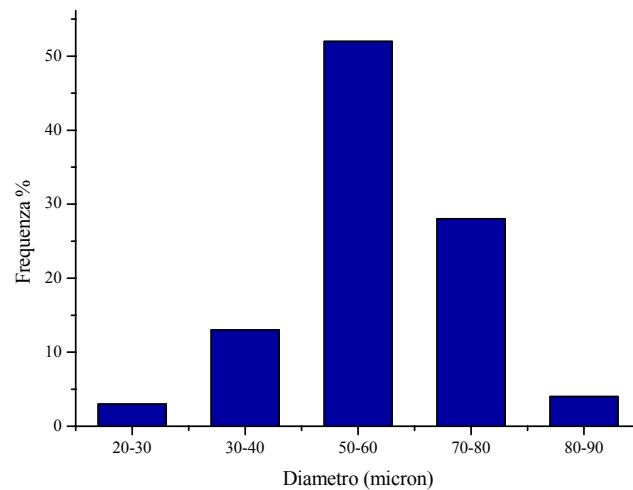


Grafico 4.1

4.4.4 Analisi morfologica

L'analisi morfologica, effettuata sulla matrice M5, ha evidenziato la realizzazione di sistemi microparticellari di forma sferica con un range di dispersione molto ristretto, come mostrato dalla micrografia a scansione elettronica (fig. 4.8).

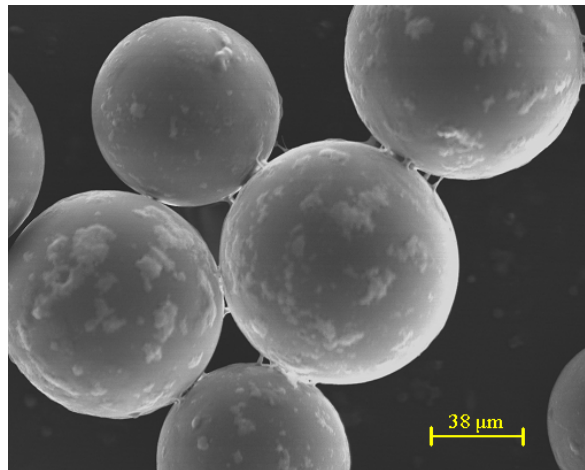


Figura 4.8

4.5 Caratteristiche del 5-Fluorouracile e suo rilascio

Il primo farmaco scelto per il caricamento della matrice sintetizzata è stato il 5-fluorouracile (5-FU) (fig. 4.9).

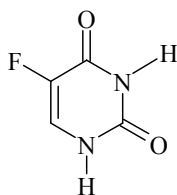


Figura 4.9

Il 5-FU è un farmaco antineoplastico⁸⁵ che ha trovato impiego nella terapia di numerosi adenocarcinomi e soprattutto del carcinoma al colon retto. Il suo meccanismo d'azione prevede l'inibizione della sintesi del DNA e dunque la morte delle cellule neoplastiche. Il principale limite del 5-FU è rappresentato dalla breve emivita, ciò implica che il farmaco sia somministrato per via endovenosa.

Il cancro del colon rappresenta la quarta neoplasia nel mondo; generalmente è una neoplasia dell'età media, abbastanza rara sotto i 40 anni, con un picco tra i 60 ed i 70 anni. Tra i fattori generali di rischio, l'età ed il sesso non rappresentano di per sé fattori importanti, mentre hanno una rilevanza significativa determinate patologie ereditarie, la dieta ed i polipi colon-rettali. Attualmente il trattamento standard consiste in una iniezione endovenosa di 5-FU modulata mediante acido folico⁸⁶⁻⁸⁷.

Pochi sono stati gli approcci descritti finora per realizzare una somministrazione orale di 5-FU; di recente sono state proposte formulazioni dipendenti dalla degradazione enzimatica, che sono in grado di combinare un trattamento farmacologico efficace con una riduzione degli effetti collaterali⁸⁸. I problemi maggiori relativi a questo tipo di formulazioni sono legati alle variazioni del tempo di transito nel colon, con il rischio che la degradazione di questi sistemi sia incompleta e venga rilasciata una quantità insufficiente di farmaco. Questi

⁸⁵ Katzung BG, *Farmacologia generale e clinica*, (2000), IV, 946-947

⁸⁶ Van Cutsem E., Peeters M., Verslype C., Filez L., Haustermans K., Janssens J., *Hepatogastroenterology*, (1999), 46, 709-716.

⁸⁷ Labianca R., Beretta G. D., Pessi M. A., *Drugs*, (2001), 61, 1751-1764.

⁸⁸ Krishnaiah Y. S., Satyanarayana V., Dinesh Kumar B., Karthikeyan R. S., *Eur. J. Pharm. Sci.*, (2002), 16, 185-192.

inconvenienti possono essere minimizzati attraverso una riduzione delle dimensioni del sistema polimerico che funge da carrier del farmaco, dal momento che carrier di piccole dimensioni permangono più a lungo nella porzione distale dell'intestino⁸⁹.

È possibile ipotizzare che il materiale da noi sintetizzato, data la sua natura chimica (a base di destrano) facilmente degradabile ed il suo comportamento pH-sensibile, offra un rilascio controllato del farmaco e colon specifico.

4.6 Impregnazione del 5-FU su microsfere di destrano

Una quantità nota di farmaco viene disciolta in un opportuno solvente, quindi si aggiunge una quantità esatta di matrice. Il sistema viene mantenuto sotto costante agitazione per 3 giorni, in seguito la matrice con il farmaco impregnato viene essiccata. Nella procedura di caricamento per impregnazione, il farmaco stabilisce delle interazioni deboli con la matrice; queste interazioni riguardano prevalentemente la superficie della matrice, ma una certa quantità di farmaco interagisce anche con la struttura più interna. Questa quantità dipende dalla natura chimica della matrice e del farmaco caricato, ed è direttamente proporzionale alla durata del processo di caricamento.

4.7 Valutazione del rilascio mediante analisi HPLC

Per valutare le proprietà di rilascio delle microsfere impregnate, è stato eseguito un saggio riportato nella USP XXII⁹⁰ che consente di ricreare in vitro le condizioni biologiche in cui si trova il carrier dopo l'assunzione per via orale. Le matrici sono state poste in una soluzione a pH = 1, per simulare l'ambiente gastrico, ed in un'altra soluzione a pH = 6.8 per mimare i fluidi intestinali, l'esperimento si è svolto alla temperatura di 37° C (pari a quella corporea).

⁸⁹ Lamprecht A., Yamamoto H., Takeuchi H., Kawashima Y., *J. Control. Release*, (2003), 90, 313-322.

⁹⁰ USP XXII, *test di rilascio di farmaci, metodo A per particelle con rivestimento gastroresistente*.

La quantità di farmaco liberata dalle microsfere di destano e l'andamento seguito dal rilascio non sono elementi facilmente prevedibili. Infatti questo fenomeno è funzione di numerose variabili quali:

- l'interazione stabilita tra farmaco e destano;
- la capacità di *swelling* (o idrorigonfiabilità) della matrice;
- la larghezza delle maglie della proteina reticolata (da questo dipende anche la quantità di farmaco che riusciamo a caricare sulla microsfera);
- l'interazione tra farmaco e mezzo esterno, ovvero la sua solubilità nel mezzo.

Il prevalere di un fattore sugli altri può determinare l'esito del rilascio ma, più probabilmente, il risultato finale scaturisce dalla particolare combinazione dei suddetti parametri che si stabilisce per ogni singolo caso.

Di seguito è riportato il rilascio gastro-intestinale del 5-FU.

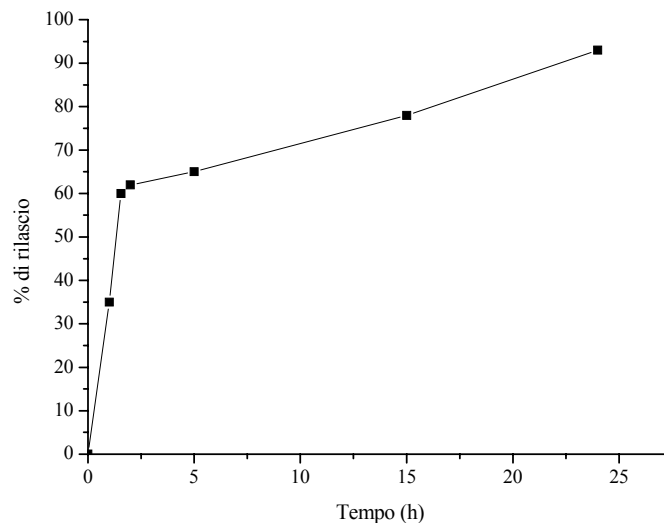


Grafico 4.2

Come è possibile notare nel grafico 4.2 il farmaco è rilasciato rapidamente nelle prime 2 ore, rilascio definito *burst release*.

Tale rilascio non controllato è da imputare ad un'interazione (minima) tra il farmaco e la superficie del materiale. Successivamente alle 2 ore è possibile notare un rilascio controllato del restante farmaco.

La formulazione, così ottenuta non evidenzia un rilascio pH-sensibile, probabilmente dovuto alla scarsa interazione del farmaco con il materiale.

4.8 Impregnazione della Teofillina e rilascio da microsfere di destrano

La matrice è stata impregnata anche con la teofillina, un alcaloide presente nelle foglie di tè e derivato dimetilico della xantina usato soprattutto per la sua potente azione broncodilatatrice, antiasmatica, in minor misura per le sue azioni diuretica e coronarodilatatrice (fig. 4.10), allo scopo di valutare che il rilascio dipende anche dalle interazioni che si stabiliscono tra farmaco e matrice, auspicando una maggiore interazione di questo farmaco con il materiale.

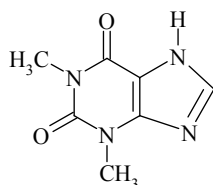


Figura 4.10

I dati relativi al rilascio gastro-intestinale della teofillina vengono riportati nel grafico 4.3.

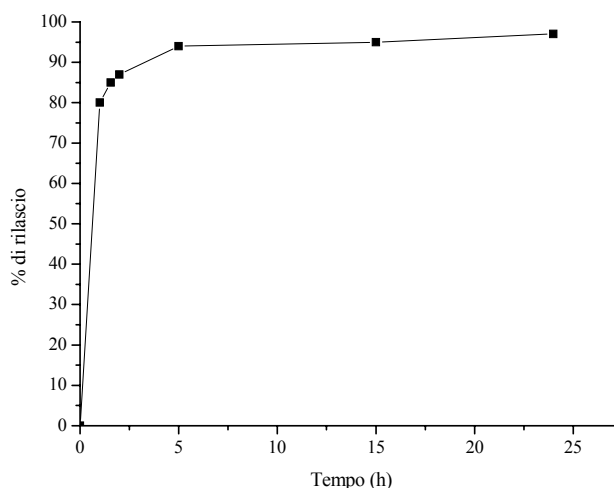


Grafico 4.3

Come si evidenzia dal grafico, il rilascio della teofillina è immediato, raggiunge altissime percentuali già nei primi 30 minuti e va a completezza nell'arco delle 6 ore. Questo sta a significare che la teofillina presenta una minore affinità per il materiale rispetto a quella del 5-FU.

4.9 Conclusioni

Scopo del presente lavoro è stato la realizzazione di particelle idrorigonfiabili, di forma microsferica a base di destrano derivatizzato, applicabili in campo medico sanitario per il rilascio modulato di principi attivi sul sito bersaglio. Inoltre tale matrice da noi realizzata e caratterizzata presenta un comportamento pH-sensibile. Le prove di rilascio dalla matrice polimerica M5 mostrano una bassa affinità dei due farmaci testati per tale polimero. Comunque è possibile ipotizzare, data la natura chimica facilmente degradabile ed il suo comportamento pH-sensibile, che una modifica nella struttura del polimero possa aumentare l'affinità del principio attivo con la matrice.

CAPITOLO V

RILASCIO COLON-SPECIFICO DI 5-ASA DA MICROPARTICELLE DERIVATIZZATE

5.1 Premessa

Per venire incontro alle esigenze dell'esperienza clinica, la più recente ricerca nel settore farmaceutico ha esteso le sue sperimentazioni verso lo studio e la realizzazione di dispositivi aventi come obiettivo principale il rilascio mirato di farmaci in specifici distretti dell'organismo.

Una classe di molecole che presenta delle caratteristiche adeguate per la liberazione mirata di farmaci è quella dei profarmaci polimerici, sistemi che possiedono elevate proprietà di *Drug Delivery Systems*.

Tra i possibili siti biologici interessati all'azione dei DDS, il colon suscita maggiori aspettative, in questa sede infatti l'uso dei profarmaci colon-specifici è finalizzato a migliorare le condizioni di rilascio di agenti terapeutici, principalmente quelli prescritti per il trattamento delle malattie infiammatorie dell'intestino.

Nel presente capitolo verranno descritte le reazioni necessarie alla realizzazione di un carrier di tipo polimerico che abbia delle funzioni specifiche per il trasporto dell'acido salicilico. Tale carrier consente all'acido 5-amminosalicilico (5-ASA) di attraversare l'ambiente acido dello stomaco, conservandolo inerte e, successivamente, di ottenere un suo rilascio specifico a livello del colon⁹¹.

Nella prima fase il lavoro si è concentrato sulla progettazione di un materiale polimerico microparticellare contenente sulla superficie gruppi funzionali idonei ad instaurare un legame con il principio attivo. Pertanto è stato realizzato un materiale che presenta in superficie anelli epossidici ai quali si lega covalentemente una porzione 4-nitrobenzenica attraverso l'attacco nucleofilo del

⁹¹ Puoci F., Iemma F., Spizzirri U.G., Cirillo G., Castiglione M., Picci N., *Macromolecules An Indian Journal*, (2007), 3(2), 64-70.

gruppo amminico della 4-nitroanilina. La riduzione del nitro gruppo e la successiva trasformazione in sale di diazonio, consente di ottenere un materiale sul quale è possibile effettuare una reazione di copulazione con l'acido 2-idrossibenzoico.

Il materiale risultante da tutte queste trasformazioni chimiche della superficie delle microparticelle si caratterizza come un potenziale profarmaco (figura 5.1).

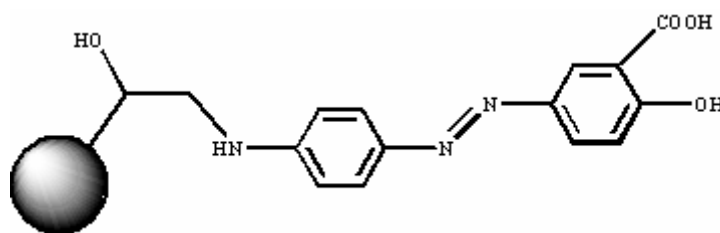


Figura 5.1

Un polimero, così fatto, è in grado di percorrere inerte il transito all'interno dello stomaco, eludendo il forte pH, riuscendo in tal modo a raggiungere l'intestino, qui avviene la scissione del *ponte diazo*, grazie alla presenza delle azo-reduttasi (colonia batterica all'interno del lume intestinale) con conseguente liberazione dell'acido 5-amminosalicilico che in tale sede svolge la sua funzione antinfiammatoria.

Prima di osservare i risultati desiderati sono stati eseguiti numerosi tentativi per ogni passaggio di questo progetto di ricerca al fine di ottimizzare condizioni di reazione e rese in termini di conversione dei gruppi funzionali. Di seguito sono riportate in dettaglio le fasi di tutto il processo.

5.2 Realizzazione del supporto microparticellare

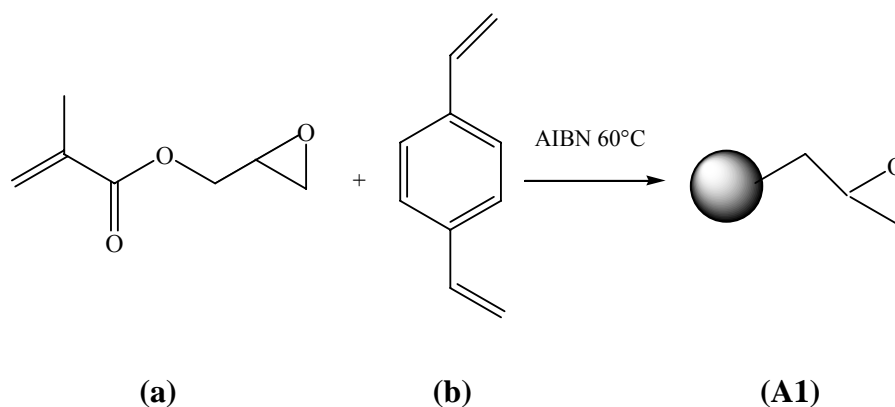
Il primo passo dell'intero processo consiste nella realizzazione di una matrice microparticellare che possiede ottime qualità per successive funzionalizzazioni. La matrice in questione è stata preparata mediante reazione di copolimerizzazione radicalica tra il glicidimetacrilato (GMA; schema 5.1 a) ed il divinilbenzene (DVB; sch. 5.1 b), quest'ultimo, che ha la funzione di reticolante, possiede anche

un grado di idrofobicità tale da conferire al supporto la capacità di non rigonfiare in mezzi acquosi.

Come iniziatore è stato utilizzato il 2,2'-azobisisobutirronitrile (AIBN) a 60° C.

In questo modo si ottengono dei gruppi epossidici sulla superficie del polimero (sch. 5.1 A1) che possono subire reazioni di tipo nucleofilo; l'anello ossiranico, infatti, rappresenta un ottimo gruppo funzionale di facile apertura, molto utile per la formazione di nuovi legami e dunque adatto ad ancorare un qualunque composto (farmaco, inibitore, etc). L'anello ossiranico funge anche da residuo idrofilico sulla superficie della microsfera, riducendo potenziali interazioni idrofobiche in mezzi acquosi e creando i presupposti per la mucoadesione del sistema.

La tecnica di polimerizzazione seguita è stata quella "per precipitazione", un metodo abbastanza recente che si basa sul diverso grado di solubilità esistente tra monomero e corrispondente polimero⁹²: il processo di polimerizzazione ha luogo in un mezzo che risulta essere un solvente per il monomero mentre un non solvente per il polimero, in queste condizioni non appena si genera il germe del polimero, trovandosi in non solvente, quest'ultimo avrà tendenza a precipitare. In tal modo si recupera il prodotto polimerizzato.



Schema 5.1

⁹² Puoci F, Iemma F, Muzzalupo R, Spizzirri U G, Trombino S, Cassano R, Picci N, *Macromol Biosci*, (2004), 4, 22-26.

La tecnica adottata consente di realizzare nanosfere con intervallo dimensionale ristretto modulando opportunamente le condizioni di reazione; inoltre produce polimeri solidi con facilità ed elevato grado di purezza.

Al termine di questo step la resina ottenuta (A1) viene filtrata e lavata abbondantemente con differenti solventi, filtrata ed infine essiccata.

Il polimero si presenta come un materiale microsferico bianco, avente come sito di legame (*binding*) l'anello epossidico.

5.3 Caratterizzazione della matrice epossidica

La matrice polimerica ottenuta è stata caratterizzata attraverso:

- microscopia elettronica a scansione (SEM)
- spettrofotometria FT-IR
- analisi dimensionale

In figura 5.2.1 e 5.2.2 riportiamo l'esito dell'analisi SEM condotta sul polimero; è possibile osservare la forma sferica (4-5 μm) della matrice realizzata e la sua monodispersione. Le nanosfere si presentano con struttura rigida e superficie liscia.

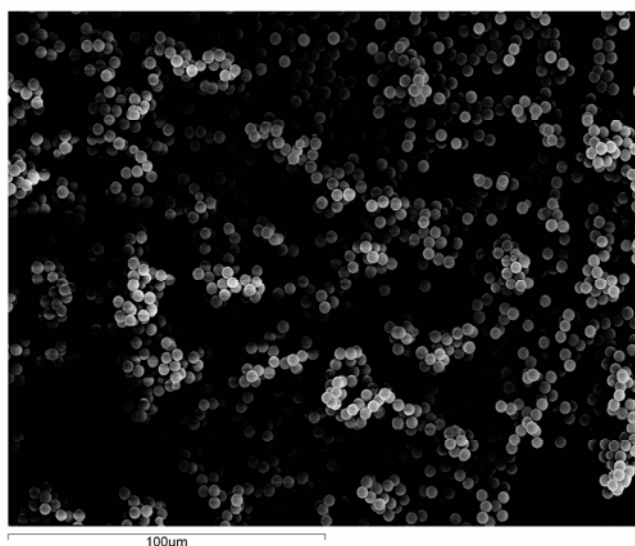


Figura 5.2.1

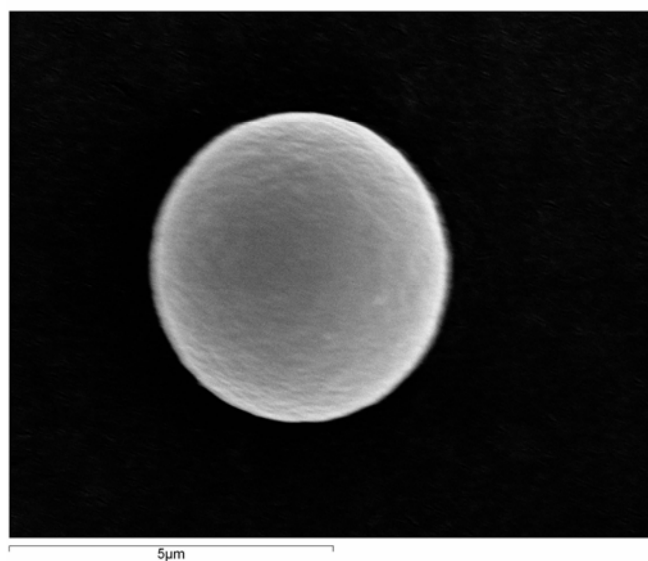


Figura 5.2.2

Lo spettro FT-IR corrispondente alla resina A1 rivela la presenza delle bande caratteristiche dei monomeri impiegati nella sintesi di A1 (fig. 5.3).

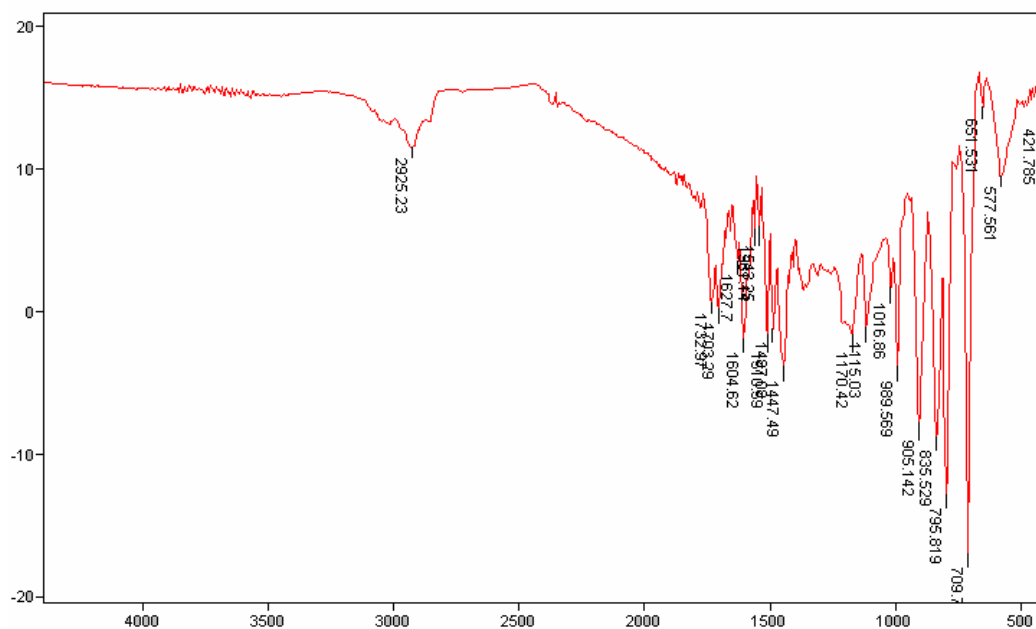


Figura 5.3 A1

Per ottenere informazioni circa il diametro particellare della matrice epossidica è stata eseguita un'analisi dimensionale. Le matrici delineano un range dimensionale ristretto, quasi omogeneo, rappresentato dall'ordine dei 4-5 μm . Queste caratteristiche sono influenzate da fattori come le sostanze utilizzate nella sintesi, la velocità ed il tipo di agitazione.

Inoltre bisogna valutare che il diametro medio delle nanosfere è direttamente proporzionale alla tensione superficiale tra le due fasi liquide ed alla frazione di volume della fase dispersa, mentre è inversamente proporzionale alla velocità di agitazione ed alla densità delle gocce di monomero.

I dati relativi alla distribuzione dimensionale sono riportati nel grafico 5.1.

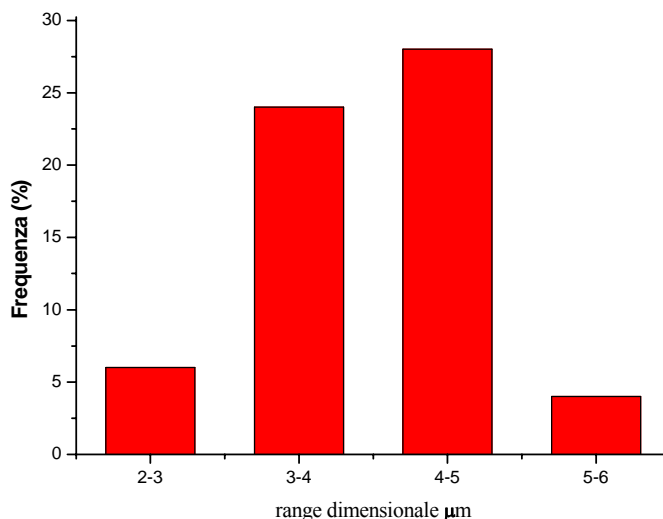


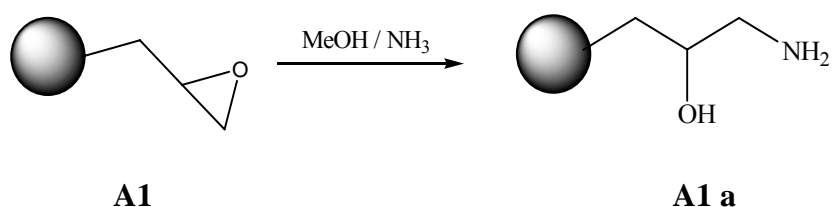
Grafico 5.1

Su questa matrice iniziale è stato inoltre effettuato un saggio per definire il grado di funzionalizzazione dei gruppi epossidici presenti sulla superficie delle microparticelle come spiegato di seguito.

5.3.1 Determinazione dei gruppi ossirani disponibili

Allo scopo di determinare il numero delle funzioni epossidiche presenti sulla superficie di A1 si ricorre ad un metodo indiretto⁹³: si induce l'apertura dell'eossido mediante trattamento del polimero con ammoniaca metanolica, si ottengono in tal modo dei gruppi amminici terminali (A1 a) la cui quantità è uguale a quella dei gruppi ossirani inizialmente presenti.

La reazione di funzionalizzazione appena descritta permette di evidenziare la concentrazione dei siti di *binding* presenti sulla superficie della nanosfera (schema 5.2).



Schema 5.2

La resina A1 viene fatta reagire con una miscela MeOH/NH₃ sotto agitazione magnetica per 72 ore, successivamente viene filtrata e lavata abbondantemente con acqua distillata, etanolo, isopropanolo, THF ed infine etere etilico.

Sulla matrice funzionalizzata A1 a è stata effettuata una analisi FT-IR di seguito riportata (fig. 5.4):

⁹³ Gaur R K, Gupta K C, *Anal Biochem*, (1989), 180, 253.

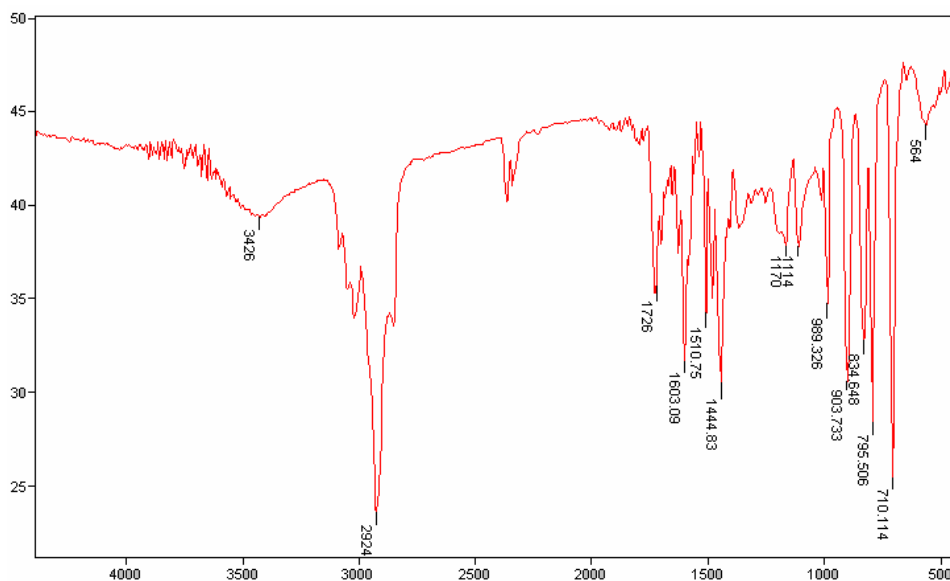


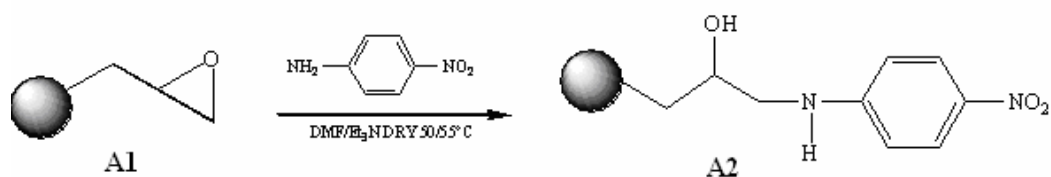
Figura 5.4 A1 a

Sulla resina così funzionalizzata è stato determinato il numero dei gruppi amminici terminali direttamente correlabili alla concentrazione di gruppi epossidici (il procedimento viene descritto ampiamente nel paragrafo 5.6). Si è concluso che la concentrazione di gruppi epossidici disponibili sulle nanosfere è di circa 142,4 μmol per grammo di supporto polimerico.

5.4 Apertura degli anelli epossidici mediante paranitroanilina

Il passaggio successivo di questo lavoro consiste nell'apertura dei cicli ossiranicici presenti sulle nanosfere in seguito a reazione con paranitroanilina; tale processo consente l'introduzione di nitrogruppi sulla superficie delle particelle (A2).

La reazione tra la resina A1 e la paranitroanilina viene condotta nella minima quantità di solventi, in questo caso in N,N-dimetilformammide (DMF) e trietilammina (Et_3N) in rapporto 1:1 (schema 5.3).



Schema 5.3

È stato osservato che utilizzando rapporti diversi di solventi o anche temperature al di sotto dei 50°C si ottengono delle conversioni più basse pur seguendo la medesima sintesi.

Il prodotto A2 è stato sottoposto ad analisi spettroscopica IR, questa ha confermato l'avvenuta funzionalizzazione del polimero con nitroanilina evidenziata dalla presenza della banda a 2927 cm⁻¹ tipica del gruppo aromatico e della banda a 1317 cm⁻¹ caratteristica del nitro gruppo (fig. 5.5).

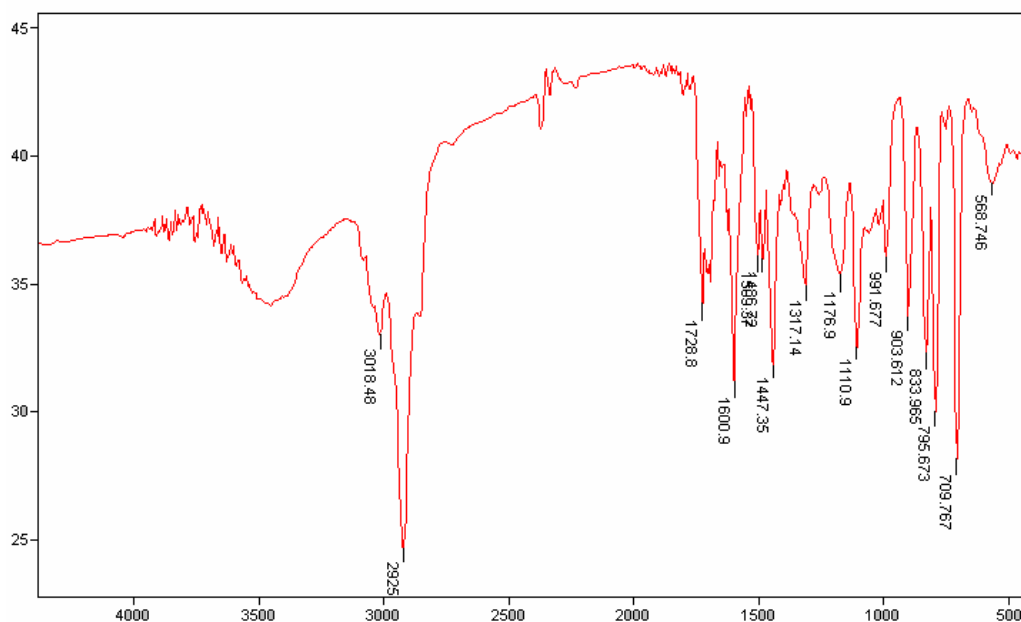


Figura 5.5 A2

5.5 Riduzione dei nitrogruppi

Per la riduzione dei nitrogruppi aromatici in fase solida sono state adottate due metodologie differenti.

Inizialmente tale reazione è stata condotta mediante l'utilizzo di ferro in presenza di acido cloridrico (HCl) e acido acetico (CH₃COOH) variando le condizioni più volte: "trattamento A" riassunto nello schema 5.4 A. Tuttavia il trattamento A non ha portato a conversioni soddisfacenti; i dati sperimentali si riportano in tabella 5.1.

A2 mg	Fe mg	HCl ml	CH ₃ COOH ml	T ° C	UV µmol/g	Tempo H
333,24	31,24	2	3	t.a.	2,3	48
306,36	26,53	2	3	t.a.	2	72
165,00	40,72	2	3	40 °C	12,3	120
163,75	57,94	2,5	1,5	t.a.	13,8	48

Tabella 5.1

Alla fine di ogni reazione, eseguita secondo il trattamento A, la resina viene lavata con acqua distillata, acetone ed etere etilico.

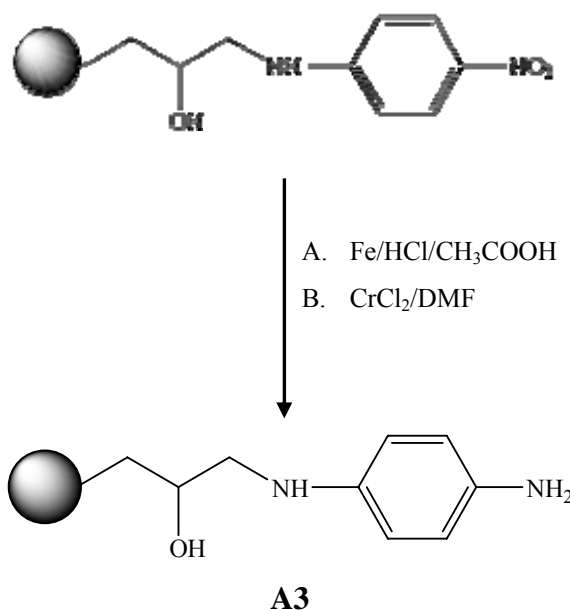
Successivamente, in seguito a suggerimento di letteratura⁹⁴, è stato impiegato un secondo metodo (trattamento B; schema 5.4 B) che si è rivelato più efficiente. Questo prevede l'azione del cloruro di cromo (CrCl₂) in DMF sulla matrice A2. La reazione prosegue sotto agitazione meccanica e a temperatura ambiente per 6 ore. Sono state eseguite due differenti prove al fine di ottimizzare i quantitativi per la riduzione (tab. 5.2).

⁹⁴ Hari A, L. Miller B, *Tetrahedron Letters*, (1999), 40, 245-248.

A2 mg	CrCl ₂ mg	DMF ml	T ° C	gruppi NH ₂ μmol/g	Tempo h
151,58	65	2	t.a.	24,2	6
531,27	221,7	6	t.a.	25,1	5,5

Tabella 5.2

Al termine del trattamento B, la resina ottenuta (A3) viene lavata con DMF, metanolo e cloruro di metilene al fine di rimuovere i residui di cloruro di cromo.



Schema 5.4

Anche la matrice A3 è stata caratterizzata mediante spettroscopia IR. L'esito ottimale della riduzione è confermato dalla banda a 1235 cm⁻¹ che corrisponde allo stretching del legame C-N (figura 5.6).

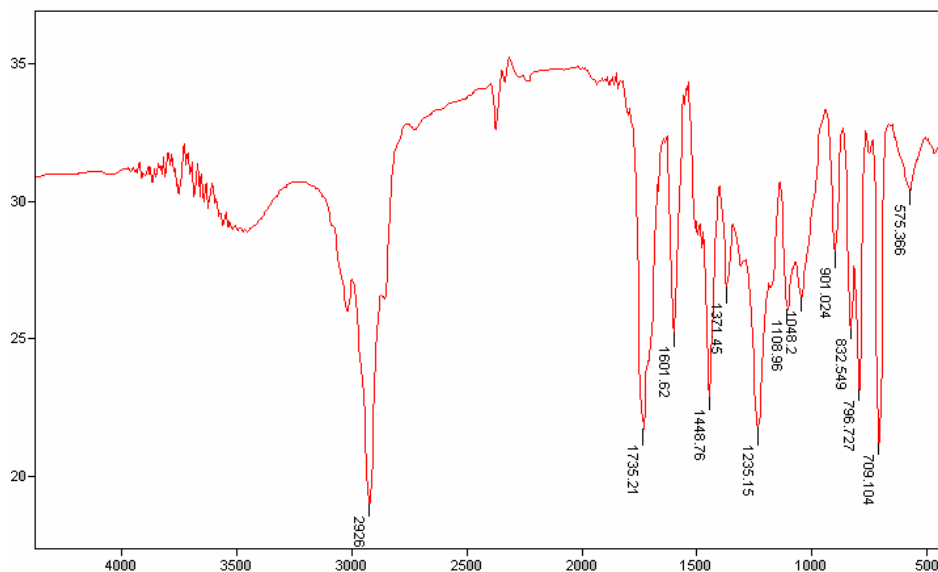


Figura 5.6 A3

5.6 Determinazione dei gruppi amminici liberi su supporti polimerici

Per l'analisi dei gruppi amminici terminali sono disponibili molteplici metodiche basate su determinazioni spettrofotometriche⁹⁵.

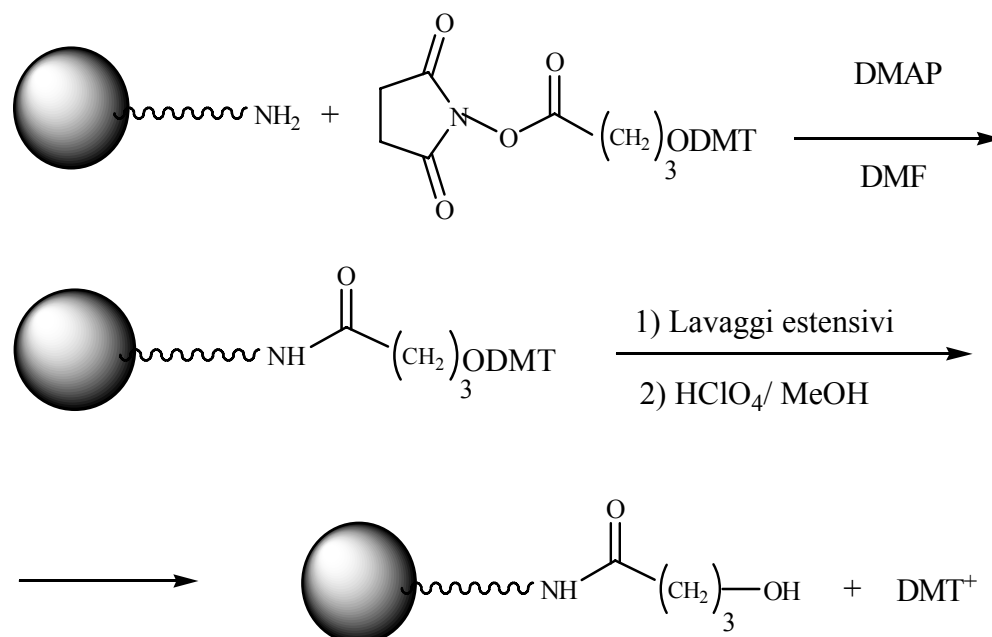
Il metodo che risulta essere di più ampia applicabilità su diversi tipi di supporto è quello di Gaur Gupta².

Il procedimento si basa sull'acilazione del gruppo amminico libero con N-Succinimidil-4-0-(4,4'-dimetossi-trifenilmetil)butirrato (SDTB). Lo scopo è quello di introdurre nei supporti polimerici, sfruttando il gruppo amminico libero, un residuo contenente un raggruppamento 4,4'-dimetossi-trifenilmetilmetilico. Suddetto gruppo, in seguito a trattamento con acidi, viene liberato per dare il catione corrispondente, il quale viene dosato spettrofotometricamente considerando un coefficiente di estinzione di 76000 a 498 nm.

Lo schema 5.5 illustra la reazione di funzionalizzazione relativa all'agente acilante SDTB.

⁹⁵ Saini V K, Kent S B H, Tam J P, Merirfield R B, *Anal Biochem*, (1981), 117, 147.

Ngo T T, *J Biochem Biophysic Methods*, (1986), 12, 349.



Schema 5.5

La rimozione dei residui 4-4'-dimetossitritifenilmetilici realizzata mediante trattamento con acido perclorico, ha fornito una soluzione rosso arancio che presenta un valore di assorbanza a 498 nm di 76000; introducendo tale dato sperimentale nella formula sotto riportata è possibile calcolare la concentrazione di gruppi amminici liberi, espressa in μmoli per grammo di materiale.

$$\frac{\text{moli gruppi amminici}}{\text{g supporto}} = \frac{A \cdot V}{P \cdot 70000}$$

p = peso in mg del supporto sottoposto a detritilazione

v = volume in ml della miscela detritilante usata

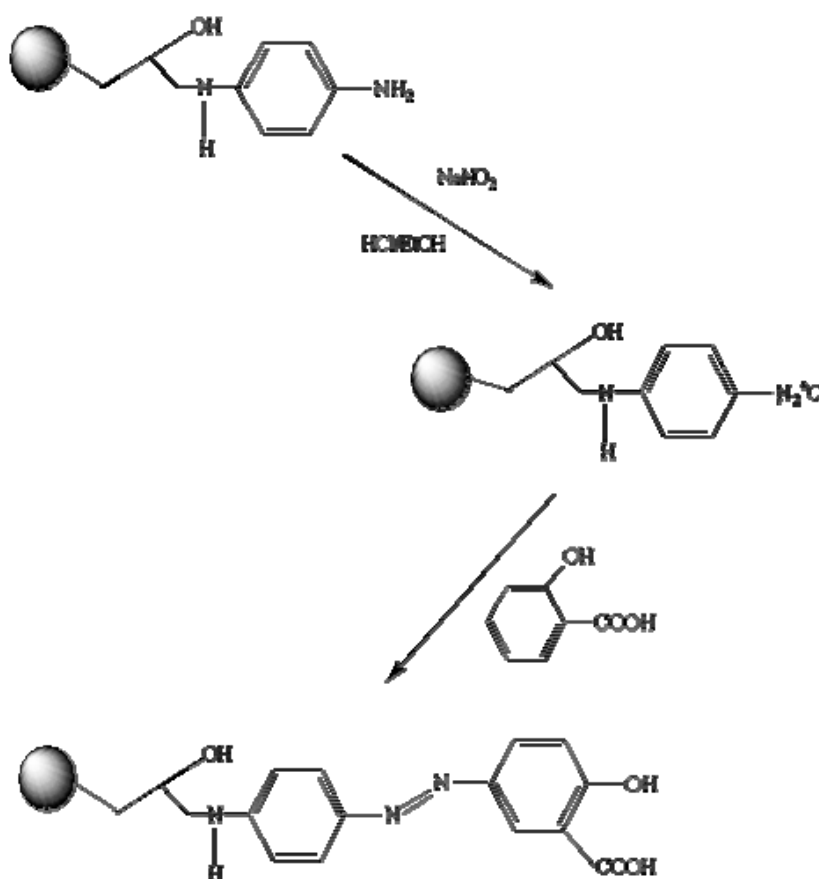
70000 = coefficiente di estinzione del catione tritilico a 498 nm

5.7 Reazioni di diazotazione ed attacco dell'acido salicilico

La reazione di diazotazione costituisce lo step finale di questo lavoro in quanto conduce alla formazione di un sistema dotato di un gruppo suscettibile di attacchi nucleofili (prodotto A4).

Questo passaggio ha una durata relativamente breve, prevede l'utilizzo di nitrito di sodio in presenza di HCl concentrato (6N) ed etanolo come solvente, necessita il mantenimento di basse temperature anche nella fase successiva che consiste nell'attacco dell'azogruppo all'acido salicilico.

Con tali reazioni si ottiene la formazione di un ponte diazo tra il polimero e il farmaco (sch. 5.6)⁹⁶.



A4

Schema 5.6

⁹⁶ Cassano R, Iemma F, Muzzalupo R, Picci N, Puoci F, Spizzirri U G, Trombino S, European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology, Sevilla, Spain, May 10-12, (2004).

Per questa reazione sono state eseguite due prove con differenti quantità di reagenti al fine di ottimizzare la resa di prodotto (tab. 5.3).

A3 mg	NaNO ₂ mg	H ₂ O ml	EtOH ml	HCl ml	Acido Salicilico mg	T °C	Tempo h
49,11	17,36	6	1	3,2	12,61	-1 +4	48
489	170	2,5	3	3	130	0	48

Tabella 5.3

Il seguente spettro IR (fig. 5.7) conferma l'avvenuta reazione; infatti segnali registrati a 3428, 1678 e 1267 cm⁻¹ sono tipiche bande di assorbimento di un acido carbossilico.

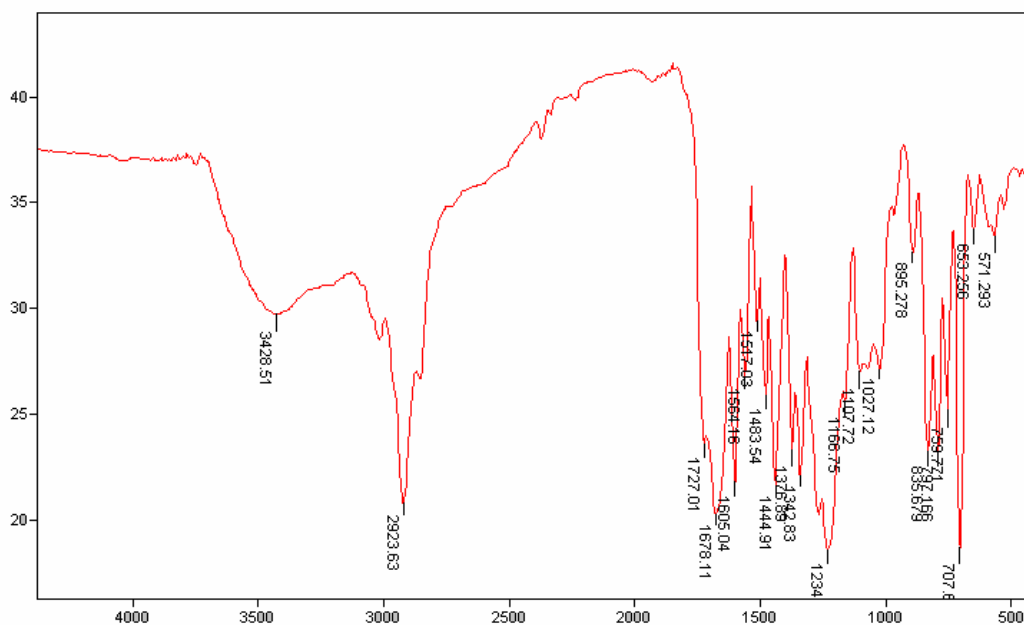


Figura 5.7 A4

5.8 Conclusioni

La finalità del presente lavoro risiede nella realizzazione di sistemi microparticellari di natura polimerica che, in seguito a funzionalizzazione, risultano capaci di legare il principio attivo in modo da effettuare un trasporto in uno specifico distretto dell'organismo designato come bersaglio; in questo caso il target è rappresentato dal colon.

Questo tipo di struttura polimerica permette la coniugazione di un sistema carrier con numerosi agenti terapeutici mediante le reazioni che sono state descritte nei precedenti paragrafi.

In particolare è stato realizzato un profarmaco per applicazioni colon-specifiche su cui fissare in maniera ottimale la molecola di acido 5-amminosalicilico mediante la formazione di un ponte diazo. In tal modo l'agente terapeutico gode di una copertura durante il transito all'interno dello stomaco che gli consente di raggiungere il colon senza subire modificazioni. Al contrario, quando il profarmaco si trasferisce nel colon, la presenza delle azoreduttasi nel lume intestinale garantisce la scissione del ponte diazo con conseguente rilascio del 5-ASA che in tale sede svolge una funzione di tipo antinfiammatoria.

Ulteriori sviluppi del seguente lavoro prevedono l'effettiva valutazione del rilascio del 5-ASA dal carrier polimerico in mezzi acquosi in grado di simulare fluidi biologici come quelli gastrici e quelli intestinali.

CAPITOLO VI

PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DI POLIMERI FUNZIONALI

6.1 Introduzione

L'energia è un elemento fondamentale che regola le funzioni dei sistemi biologici. Gli organismi biologici ricavano la loro energia dalla ossidazione di molecole di fuga come gli zuccheri e gli acidi grassi. Nei processi di ossidazione, gli elettroni sono rimossi da tali molecole e trasferiti sequenzialmente attraverso una serie di reazioni ad altre molecole fino a reagire con l'ultimo accettore: l' O_2 .

Dalle normali funzioni metaboliche si producono generalmente dei metaboliti di scarto che possono essere, per la loro elevata reattività, estremamente dannosi a livello cellulare. È stato dimostrato che specie pericolose, quali i radicali liberi, sono alla base di numerose patologie. Una loro limitata e fisiologica produzione è controbilanciata dalla presenza di sistemi altamente specializzati, in grado di bloccare la loro reattività o di facilitarne la rimozione. A volte però l'equilibrio persistente fra radicali liberi e "sistemi difensivi" pende a favore dei primi, soprattutto in particolari condizioni come lo stress ossidativo. La possibilità di introdurre, con fonti esogene, composti antiossidanti può garantire il ripristino del perduto equilibrio prevenendo così condizioni di stress ossidativo e le varie patologie ad esso correlate.

Nel corso degli ultimi anni gli antiossidanti sono stati oggetto di numerosi studi, in particolare per la realizzazione di sistemi applicabili in campo biomedico e farmaceutico. L'interesse è stato, tuttavia, rivolto prevalentemente verso antiossidanti a basso peso molecolare, mentre quelli inseriti in matrici polimeriche sono stati utilizzati principalmente in campo industriale per prevenire la degradazione ossidativa di *blend* polimerici ed aumentarne la stabilità meccanica⁹⁷.

Gli antiossidanti polimerici presentano inoltre applicazioni in campo farmaceutico. Alcuni antiossidanti a basso peso molecolare presentano

⁹⁷ Pan, J. Q.; Liu, N. C.; Lau, W. W. Y.; *Polymer Degradation and Stability*; **1998**; 62; 165-170.

caratteristiche farmacocinetiche sfavorevoli, come ad esempio una rapida metabolizzazione che ne riduce la durata d'azione, o un elevato assorbimento cellulare che ne determina l'interferenza con le cascate trasduzionali dei segnali cellulari. Composti altamente lipofili hanno, inoltre, la possibilità di attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) e risultano quindi altamente tossici per il sistema nervoso centrale. L'inserimento dell'antiossidante all'interno di una matrice polimerica ne impedisce l'attraversamento della BEE a causa delle sue elevate dimensioni e conferisce al sistema una maggiore stabilità metabolica. Inoltre, il sistema polimerico può essere anche utilizzato per una migliore veicolazione dell'antiossidante stesso e un suo rilascio mirato⁹⁸.

Le procedure che permettono la realizzazione di polimeri con attività antiossidante sono principalmente di due tipi:

- Polimerizzazione, copolimerizzazione radicalica o condensazione di monomeri funzionalizzati con un antiossidante. Questa procedura è complicata dal fatto che l'antiossidante può inibire lo stadio di propagazione della polimerizzazione radicalica. Sono stati comunque realizzati alcuni polimeri che presentano in catena laterale composti con attività antiossidanti, quali ad esempio derivati della vitamina E (α -tocoferolo), delle fenotiazine, e polimeri conduttori, come la polianilina e il polipirrolidone.
- Legame chimico di composti a basso peso molecolare con attività antiossidante ad un polimero precedentemente sintetizzato. Un esempio tipico di questa procedura è la funzionalizzazione del copolimero stirene-amminometilstirene con acido lipoico o l'introduzione 2,6-di-terzbutilfenolo ad una catena copolimera stirene-clorometilstirene precedentemente sintetizzata.

⁹⁸ Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Biomacromolecules*; **2003**; 4; 1394-1399

Nel presente capitolo sono riportati alcuni esempi di composti polimerici che presentano al loro interno gruppi funzionali con proprietà antiossidanti. Per alcuni di essi sono state analizzate le procedure di sintesi, mentre per altri è stata valutata anche l'effettiva attività all'interno dei sistemi biologici.

6.2 Derivato acrilico o vinilico della vitamina E

La realizzazione di un derivato acrilico o vinilico della vitamina E è interessante sia per le proprietà antiossidanti della vitamina E sia perché il processo porta alla formazione di un estere labile che può essere facilmente scisso con liberazione della vitamina stessa⁹⁹.

Sono stati realizzati copolimeri tra un derivato metacrilico della vitamina E, l' α -tocoferilmetacrilato (fig. 6.1a) e il 2-idrossietilmetacrilato (fig. 6.1b).

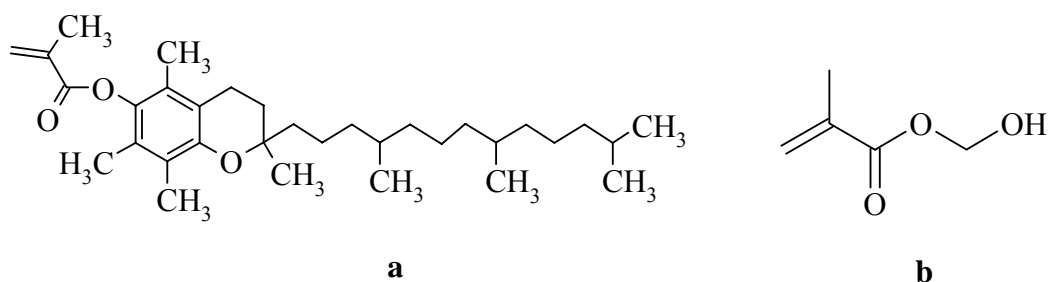


Figura 6.1

La reazione presenta conversioni estremamente basse a causa della capacità di bloccare i radicali liberi tipica del tocoferolo.

Il peso molecolare del polimero ottenuto è relativamente elevato, probabilmente perché l' α -tocoferolo è una molecola che ostacola stericamente le reazioni di terminazione della catena a causa del suo elevato peso molecolare e della sua natura poco polare. La presenza di unità di 2-idrossietilmetacrilato contribuisce ad aumentare la stabilità del polimero e conferisce al sistema l'idrofilicità necessaria alla veicolazione nei sistemi biologici.

⁹⁹ Ortiz, C.; Vazquez, B.; San Roman, J.; Polymer; **1998**; 39 (17); 4107-4114.

6.3 Flavonoidi

I flavonoidi sono una classe di composti molto interessante a causa delle loro proprietà antiossidanti che ne permettono l'utilizzo come antinfiammatori, antimicrobici e anticancerogeni.

In generale, l'attività dei flavonoidi all'interno del corpo è limitata a poche ore, sebbene il loro metabolismo non sia stato ben stabilito. Inoltre, è stato osservato che molti flavonoidi possono fungere da pro-ossidanti e generare specie reattive dell'ossigeno. Al contrario, una frazione di flavonoidi a massa molare relativamente elevata ha mostrato le stesse proprietà antiossidanti di quelli a massa molare minore, ma anche una maggiore emivita. Per questo motivo sono stati progettati una serie di flavonoidi polimerici.

Tra questi polimeri è di particolare interesse la polirutina che viene sintetizzata mediante "coupling" ossidativo catalizzato enzimaticamente dalla laccasi, un enzima contenente rame nel suo sito attivo che usa ossigeno come agente ossidante.

6.3.1 Polirutina

La rutina (fig. 6.2) è uno dei glicosidi della classe dei flavonoidi presente in molte piante e in particolare nel grano che insieme alla quercetina e all'esperidina viene identificata come vitamina P. È un agente antiossidante, antiipertensivo, antinfiammatorio e antiemorragico, un regolatore della permeabilità capillare e della stabilità delle piastrine. Queste proprietà sono potenzialmente benefiche nel prevenire malattie e nel proteggere la stabilità del genoma. Molte di queste attività sono in relazione con le capacità antiossidanti.

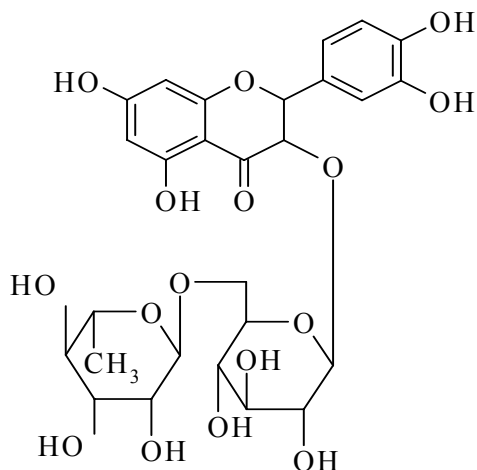


Figura 6.2

L'attività antiossidante della polirutina è stata determinata in termini di capacità di inibire l'anione superossido generato attraverso il sistema xantina/xantina ossidasi (fig. 6.3).

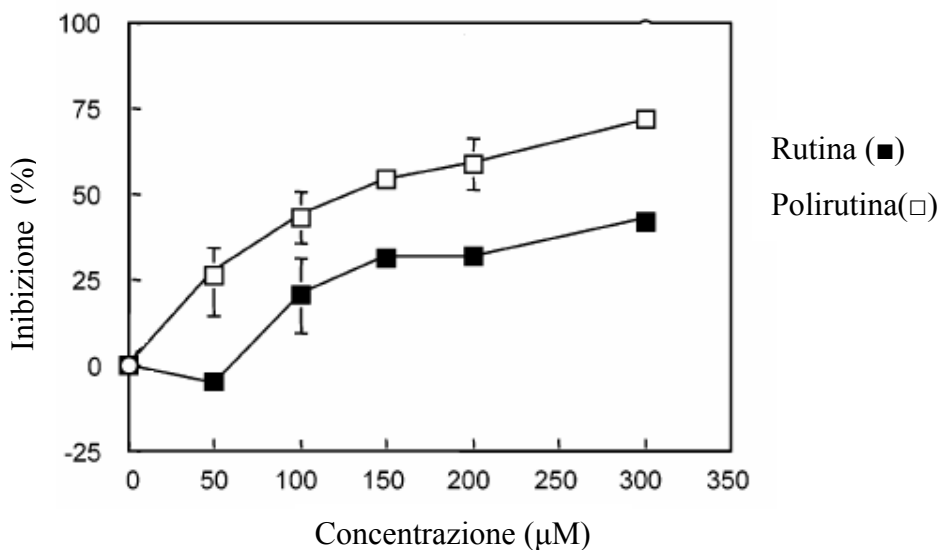


Figura 6.3

I risultati indicano una capacità concentrazione-dipendente della polirutina di bloccare il radicale superossido (inibizione del 100% quando la concentrazione di unità di rutina è pari a 300 µM) e senza effetti pro-ossidanti. Al contrario la rutina presenta azione pro-ossidante a basse concentrazioni. L'elevata capacità

antiossidante della polirutina è da attribuire all'elevata concentrazione di anelli aromatici e gruppi idrossilici che essa presenta.

È stata anche valutata la capacità della polirutina di inibire la perossidazione delle lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL). Il metodo utilizzato prevede che le LDL siano marcate con la difenil-1-pirenilfosfina (DPPP), una molecola non fluorescente che reagisce stechiometricamente con gli idroperossidi prodotti durante la perossidazione per dare il difenil-1-pirenilfosfinossido (DPPP=O) che invece è fluorescente.

Come mostrato in figura 6.4, l'effetto inibitorio della polirutina è maggiore di quello della rutina.

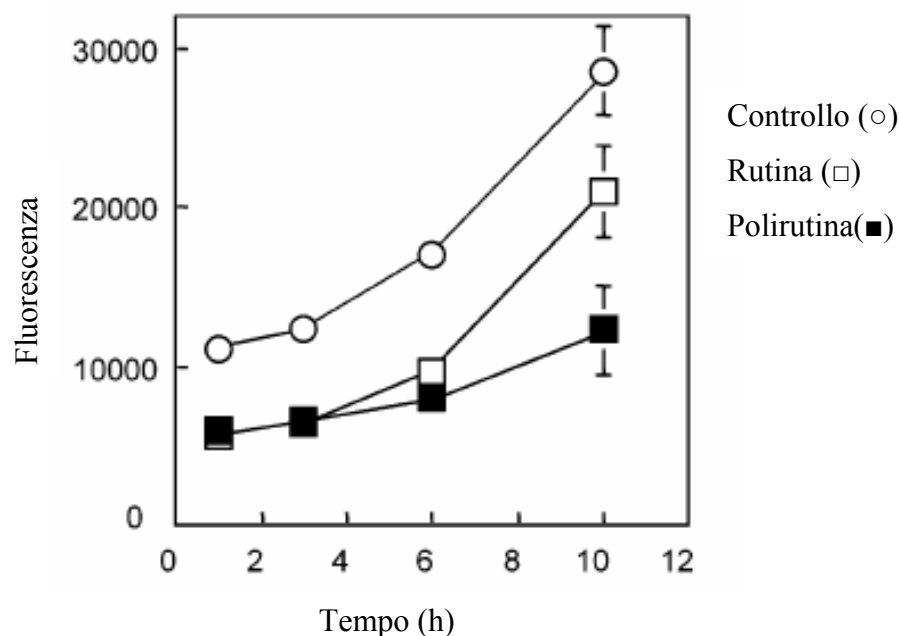


Figura 6.4

La polirutina, inoltre, aumenta la vitalità di cellule trattate con un generatore di radicali liberi. I radicali prodotti da quest'ultimo danneggiano le membrane delle cellule compromettendone le funzioni e determinandone la morte. A concentrazioni di 100 μM la polirutina ha un effetto protettivo maggiore rispetto alla rutina. A concentrazioni di 400 μM , il polimero presenta valori di inibizione della mortalità elevati, mentre il monomero presenta attività citotossica. Questo differente comportamento potrebbe essere attribuito al fatto che il polimero è

molto più idrosolubile del monomero, e quindi non interagisce col doppio strato lipidico della membrana.

6.3.2 Coniugati polimeri-flavonoidi

Le reazioni ossidative a catalisi enzimatica sono utilizzate, oltre per la sintesi di polimeri dei flavonoidi, anche per la coniugazione di fenoli sui polimeri¹⁰⁰.

Con questa tecnica è stato realizzato un coniugato tra la catechina e la gelatina. La scelta della gelatina come polimero da coniugare alla catechina è dovuta alle sua bassa immunogenicità e citotossicità che ne consentono un largo impiego nell'industria alimentare, farmaceutica e fotografica.

La capacità antiossidante del coniugato viene valutata generando l' $\cdot\text{O}_2$ attraverso il sistema xantina-xantina ossidasi. La produzione viene seguita misurando spettrofotometricamente a 550 nm la forma del citocromo c ridotto dall' $\cdot\text{O}_2$.

Come mostrato in figura 6.5, il coniugato presenta attività antiossidante maggiore rispetto alla catechina.

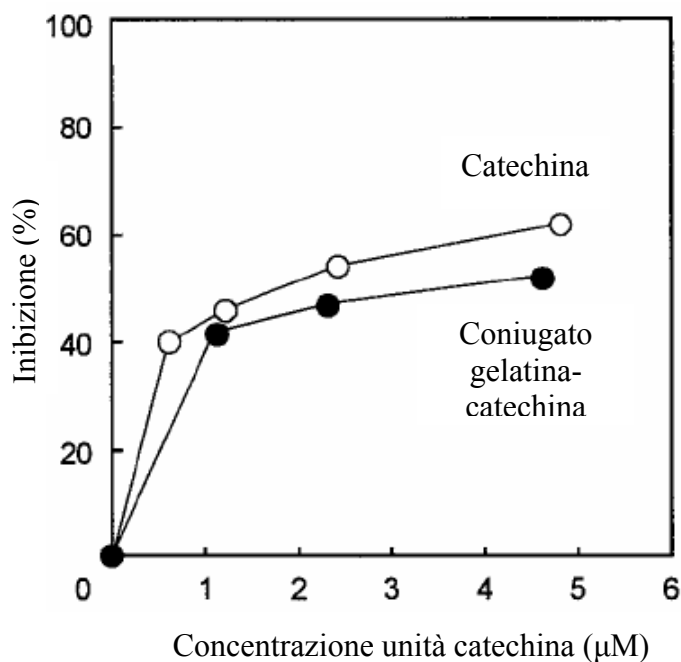


Figura 6.5

¹⁰⁰ Chung, J. E.; Kurisawa, M.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Biotechnology Letters*; **2003**; 25; 1993-1997.

Utilizzando il metodo della fluorescenza del DPPP=O, si è dimostrato che la catechina coniugata mostra, un effetto inibitorio concentrazione-dipendente sulla perossidazione delle LDL più marcato rispetto a quello della catechina non coniugata (figura 6.6).

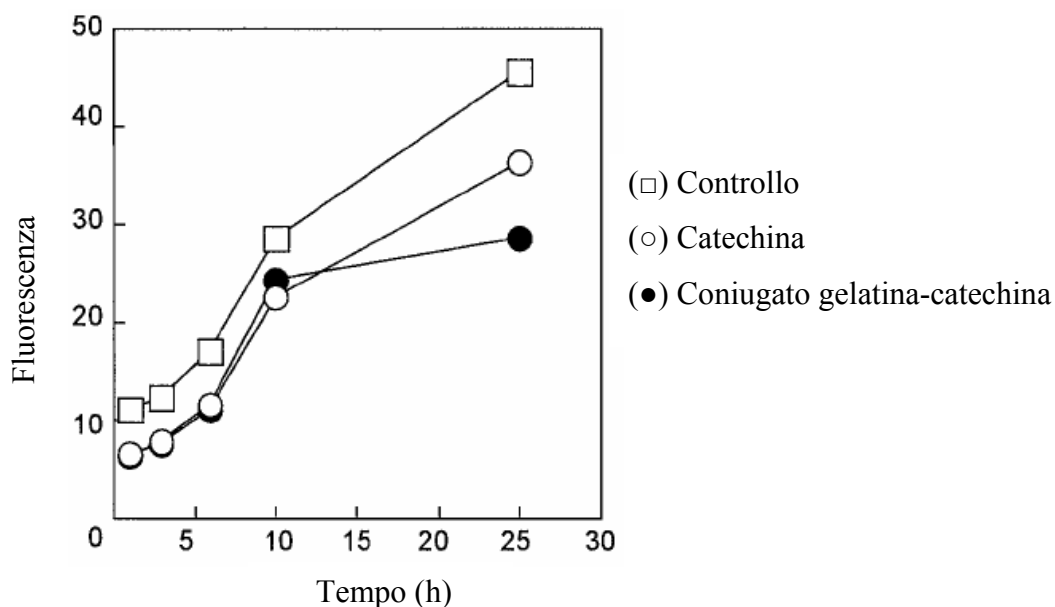


Figura 6.6

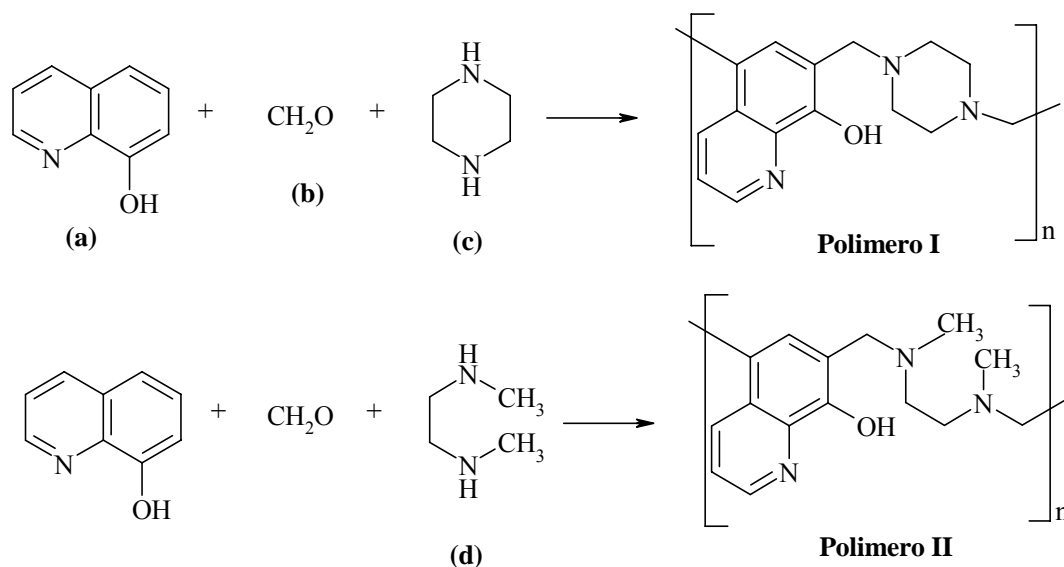
6.4 Polimeri chelanti

Questa classe di polimeri ha un meccanismo totalmente differente rispetto a quelli visti fino ad ora, le loro caratteristiche antiossidanti si manifestano in modo “indiretto” non interagendo direttamente con i radicali, ma bloccando le reazioni catalitiche che portano alla loro formazione, infatti, rame, ferro e altri metalli di transizione in forma ionica catalizzano la produzione di radicali liberi.

6.4.1 Derivato formaldeidico dell’8-idrossichinolina

L’8-idrossichinolina (**a**) è un sistema eterociclico capace di chelare diversi cationi bivalenti, quali Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} . Questo composto con un idrogeno attivo è stato condensato con formaldeide (**b**) ed un’ammina secondaria (piperazina (**c**) o N,N-dimetiletildiammina (**d**)) come gruppo spaziatore,

secondo una condensazione tipo-Mannich ^[11] ottenendo i polimeri I e II (schema 6.1).



Schema 6.1

I due copolimeri sono stati sintetizzati con diversi rapporti molari di gruppo spaziatore/8-idrossichinolina, nello specifico rapporto 2:1 per il polimero I, mentre un rapporto più alto di 5:1 è stato utilizzato per il polimero II.

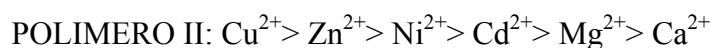
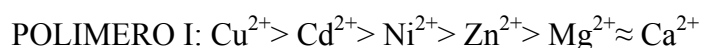
Le proprietà chelanti dei polimeri sono stati studiati tramite tecniche d'equilibrizzazione in funzione del tempo e del pH.

I risultati di queste prove indicano che i polimeri ottenuti hanno alte velocità d'equilibrizzazione, dove il 50% del catione viene captato in circa 30 minuti ed uno stadio di equilibrio viene raggiunto in 1-3 h in dipendenza dello ione metallico coinvolto, rispetto ai tipici polimeri fenolformaldeici come il poli(8-idrossichinolina-5,7-dimetilene) ^[12], che raggiunge uno stadio di equilibrio dopo 7-10 h

Il confronto tra la velocità d'equilibrizzazione dei polimeri I e II con quella del poli(8-idrossichinolina-5,7-dimetilene) riflette chiaramente gli effetti dei gruppi spaziatori idrofilici (piperazina o N,N- dimetiletildiammina) che migliorano le caratteristiche idrofiliche dell'8-idrossichinolina. Il polimero II ha esibito velocità

d'equilibrizzazione più alte, mentre capacità di captazione più alte sono state ottenute per il polimero I.

Le capacità chelanti dei polimeri, può essere comparata in termini di *coefficiente di distribuzione*, K_d definito ^[13], come il rapporto tra la quantità di ione metallico legato su un 1g di polimero e la concentrazione (in mg/mL) dello ione metallico rimasto in soluzione. Dalla determinazione dei coefficienti di distribuzione, valutati per un contatto di 24 h con i metalli si è ottenuto che il polimero I ha esibito una pronunciata selettività nei riguardi dello ione Cu^{2+} , e che la tendenza complessiva dei polimeri I e II nei confronti dei vari ioni metallici segue il seguente ordine:



La captazione dello ione metallico in funzione del pH è stata studiata in un range tra 2 e 8 sotto continua agitazione per 6 h, in generale un incremento del pH porta ad un incremento della captazione, dove il polimero I ha esibito una più alta capacità e selettività nei confronti dello ione Cu^{2+} rispetto al polimero II. Per entrambi i polimeri non viene osservata una chelazione apprezzabile per valori di pH inferiori a 6, questo è in accordo con la dipendenza del pH dei siti di legame di molti polimeri chelanti¹⁰¹.

6.4.2 Derivato dell'acido fitico

L'acido fitico (InsP_6) è abile a coordinare il Fe^{3+} e a prevenire la formazione di radicali liberi ferro-catalizzati¹⁰².

Un polimero antiossidante è stato preparato introducendo unità di *myo*-inositolo pentafosfato (InsP_5) in una struttura macromolecolare solubile. Le unità di *myo*-inositolo introdotte nella struttura polimerica mantengono intatti i gruppi

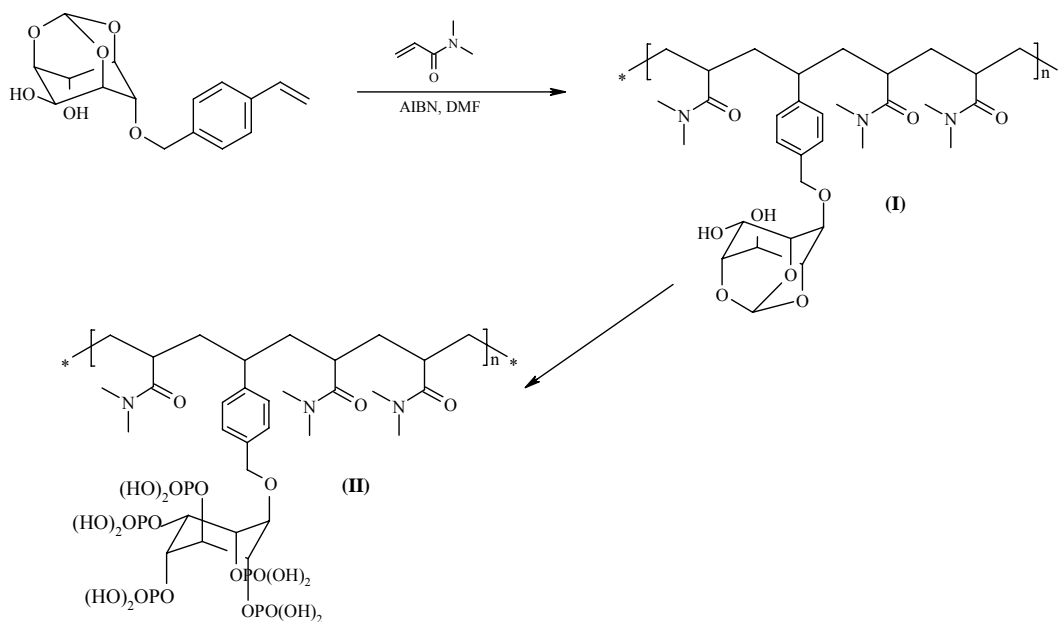
¹⁰¹ K.A.K. Ebraheem; S.T. Hamdi; Reactive & Functional Polymers; **1997**; 34; 5.

¹⁰² Graf, E.; Eaton, J. W.; Free Radical Biology and Medicine; 1990; 8; 61-69.

fosforilati dell'acido fitico responsabili della chelazione del ferro, in quanto il punto d'ancoraggio non compromette tali gruppi¹⁰³.

Questo materiale è stato preparato attraverso una procedura che prevede due step di sintesi a partire dal monomero funzionalizzato 4-(4-vinilbenzil)-*myo*-inositolo ortoformiato, come substrato di partenza, avente i gruppi idrossilici in C-1, C-3 e C-5 protetti con un gruppo ortoformiato e funzionalizzato con 4-clorometilstirene selettivamente sul gruppo idrossilico in posizione C-6^[17].

Nel primo step detto monomero viene copolimerizzato con N,N-dimetilacrilammide (rapporto molare 1:3) fornendo una struttura macromolecolare con unità di *myo*-inositolo protetti con gruppi ortoformiato (I). Per successiva deprotezione e fosforilazione del copolimero I viene ottenuto un sistema polimerico solubile recanti unità di *myo*-inositolo fosforilato (II) (schema 6.2).



Schema 6.2

L'abilità del copolimero II di proteggere contro la perossidazione lipidica, indotta dal sistema Fe³⁺/ascorbato è stata esaminata in membrane microsomiali di fegato

¹⁰³ F. Iemma; S. Trombino; F. Puoci; G. Cirillo; U. G. Spizzirri; R. Muzzalupo; N. Picci;

Macromolecular Biosciences; **2005**; 5; 1049-1056.

di ratto^[11]. Il Fe^{2+} , prodotto dalla reazione redox tra Fe^{3+} ed ascorbato sviluppa specie radicaliche via reazione di Fenton ^[18]. Le membrane, costituite da fosfolipidi ad elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi, rappresentano il substrato ideale del processo di perossidazione lipidica. Durante tale reazione, infatti, gli acidi grassi vengono trasformati in metaboliti tossici come le aldeidi. In particolare la malondialdeide (MDA) è generata in modo relativamente costante e rappresenta, quindi, un buon indicatore della velocità di perossidazione¹⁰⁴.

L'efficienza antiossidante è stata determinata misurando la concentrazione dell'addotto MDA-TBA rilevabile, mediante spettrofotometria UV-VIS¹⁰⁵.

L'effetto inibitore del copolimero II sulla perossidazione lipidica è dose e tempo dipendente, la figura 6.7 mostra gli effetti delle differenti concentrazioni di InsP_5 legate alla matrice polimerica sulla produzione di MDA.

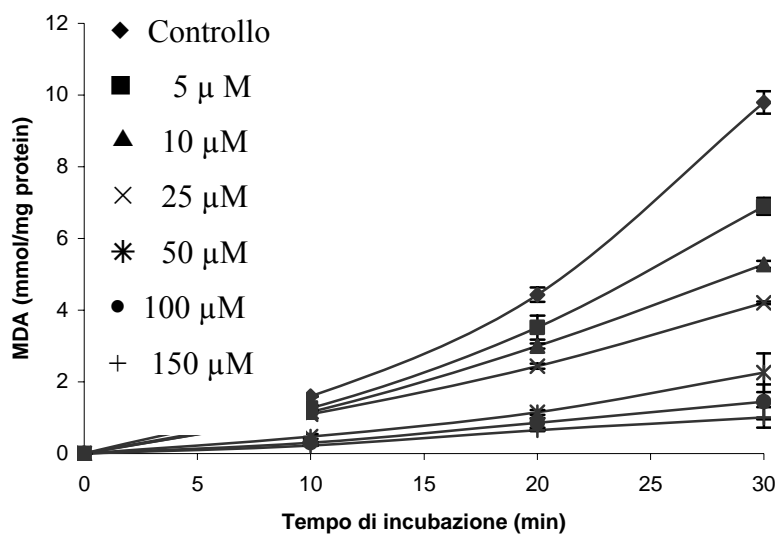


Figura 6.7

Il copolimero II ha dimostrato un'attività antiossidante comparabile all' InsP_6 . Questo viene dimostrato dal fatto che la concentrazione di InsP_6 nel copolimero

¹⁰⁴ K.A.K. Ebraheem ;M.S. Mubarak ; Z.J. Yasseien; F. Khalili; Solvent Extr. Ion Exc.; **1998**; 16; 637.

¹⁰⁵ V. L. Tatum; C. Changoit; C. K. Chow; Lipids; **1990**; 25; 226

responsabile dell'inibizione del 50% di MDA ($IC_{50}=15.5 \mu\text{M}$) è comparabile con quella dell'InsP₆ commerciale ($IC_{50}=8.1 \mu\text{M}$) ^[16].

6.5 Resine antiossidanti

Le resine antiossidanti sono oggetto di studio degli ultimi anni, infatti, essendo dei sistemi insolubili possono essere facilmente riutilizzati più volte attraverso semplici separazioni come la filtrazione, trovando numerose applicazioni in campo farmaceutico ed industriale, come l'inibizione dell'ossidazione di composti organici durante lo stoccaggio¹⁰⁶.

6.5.1 Resina avente derivati fenolici

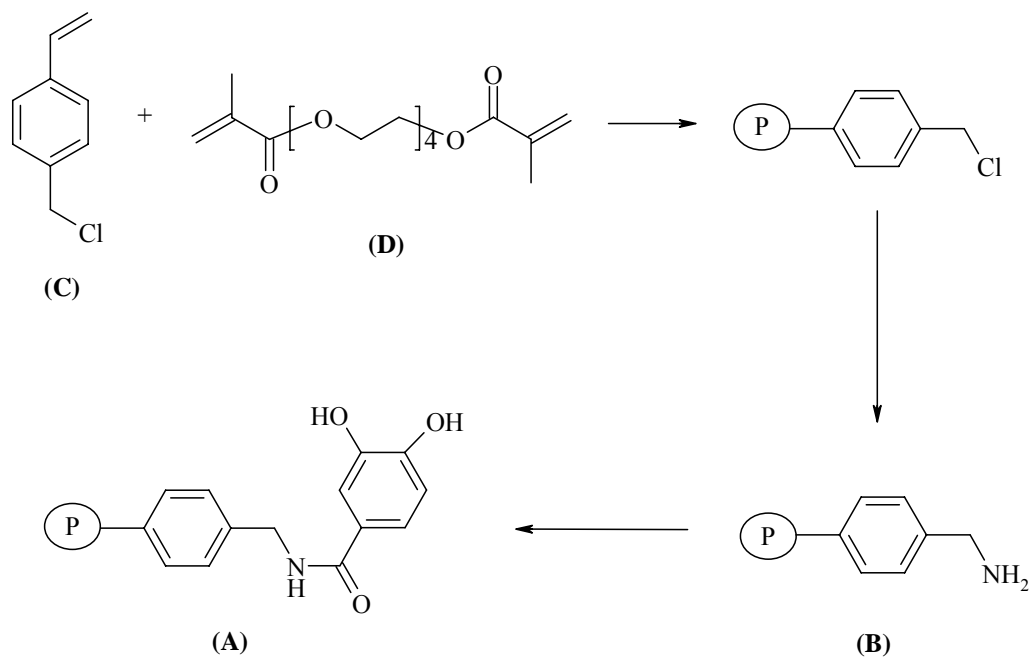
I composti fenolici sono conosciuti per la loro proprietà d'inibire le reazioni radicaliche a catena durante l'autossidazione di molti composti organici.

Sfruttando queste caratteristiche sono stati realizzati diversi polimeri in "bulk" aventi gruppi idrossi-fenolici mono- di- e tri-sostituiti. Fra questi, la resina RAS-4G-3,4-DHBA (A), avente due gruppi idrossi-fenolici ha dimostrato un'alta attività antiossidante¹⁰⁷.

La preparazione della resina (sch. 6.3) prevede la sintesi di uno scheletro insolubile (RAS-4G) avente gruppi benzilammino (B), per copolimerizzazione tra clorometilstirene (C) e tetraetilenglicoldimetacrilato (D) e successivo trattamento con acidi benzoici contenenti gruppi idrossi-fenolici.

¹⁰⁶ Nonaka T.; Nishida H.; Tagawa R.; Egawa H.; Chem Lett.; **1982**; 1385.

¹⁰⁷ T. Nonaka; S. Maeda; T. Ogata; S. Nakashima; T. Kawasaki; S. Kurihara; Jurnal of Applied Polymer Science; **2004**; 97; 2097-2104.



Schema 6.3

Le proprietà antiossidanti delle resine sono state testate mediante determinazione di 1,4-diossano idroperossido generato tramite irradiazioni UV in presenza di ossigeno [22]. La figura 6.8 mostra la concentrazione di 1,4-diossano idroperossido generato dal 1,4-diossano, saturato con ossigeno tramite irradiazione UV, in assenza ed in presenza delle resine.

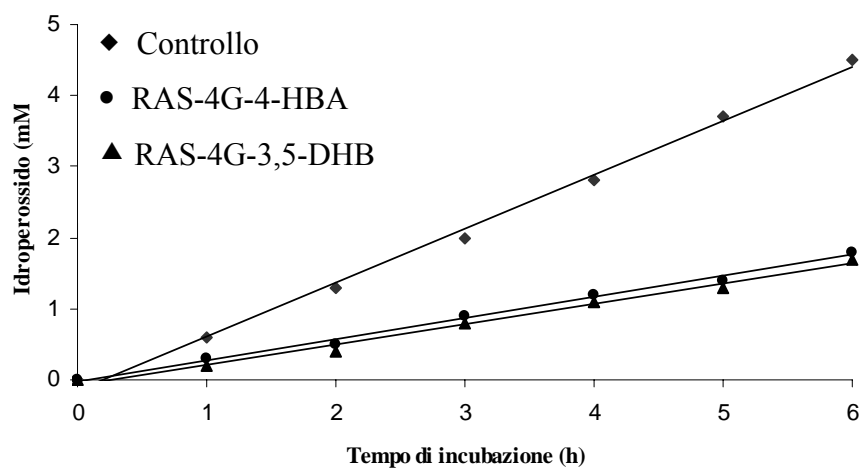


Figura 6.8

CAPITOLO VII

STUDIO SULL'ACIDO FITICO COME AGENTE ANTIOSSIDANTE

7.1 Introduzione

Nel presente capitolo vengono approfondite le proprietà dell'acido fitico, antiossidante che, negli ultimi anni, ha attirato l'attenzione da parte della comunità scientifica. La scelta di tale composto è giustificata dalla possibilità di realizzare derivati polimerici che, come sarà dimostrato nel capitolo VIII, sono in grado di conservare l'attività antiossidante.

7.2 Proprietà antiossidanti dell'InsP₆

L'acido fitico, o *myo*-inositolo 1,2,3,4,5,6-esafostato, noto come InsP₆ (fig. 7.1-1) è l'estere fosforico del *myo*-inositolo (fig. 7.1-2), un alcol ciclico derivante dal glucosio.

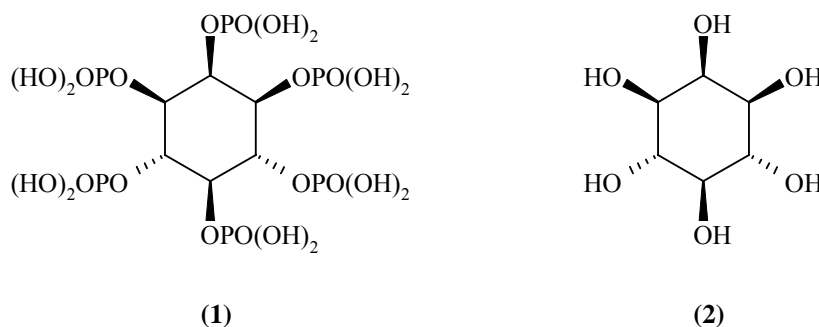
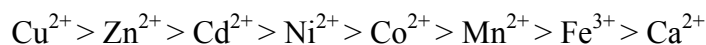


Figura 7.1

La struttura dell'InsP₆ suggerisce una sua possibile applicazione come chelante. L'InsP₆, infatti, presenta un'elevata affinità per tutti i cationi polivalenti nel seguente ordine decrescente:



Una molecola di InsP_6 può legare più di sei cationi e il metallo può legare almeno due molecole di InsP_6 in base al proprio stato di ossidazione¹⁰⁸.

Un antiossidante è una sostanza che, quando presente in basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ne inibisce significativamente o ne previene l'ossidazione. Il termine substrato ossidabile include tutte le sostanze presenti nei tessuti viventi e nei cibi, compresi lipidi, proteine, carboidrati e DNA¹⁰⁹.

Gli antiossidanti possono differire in composizione, proprietà chimico-fisiche, meccanismo e sito di azione. I principali meccanismi d'azione sono riportati in tabella 7.1.

MECCANISMI DI AZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI	
Inibizione della produzione di radicali liberi	Agenti che formano con i metalli di transizione complessi senza attività redox
	Agenti che formano complessi con attività redox ma che sono essi stessi bersaglio dei radicali liberi prodotti
	Agenti che riducono la concentrazione di idroperossidi
Blocco o stabilizzazione dei radicali liberi	Radicali liberi relativamente stabili
	Agenti riducenti
	Stabilizzanti di radicali liberi
Regolazione dell'espressione genica ^[28]	
Meccanismo misto	

Tabella 7.1

¹⁰⁸ Champagne, E. T.; Robinson, J. W.; Gale, R. J.; Naumn, M. A.; Rao, R. M.; Luizzo, J. A.; Anal. Lett.; **1985**; 2421.

¹⁰⁹ Halliwell, B.; Free Radical Research Communications; **1990**; 9; 1-32.

Molti antiossidanti possono reagire con specie attive dell'ossigeno e quindi consumarle. L'acido fitico è invece molto stabile e non reattivo. Tutte le sue proprietà antiossidanti derivano dalla sua relativamente alta affinità per il catione Fe^{3+} .

7.3 Complessi Fe^{3+} - InsP_6

I metalli e i ligandi possono essere classificati in accordo con la teoria hard-soft proposta da Lewis¹¹⁰.

Il catione Fe^{3+} , grazie alla sua elevata densità di carica, può essere classificato come una specie hard e forma legami molto stabili con ligandi hard come ad esempio sistemi contenenti atomi di ossigeno. Al contrario il catione Fe^{2+} , che ha una densità di carica inferiore, preferisce chelanti contenenti atomi soft come gli atomi di azoto.

Le condizioni di coordinazione richieste dal Fe(III) sono meglio soddisfatte da sei atomi coordinanti disposti in una struttura ottaedrica con il metallo al centro. Il numero degli anelli formati nel complesso metallo-chelante è direttamente proporzionale alla stabilità del complesso stesso. Il numero degli anelli può essere aumentato incrementando il numero di atomi donatori attaccati al ligando, come mostrato in figura 7.2.

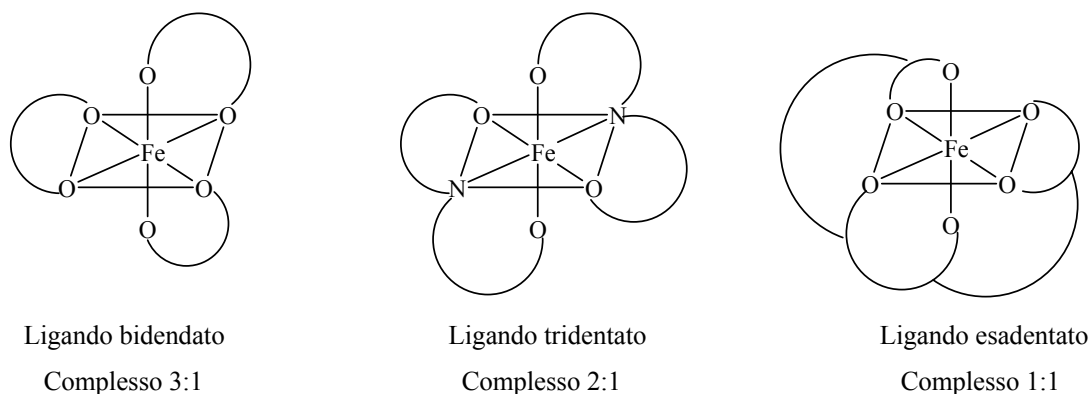


Figura 7.2

¹¹⁰ Pearson, R. G.; J. Am. Soc.; **1963**; 85; 3535.

L'aumento della stabilità termodinamica che si osserva nel caso dei ligandi esadentati è dovuto alla variazione entropica tra i sistemi ligando libero-metallo e il complesso

In figura 7.3 è riportato l'effetto dell'InsP₆ sulla solubilità del Fe³⁺ a pH 7.4.

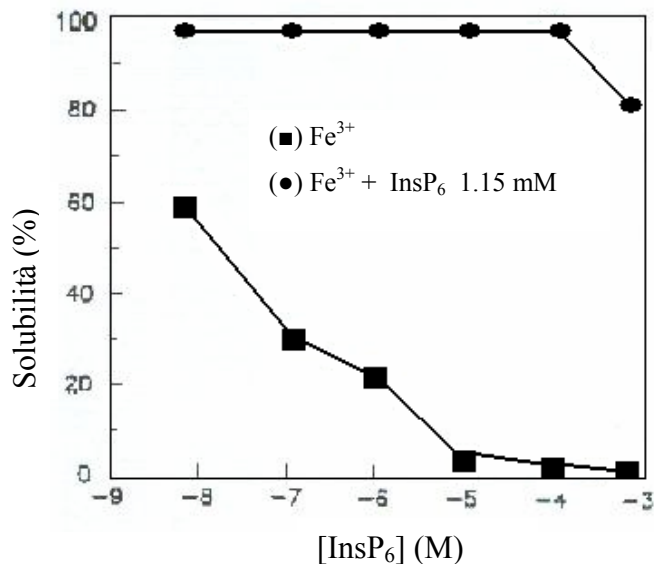


Figura 7.3

In assenza di InsP₆, il Fe³⁺ è completamente insolubile a valori di pH neutri o elevati in seguito alla formazione di complessi polinucleari di idrossido ferrico. Elevate concentrazioni di InsP₆ solubilizzano il ferro come complesso (Fe³⁺)₁-InsP₆ (il pedice indica il numero di cationi ferrici complessati da InsP₆), mentre basse concentrazioni precipitano il ferro come complessi (Fe³⁺)₃-InsP₆ e (Fe³⁺)₄-InsP₆. Il grado di solubilità del complesso (Fe³⁺)₂-InsP₆ è difficile da determinare perché la sua formazione implica la presenza di specie insolubili. Solo il complesso (Fe³⁺)₁-InsP₆ può essere preparato in forma relativamente pura con l'aggiunta di un largo eccesso di acido fitico.

Le costanti di dissociazione dei vari complessi (Fe³⁺)_n-InsP₆ non sono note. Studi sulla solubilità del ferro hanno tuttavia evidenziato l'elevata affinità dell'InsP₆ per il Fe³⁺. La chelazione del ferro da parte dell'InsP₆ previene la formazione di aggregati polinucleari insolubili anche in presenza di basse concentrazioni di ferro.

L'InsP₆ occupa tutti i sei siti di coordinazione del ferro trivalente allontanando tutta l'acqua di coordinazione dal complesso (Fe³⁺)₁-InsP₆. Questo chelato non ha un sito di coordinazione per l'acqua come dimostra il trattamento con azide¹¹¹.

Un ideale chelante del ferro dovrebbe avere una selettività per il ferro talmente elevata da minimizzare la chelazione di altri cationi metallici essenziali, e quindi evitare una loro deficienza che è causa di numerose patologie. I ligandi che preferiscono il Fe(II) presentano un'apprezzabile affinità per gli altri cationi bivalenti di interesse biologico, come gli ioni Cu(II) e Zn(II). Al contrario, i ligandi che preferiscono il Fe(III) sono in genere più selettivi. Molti cationi trivalenti, come ad esempio Al(III) e Ga(III), non sono essenziali per le cellule viventi e quindi, in ambiente biologico, il Fe(III) è praticamente il bersaglio esclusivo di questi chelanti. I chelanti del Fe(III) presentano anche un'apprezzabile affinità per il Cu(II), tuttavia questo non rappresenta un problema perché nei sistemi biologici il rame è legato stabilmente a diverse proteine¹¹².

7.4 Inibizione delle reazioni ossidative

Come noto, il ferro libero e alcuni suoi complessi facilitano la formazione di specie radicaliche con reattività simile a quella del radicale idrossilico. La formazione ferro-catalizzata di [•]OH necessita della solubilizzazione del metallo e della disponibilità di almeno un sito di coordinazione. Chelando parzialmente il ferro molti complessati ne aumentano la solubilità e quindi la funzione catalitica. Le reazioni di ossidazione ferro-dipendenti possono essere inibite dall'InsP₆ in tre possibili modi. L'acido fitico può occupare tutti i siti di coordinazione reattivi del ferro rendendolo cataliticamente inerte; può bloccare il ciclo redox del ferro necessario per queste reazioni e infine impedire l'interazione tra il metallo reattivo e il substrato che potrebbe essere danneggiato.

¹¹¹ Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W.; *Journal of Biological Chemistry*; **1984**; 259; 3620-3624.

¹¹² O'Halloran, T. V.; *Science*; **1993**; 261; 1178.

L'InsP₆ aumenta la solubilità del catione Fe³⁺, ma rende il metallo totalmente inerte in quanto nel complesso (Fe³⁺)₁-InsP₆ non vi sono siti di coordinazione accessibili all'acqua. Come mostrato in figura 7.4 il complesso con rapporto molare Fe³⁺/InsP₆ pari a 0.25 inibisce completamente la reazione di formazione del radicale [•]OH. Al contrario, il complesso Fe³⁺-ADP, non impedendo all'acqua di interagire con lo ione metallico, aumenta la formazione di radicali idrossilici¹¹³.

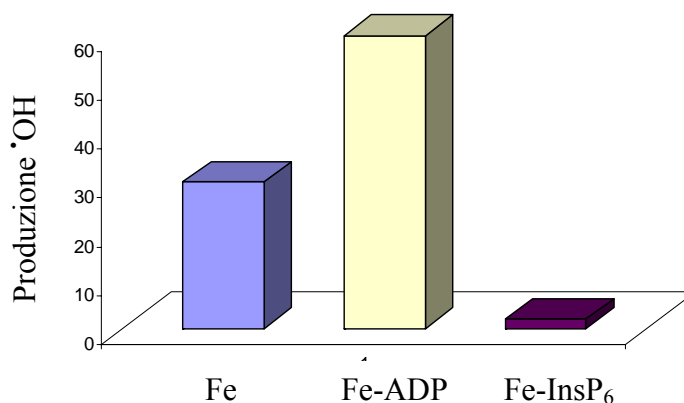


Figura 7.4

Le proprietà anti-ossidanti dell'InsP₆ sono state studiate in una serie di esperimenti in vitro applicando la spettrometria ESR (Risonanza di Spin Elettronico) in combinazione con lo "Spin Trapping". La tecnica si basa sulla reazione del radicale libero formato con un composto diamagnetico per produrre un addotto di spin relativamente stabile. Lo spin trapping dà l'opportunità, non solo di rilevare i radicali, ma anche di determinarne la natura.

I risultati indicano che gli effetti antiossidanti dell'acido fitico avvengono attraverso la chelazione del ferro tramite i gruppi fosfati presenti nella molecola. La figura 7.5 mostra l'andamento normalizzato della produzione di [•]OH in funzione della concentrazione di InsP₆.

¹¹³ Graf, E.; Eaton, J. W.; Free Radical Biology and Medicine; **1990**; 8; 61-69.

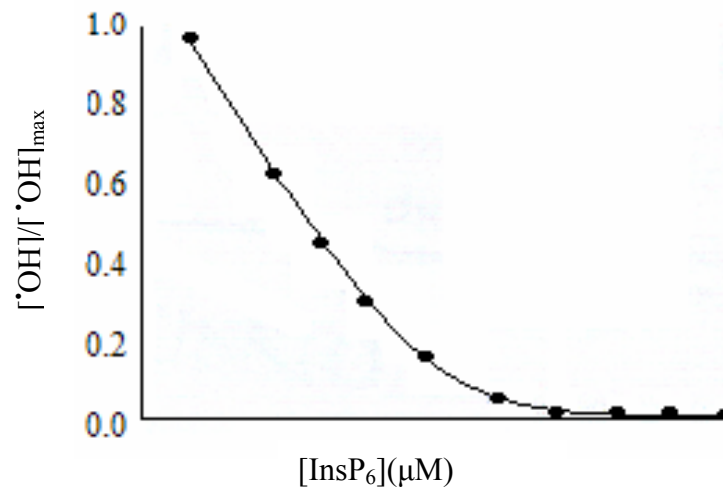


Figura 7.5

In questo caso la totale inibizione della formazione di radicali liberi è stata ottenuta con un rapporto molare $\text{InsP}_6/\text{Fe}^{3+} > 5^{114}$.

L'InsP₆ inibisce la perossidazione lipidica dell'acido arachidonico catalizzata dal ferro e dall'ascorbato (fig. 7.6). Evidenze sperimentali di tale fenomeno si ottengono da misure spettrofotometriche della quantità di malondialdeide formata durante il processo di perossidazione. La stessa procedura applicata al complesso $\text{Fe}^{3+}/\text{ADP}$ dimostra come quest'ultimo non possieda alcun effetto inibitorio sulla perossidazione lipidica.

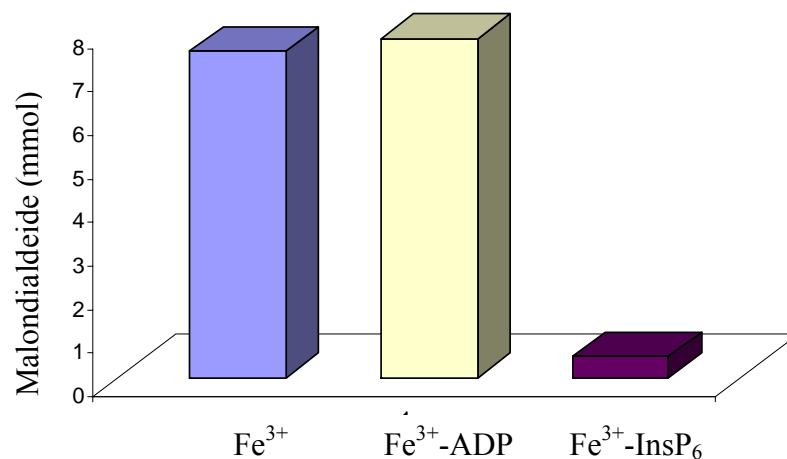


Figura 7.6

¹¹⁴ Rimbach, G.; Pallauf, J.; The journal of Nutrition, **1998**; 128 (11); 1950-1955.

7.5 Effetti cellulari dell'InsP₆

L'InsP₆ è presente in tutti i tipi di cellule eucariotiche, dove ha una notevole varietà di funzioni: neurotrasmissione, attivazione della proteina chinasi C, inibizione delle fosfatasi, attivazione dei canali al Ca²⁺ di tipo L, attenuazione della desensitizzazione dei recettori indotta da un eccesso di agonista, trasporto del ferro, azione antiossidante cellulare, attivazione di enzimi coinvolti nella riparazione del DNA, regolazione della fuoriuscita di mRNA dal nucleo^[33].

Dati di letteratura indicano che l'InsP₆ regola le funzioni cellulari in due differenti modi. Il primo ipotizza il blocco delle proteine bersaglio in determinate configurazioni inattive. In seguito, un segnale regolatorio può essere diretto a modificare covalentemente queste proteine che riducono così la loro affinità per l'InsP₆ e, dissociandosene, riacquistano la loro funzione. La seconda ipotesi prevede una regolazione dei livelli intracellulari di InsP₆. Si è osservata una variazione locale della concentrazione di InsP₆ mentre i livelli totali risultano praticamente costanti. Evidenza a supporto di questa ipotesi, e della natura metabolicamente attiva dell'InsP₆, vengono da studi effettuati su tireociti in cui si registra una riduzione del quantità di [³H] InsP₆ in seguito all'attivazione di specifici recettori di superficie.

Volendo valutare il ruolo dell'InsP₆ in vivo, è necessario effettuare esperimenti in vitro a concentrazioni fisiologicamente rilevanti. Sfortunatamente, quest'ultimo parametro è piuttosto difficile da determinare e il solo dato riportato in letteratura si riferisce alla concentrazione cellulare totale di InsP₆ che è compresa in un intervallo di 15-100 μM¹¹⁵. Ulteriore incertezza sull'effettiva concentrazione di InsP₆ disponibile nei vari compartimenti sottocellulari deriva dal fatto che un elevato numero di proteine può legarlo riducendone la solubilità. Ci sono, infine, evidenze sperimentali che indicano che la superficie della membrana cellulare agisce come un adesivo intracellulare per l'InsP₆ attraverso un legame elettrostatico InsP₆-cationi-fosfolipidi che si verifica nelle condizioni fisiologiche di forza ionica.

¹¹⁵ Bunce, C. M.; French, P. J.; Allen, P.; Mountford, J. C.; Moor, B.; Greaves, M. F.; Michell, R. H.; Brown, G.; *Biochemical Journal*; **1993**; 289; 667-673.

7.6 Interazione InsP₆-proteine

L'InsP₆ è una molecola con un'elevata densità di cariche negative che gli conferiscono la predisposizione a legare le proteine mediante interazioni elettrostatiche. In particolare, ciò si verifica a valori di pH inferiori al punto isoelettrico della proteina. L'InsP₆ forma legami elettrostatici molto forti con residui aminoacidici basici che a valori acidi di pH risultano protonati; a pH neutri o alcalini, sia l'InsP₆ che le proteine presentano cariche negative che ne ostacolano l'associazione. In questo caso è tuttavia possibile che cationi polivalenti formino ponti tra l'InsP₆ e le proteine promovendone l'associazione.

Un ligando altamente polare, come l'InsP₆, influenza l'elettrostatica che definisce la natura delle interazioni proteina-proteina. Per due proteine che si legano, l'attrazione elettrostatica a lungo raggio promuove inizialmente un transiente complesso a bassa affinità che successivamente riarrangia a formare un complesso con interazioni più specifiche ad alta affinità. In condizioni fisiologicamente rilevanti di forza ionica, è improbabile che l'InsP₆ modifichi le interazioni a bassa affinità; è tuttavia possibile che influenzi la formazione del complesso ad elevata affinità. Il legame dell'InsP₆ alle proteine, ne altera sostanzialmente il potenziale elettrostatico nelle immediate vicinanze del sito di legame attraverso l'introduzione di nuove cariche e la neutralizzazione di altre¹¹⁶.

Per questa capacità di legare le proteine, l'InsP₆ inibisce vari enzimi quali polifenolo-ossidasi, α -amilasi, alcool-deidrogenasi, tripsina ed altri.

Tuttavia, è necessario considerare la possibilità di interazioni non specifiche tra proteine e InsP₆ in vitro. Il contesto fisiologicamente rilevante per l'InsP₆ è quello in cui alcune delle sue cariche negative sono neutralizzate dall'associazione con un catione divalente. In questa situazione sono minimizzate le interazioni elettrostatiche non specifiche, mentre rimane alla potenziale proteina bersaglio l'opportunità di ricercare con elevata specificità l'arrangiamento spaziale di gruppi fosfati attorno all'anello dell'inositolo. Le interazioni dell'InsP₆ con le proteine in vitro possono quindi avere una rilevanza fisiologica maggiore se osservate in un ambiente in cui sia la forza ionica sia la concentrazione dei cationi metallici, quali Ca²⁺ e Mg²⁺, sono simili a quelle delle cellule intatte.

¹¹⁶ Sheinerman, F. B.; Norel, R.; Honig, B.; *Curr. Biol.*; **2000**; 10; 153-159

Inoltre, sebbene la massa molare dell'InsP₆ sia di 660 Da, esso può assumere le proprietà di una molecola molto più grande, eluendo da una colonna ad estrusione, e presentare un peso apparente di 9 kDa. Un'accettabile spiegazione per questo fenomeno non è ancora stata data, ma sembra che l'InsP₆ possa aggregarsi in un complesso macromolecolare multivalente. Anche questo problema può essere risolto lavorando a valori di forza ionica fisiologicamente rilevanti in cui l'InsP₆ è presente maggiormente come molecola singola¹¹⁷.

7.7 Proprietà anticancro dell'InsP₆

L'assunzione di InsP₆ tramite l'alimentazione può spiegare alcune variazioni nell'incidenza del cancro al colon osservate in differenti popolazioni. Questo dato fu inizialmente spiegato ipotizzando che un'alimentazione ricca di fibre avesse effetto protettivo poiché accelerava il movimento dei cibi attraverso il tratto gastrointestinale. In seguito una nuova ipotesi, supportata da alcune osservazioni ed esperimenti, attribuì all'InsP₆ presente nell'alimentazione un ruolo più importante di quello ricoperto dalle fibre¹¹⁸.

La cancerogenesi, innanzi tutto, può includere la formazione metallo-catalizzata di specie reattive dell'ossigeno e la scissione del DNA. Come visto, l'InsP₆, legando il ferro libero, blocca le reazioni di ossidazione ferro catalizzate. Poiché l'intestino contiene una grande quantità di ferro reattivo (particolarmente nel caso di popolazioni che hanno alimentazioni ricche di carne rossa), la presenza dell'InsP₆ può agire inibendo lo stadio ferro dipendente della cancerogenesi.

L'analisi dei dati epidemiologici disponibili rivela, inoltre, che la correlazione tra elevato assunzione di InsP₆ e bassa incidenza di cancro al colon è molto superiore alla correlazione tra alimentazione ricca di fibre e riduzione del cancro. Diete ricche di fibre, ma povere di InsP₆, hanno scarsi effetti antineoplastici, mentre la somministrazione di InsP₆ puro produce effetti significativi.

I risultati di studi su topi trattati con azossimetano, un potente induttore tumorale, e con InsP₆ indicano che, sei mesi dopo l'inizio del trattamento, gli animali che

¹¹⁷ Ali, N.; Craxton, A.; Shears, S. B.; *Journal of Biological Chemistry*; **1993**; 268; 6161-6167

¹¹⁸ Graf, E.; Eaton, J. W.; *Cancer*; **1985**; 56; 717-718.

ricevevano l'InsP₆ presentavano un minor numero di neoplasie rispetto a quelli che non lo ricevevano e che i tumori erano circa 2-3 volte più piccoli. In seguito è stato scoperto che l'inibizione del cancro era dose-dipendente.

Studi in vitro, infine, hanno dimostrato che l'InsP₆ riduce la proliferazione cellulare in differenti linee cellulari quali quelle plasmatiche, epatiche e pancreatiche.

7.8 Applicazioni biomediche dell'InsP₆

Per la sua affinità verso lo ione Ca²⁺, l'InsP₆ può essere assorbito nella idrossiapatite, un complesso cristallino di fosfato di calcio (Ca[PO₄]₃OH) che è la struttura elementare più importante di vertebre, ossa e denti. Questa capacità è stata analizzata per la progettazione di nuovi prodotti orali per il blocco della placca e della carie¹¹⁹.

L'assorbimento dell'InsP₆ nei cristalli di calcio ha, inoltre, benefici risvolti nel prevenire la crescita dei calcoli renali. Una dieta ricca di InsP₆ è stata usata efficacemente nel trattamento dell'ipercaleciuria, e studi epidemiologici hanno rivelato che l'apporto di InsP₆ nell'alimentazione è inversamente proporzionale all'incidenza dei calcoli renali. Ciò probabilmente è dovuto alla chelazione del Ca²⁺ da parte dell'InsP₆ che evita la formazione di cristalli di ossalato di calcio e di fosfato di calcio¹²⁰.

L'InsP₆ mostra effetto inibente sull'aggregazione piastrinica. Importanti usi clinici di eritrociti contenenti InsP₆ sono attualmente in studio nel trattamento di disordini che derivano da una bassa ossigenazione tissutale quali ischemia, anemia emolitica, insufficienza polmonare e eritrocitosi.

L'inibizione dell' α -amilasi inoltre riduce i livelli di glucosio plasmatici e può essere utile nel trattamento clinico del diabete.

L'InsP₆ ha, infine, grazie alle sue proprietà chelanti, notevoli effetti benefici su problemi cardiocircolatori quali ipercolesterolemia e aterosclerosi.

¹¹⁹ Raboy, V.; *Phytochemistry*; **2003**; 64; 1033-1043.

¹²⁰ Henneman, P. H.; Benedict, P. H.; Forbes, A. P.; Dudley, R. H.; *New England Journal of Medicine*; **1992**; 259; 802-807.

7.9 Applicazioni industriali dell'InsP₆

Molti cibi sono estremamente sensibili all'ossidazione all'aria a causa del loro elevato contenuto di ferro e acidi grassi. Livelli di ossigeno superiori al 1% all'interno dei contenitori per i cibi possono causare indesiderati cambiamenti di struttura, decolorazioni, variazione di sapori, perdita di nutrienti e rischi di contaminazioni microbiche. Le industrie alimentari tentano di ridurre questi effetti eliminando l'ossigeno dai contenitori e/o aggiungendo antiossidanti, tra cui l'InsP₆.

L'InsP₆ previene inoltre la perossidazione lipidica che avviene in seguito alla liberazione di ferro, presente nella mioglobina, con la cottura di carne, pollo e pesce.

Per la capacità di chelare e inattivare il ferro, l'InsP₆ è, inoltre, utilizzato come componente di film di rivestimento per metalli di cui impedisce la corrosione e a cui conferisce maggiore resistenza, buona saldabilità e migliore aspetto¹²¹.

¹²¹ Graf, E.; Eaton, J. W.; Free Radical Biology and Medicine; **1990**; 8; 61-69.

CAPITOLO VIII

MICROSFERE POLIMERICHE DI *MYO*-INOSITOLO FOSFORILATO: CHELAZIONE DEL Fe³⁺ ED ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

8.1 Introduzione

L'acido fitico (InsP₆) è un antiossidante che agisce a livello del ciclo redox del ferro. Coordinandosi al Fe³⁺ inibisce, infatti, la reazione di Fenton responsabile della produzione di radicali liberi¹²².

I dati di inibizione osservati per il copolimero solubile II (figura 6.7) nei confronti della perossidazione lipidica, hanno consentito di affermare che i raggruppamenti funzionali derivanti da molecole con proprietà antiossidanti in un sistema polimerico mantengono inalterata tale attività. Queste osservazioni sperimentali fanno supporre che matrici polimeriche insolubili recanti gli stessi gruppi funzionali, (*myo*-inositolo fosforilato), possono esibire allo stesso modo proprietà antiossidanti. Resine così fatte avrebbero potenzialità applicative notevoli sia in campo farmaceutico che industriale.

Il presente lavoro parte con la progettazione di realizzare nano e microsfere recanti unità di *myo*-inositolo fosforilato, utili per allontanare il Fe³⁺, causa di alcune patologie, dai fluidi biologici, evitando quindi lo stress ossidativo che deriva dalla produzione di radicali liberi ferro-catalizzata. Superata la difficoltà di ottenere delle sfere polimeriche di dimensioni ridotte (<200nm)¹²³, il traguardo successivo sarà quello di verificare se l'acido fitico mantenesse la sua attività antiossidante in un reticolo polimerico. L'ultimo, ma non meno importante, obiettivo è la realizzazione di materiali strutturati biocompatibili.

¹²² Graf, E.; Eaton, J. W.; Free Radical Biology and Medicine; **1990**; 8; 61-69.

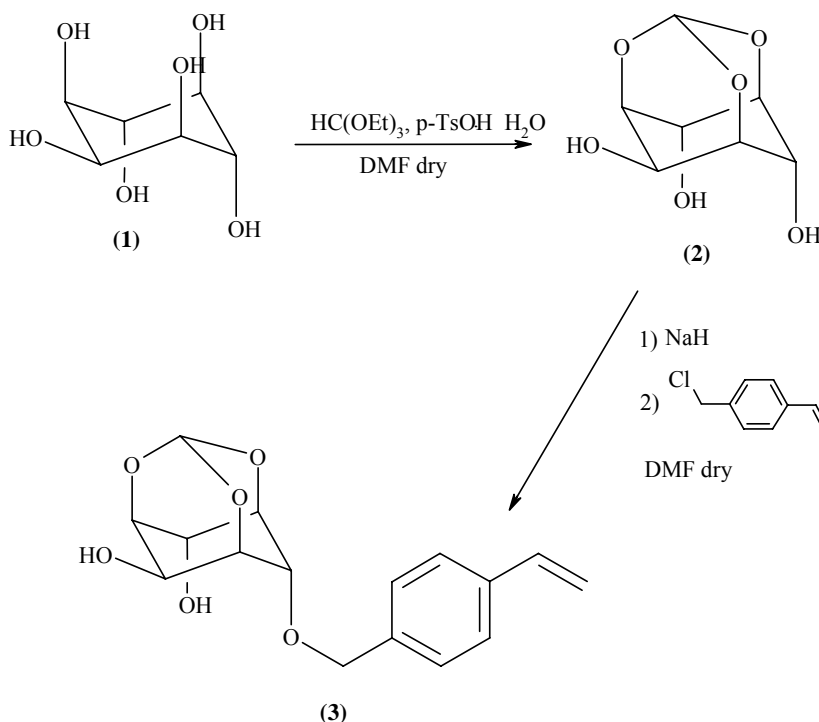
¹²³ R.Gref et al; Advanced Drug Delivery Reviews; **1995**; 16; 215-233.

8.2 Sintesi del monomero

Il *myo*-inositolo commerciale (**1**) rappresenta il substrato di partenza per ottenere il monomero solubile (**3**) mediante l'introduzione di una funzione chimica suscettibile di polimerizzazione radicalica.

La sintesi del 4-(4-vinilbenzil)-*myo*-inositolo ortoformiato (**3**) (schema 8.1) prevede due reazioni successive. La prima consiste nella protezione dei gruppi ossidrilici assiali in posizione 1, 3 e 5 del *myo*-inositolo con un gruppo ortoformiato; la seconda la funzionalizzazione di uno dei due gruppi assiali rimasti liberi con clorometilstirene. La reazione di protezione con ortoformiato è stata eseguita, come riportato in letteratura¹²⁴, con trietilortoformiato in presenza di quantità catalitiche di acido *p*-toluenosolfonico, in dimetilformammide (DMF) anidra.

Il prodotto, *myo*-inositolo ortoformiato (**2**) è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando CH_3CN come eluente e caratterizzato mediante GC/MS, IR e 1H -NMR.



Schema 8.1

¹²⁴ Lee, H. W.; Kishi, Y.; Journal of Organic Chemistry; **1985**; 50; 4402-4404.

Il trattamento di **(2)** con idruro di sodio e clorometilstirene consente la formazione di un etere benzilico **(3)**. Dati di letteratura¹²⁵ indicano che tale reazione interessa esclusivamente gli ossidrili liberi in posizione assiale. La reazione, effettuata in DMF anidra a temperatura ambiente, avviene in tempi brevi e fornisce **(3)** sotto forma di polvere che è purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente n-esano/acetato di etile (50/50). La sua struttura è stata confermata da dati di GC/MS, IR e ¹H-NMR.

8.3 Preparazione delle microsfere

Le microsfere sono state preparate mediante la tecnica di polimerizzazione per precipitazione, seguita dalla fosforilazione, dopo gli opportuni lavaggi, delle unità di *myo*-inositolo ancorate alla matrice polimerica.

8.3.1 Polimerizzazione per precipitazione

Il metodo scelto per la sintesi dei polimeri è stato quello della polimerizzazione per precipitazione¹²⁶, questo è un metodo di semplice applicazione, che porta alla formazione di grandi quantità di materiale sferico e di dimensioni omogenee.

Il meccanismo proposto per questa procedura sintetica è caratterizzato da due fasi: *nucleazione* e *crescita* delle microsfere (fig. 8.1).

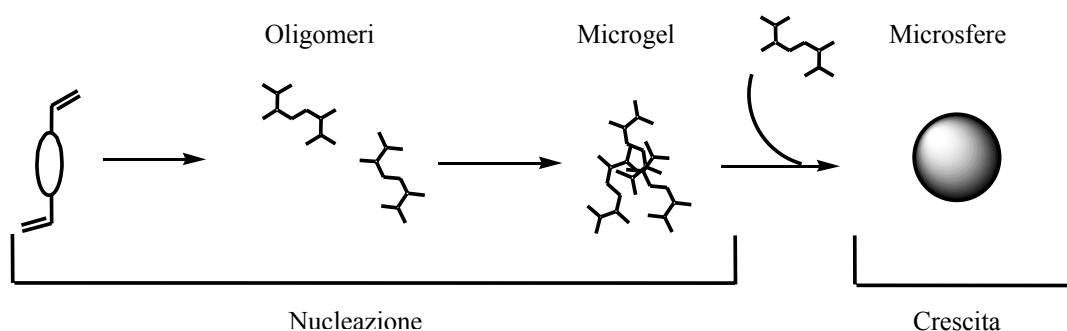


Figura 8.1

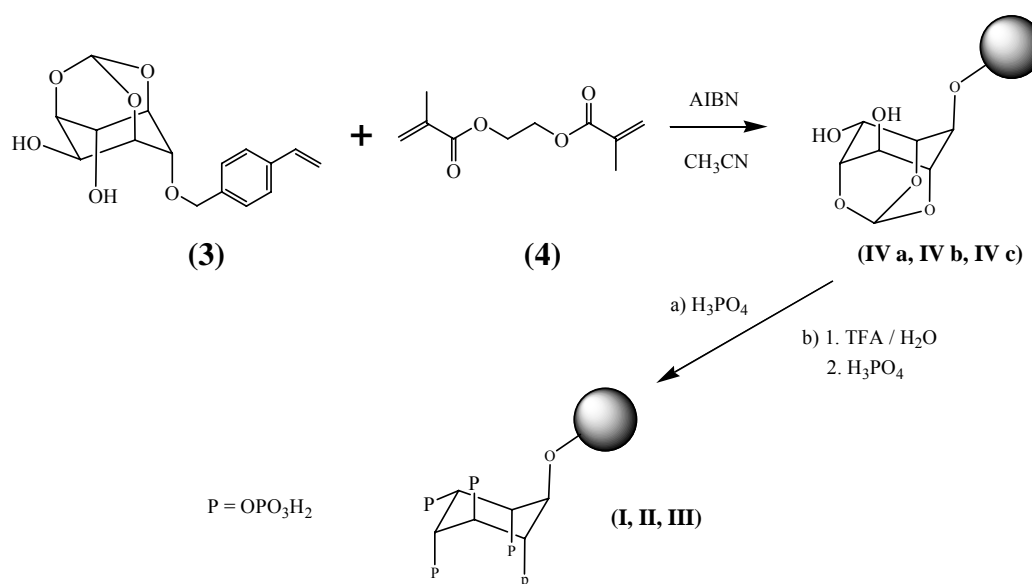
¹²⁵ Billington, D. C.; Baker, R.; Kulagowski, J. J.; Mawer, I. M.; Vacca, J. P.; deSolms, S. J.; Huff, J. R.; J. Chem. Soc. Perkin Trans. I; **1989**; 1423-1429

¹²⁶ G. Wang; P.A.G. Cormack; D.C. Sherrington; E. Khoshdel; **2003**; 115; 5494-5496.

Il metodo prevede la solubilizzazione del monomero funzionale **(3)**, del reticolante (etilenglicoldimetacrilato, EGDMA **(4)**) nel solvente organico (acetonitrile) e dell'iniziatore (azobisisobutirronitrile, AIBN) (schema 8.2). Il pallone con la miscela dei reagenti è stato quindi posto in un sistema in rotazione in un bagno ad olio a 60°C per 24 ore.

La reazione comincia come un'usuale polimerizzazione in soluzione, dove si ha, inizialmente, la formazione di oligomeri; dopo un certo periodo di tempo la concentrazione degli oligomeri diviene sufficientemente alta da permettere la polimerizzazione degli oligomeri formando un microgel (nucleazione). La crescita delle particelle avviene, prevalentemente per la precipitazione entropica dei microgel, seguita da continua cattura di oligomeri dalla soluzione.

È importante notare che dal cambiamento delle condizioni di reazione, quali la velocità di rotazione, tipo di solvente e concentrazione si possono ottenere sfere con differenti dimensioni (micro o nanosfere).



Schema 8.2

In questo modo, sono stati preparati i polimeri **IV** (IVa, IVb e IVc) con diversi rapporti molari di **(3)** ed EGDMA presentati in tabella 8.1.

Polimero IV	4-Vinilbenzil Myo-inositolo Ortoformiato (mmol)	EGDMA (mmol)	Conversione (%)
a	1,96	5,88	64
b	1,63	6,52	62
c	1,37	6,85	65

Tabella 8.1

Le microsfere così ottenute (IVa, IVb, IVc) presentano delle unità di *myo*-inositolo con gruppi idrossilici protetti da gruppi ortoformiato in posizione 1, 3, 5. Queste vengono filtrate e lavate con solventi organici.

Dati di letteratura¹²⁷ riportano la fosforilazione del *myo*-inositolo mediante reazione con H₃PO₄ conc. a 120°C; inoltre, la liberazione degli ossidrili in posizione 1,3,5 delle unità di *myo*-inositolo è effettuata in ambiente acido, e nello specifico con acido trifluoroacetico.

Quindi, il trattamento con H₃PO₄ 85% dovrebbe portare alla contemporanea deprotezione e fosforilazione delle unità di *myo*-inositolo (schema 3.2).

Ciò è confermato dal fatto che sia la fosforilazione delle microsfere in seguito a trattamento con acido trifluoroacetico, che la loro diretta fosforilazione porta ad un materiale che presenta lo stessa quantità di gruppi fosfato.

In seguito al processo di fosforilazione, il materiale viene filtrato e lavato prima con acqua distillata fino a pH neutro ed in seguito con solventi organici.

8.4 Analisi del materiale ottenuto

Sul materiale sono state eseguite delle analisi di tipo dimensionale, morfologico e analitico, come la determinazione dei gruppi fosfato che prova la avvenuta fosforilazione delle unità di *myo*-inositolo.

¹²⁷ Cosgrove, JSFAAE; J. Sc. Food Agr.; **1966**; 17; 550-553.

8.4.1 Analisi dimensionale

Le analisi dimensionali delle microsfere sono state effettuate prima e dopo la reazione di fosforilazione. Queste analisi, hanno mostrato uno stretto range di distribuzione nelle dimensioni delle microsfere. Come si può vedere in figura 8.2, la maggior parte delle particelle possiede un diametro compreso tra i 4 e i 6 μm sia per le microsfere fosforilate che non fosforilate, ciò dimostra che la fosforilazione non comporta essenzialmente modifiche dimensionali alle microsfere.

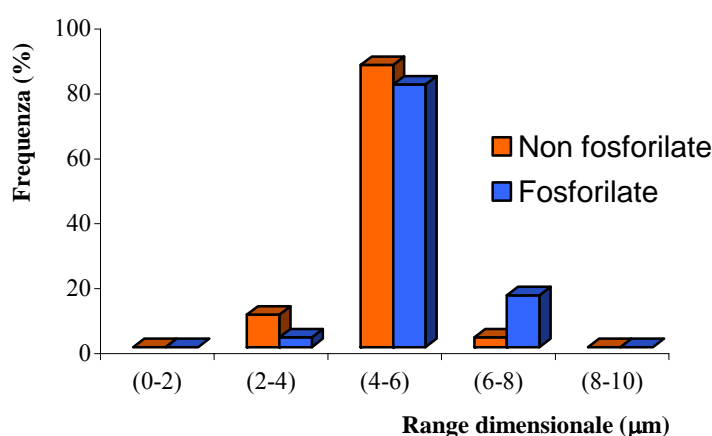


Figura 8.2

8.4.2 Analisi morfologica

Ad ulteriore conferma della validità del metodo di polimerizzazione per precipitazione per l'ottenimento di microsfere di buona qualità, sono venute le analisi morfologiche del materiale sintetizzato. Tutti i materiali polimerici ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico per confermare la conformazione sferica. In figura 8.3 possiamo inoltre osservare la micrografia a scansione elettronica di uno dei polimeri ottenuti (**I**) prima (fig. 8.3a) e dopo la reazione di fosforilazione (fig. 8.3b).

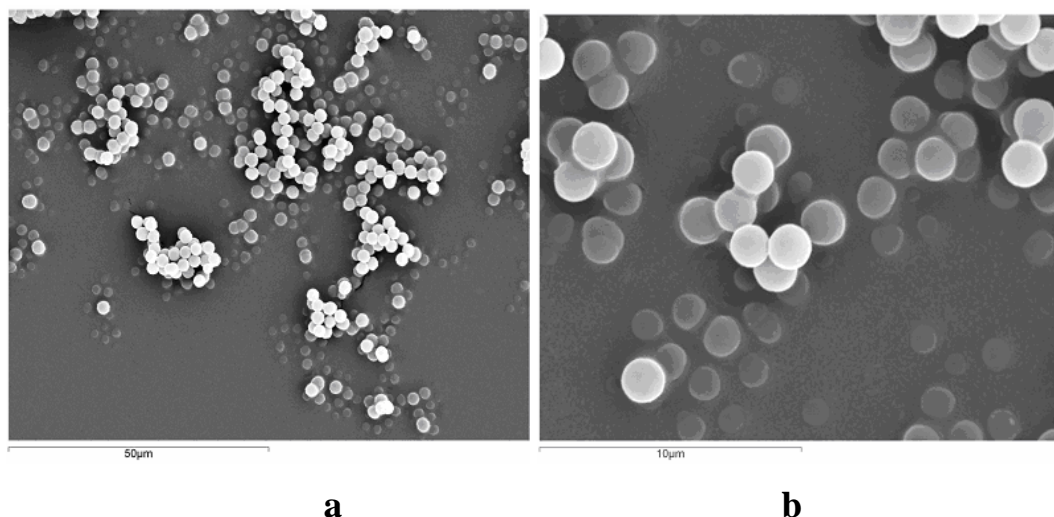


Figura 8.3

8.4.3 Determinazione quantitativa dei gruppi fosfato nelle microsfe

Al fine di valutare le proprietà del materiale ottenuto, è necessario determinare la quantità di gruppi fosfato in (I), (II) e (III), riferito all'unità di peso del polimero. Tale determinazione, infatti, è un'utile indicazione circa l'attività antiossidante del polimero stesso.

Il metodo utilizzato¹²⁸ prevede la reazione tra i gruppi fosfato e un reattivo costituito da una soluzione acquosa acida di vanadato d'ammonio e molibdato d'ammonio per formare un complesso di colore giallo: l'acido fosfovanadomolibdico che assorbe alla lunghezza d'onda di 420 nm. Poiché il metodo è applicabile solo ai fosfati liberi, è necessaria la preventiva idrolisi dei legami tra i gruppi fosfati e le unità di *myo*-inositolo. Questo è realizzato mediante reazione tra una sospensione acquosa delle microsfe e una miscela di HCl/HNO₃ a 100°C.

La concentrazione dei fosfati liberi è ricavata applicando la legge di Lambert-Beer dopo aver effettuato misure spettrofotometriche.

Prelevando aliquote crescenti di una soluzione standard di KH₂PO₄ con concentrazione equivalente a 2 g/l di P₂O₅ e facendole reagire con una quantità prestabilita del reattivo vanado-molibdico, è possibile costruire una curva di taratura della trasmittanza in funzione della concentrazione di P₂O₅ (fig. 8.4).

¹²⁸ Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana; 5 agosto 1986; 180; 158-160.

Effettuando la stessa reazione sulle acque d'idrolisi delle microsfere, allontanate tramite filtrazione, e misurando la trasmittanza della soluzione trattata con il reattivo a base di vanado-molibdato di ammonio, tale grafico permette per estrapolazione di ricavare la quantità di P₂O₅ presente nella soluzione idrolizzata.

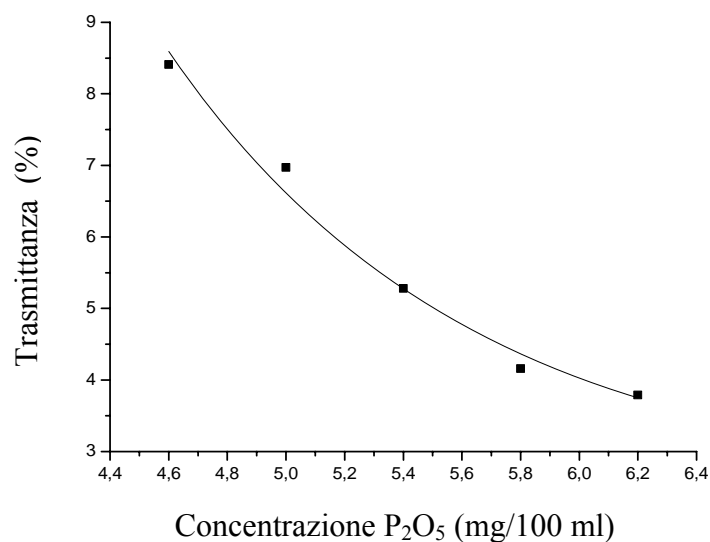


Figura 8.4

In tabella 8.2 sono illustrati i risultati ottenuti sulle concentrazione dei fosfati (in mmol per mg di polimero) ottenuti per estrapolazione della curva di taratura sperimentale.

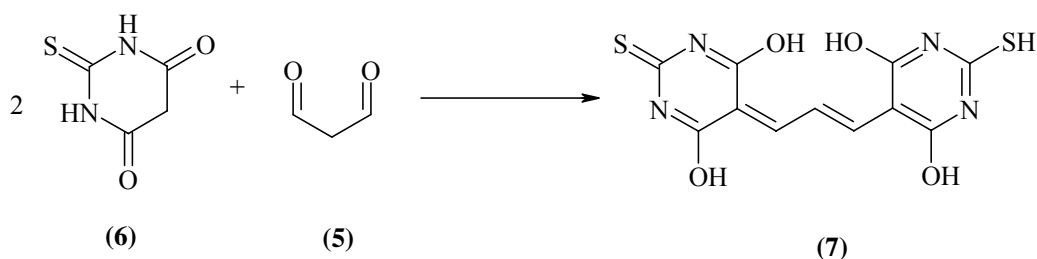
	Polimero	Fosfato (mmol/mg)
1	I	7,20
2	II	5,29
3	III	4,70

Tabella 8.2

8.5 Determinazione dell'attività antiossidante

La capacità antiossidante è stata esaminata in membrane microsomiali di fegato di ratto¹²⁹. Queste, costituite da fosfolipidi ad elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi, rappresentano il substrato ideale del processo di perossidazione lipidica. Durante tale reazione, infatti, gli acidi grassi vengono trasformati in metaboliti tossici come le aldeidi. In particolare la malondialdeide (MDA) (5) generata in modo relativamente costante e rappresenta, quindi, un buon indicatore della velocità di perossidazione¹³⁰.

Per determinare la quantità di MDA, in vitro, si sfrutta la reazione con acido tiobarbiturico (6) che porta alla formazione di un addotto (7) rilevabile, mediante spettrofotometria UV-VIS, alla lunghezza d'onda di 535 nm (sch. 8.3).



Schema 8.3

Come già riferito, l'acido fitico inibisce la perossidazione lipidica indotta dai radicali liberi prodotti dal ciclo redox del ferro. Al fine di mimare il processo della perossidazione, è stato utilizzato il cloruro ferrico come iniziatore e l'acido ascorbico quale agente riducente. In presenza dell'acido ascorbico, il Fe³⁺ viene ridotto a Fe²⁺ che catalizza la formazione di radicali idrossilici ([•]OH) responsabili della perossidazione delle membrane microsomiali.

I polimeri, sospesi in acqua e aggiunti al sistema nel range 0.5 - 6 mg per millilitro di sospensione microsomiale, si comportano da antiossidanti inibendo la formazione di MDA.

¹²⁹ Batoli, G. M.; Giannattasio, B.; Palozza, P.; Cittadini, A.; *Biochim. Biophys. Acta*; **1988**; 966; 214-221.

¹³⁰ Tatum, V. L.; Changoit, C.; Chow, C. K.; *Lipids*; **1990**; 25; 226-229.

La figura 8.4 mostra gli effetti delle differenti quantità di polimero (I), rivelatosi il più attivo, contro la produzione di MDA. Le membrane microsomiali sono state incubate in presenza di cloruro ferrico ($30 \mu M$) e acido ascorbico ($300 \mu M$) a $37^\circ C$ all'aria e al buio.

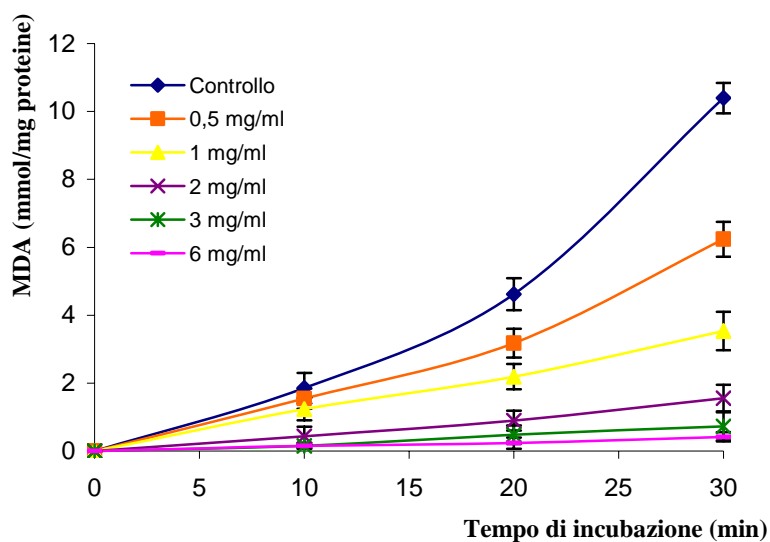


Figura 8.4

Dalla figura si osserva una soddisfacente azione antiossidante delle microsfere polimeriche testate.

Nella tabella 8.3 sono riportate le percentuali di inibizione della formazione di MDA, per i tre polimeri da parte di diverse concentrazioni di polimero per dopo 30 minuti di incubazione.

Concentrazione del polimero (mg/mL)	Inibizione formazione MDA (%)		
	Polimero I {7.20} ^(a)	Polimero II {5.29} ^(a)	Polimero III {4.70} ^(a)
0.5	40	35	18
1	67	59	41
2	87	80	70
3	93	89	76
6	96	93	81

^(a) Contenuto di fosfati (mmol/mg)

Tabella 8.3

I risultati ottenuti mostrano che polimeri (I), (II) e (III) sono efficaci inibitori della perossidazione lipidica indotta dal sistema FeCl₃ / acido ascorbico e che il loro effetto è dose e tempo dipendente (fig. 8.5).

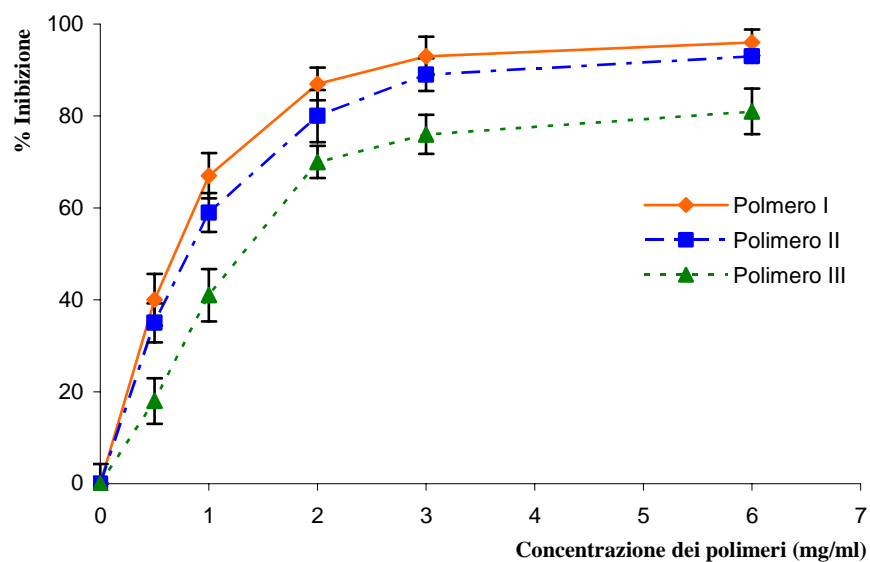


Figura 8.5

Tale grafico permette per estrapolazione grafica, di ricavare la concentrazione di polimero responsabile dell'inibizione del 50% di MDA rispetto al controllo (IC₅₀), per i polimeri (I), (II) e (III) fornendo i risultati mostrati in tabella 8.4.

Polimero	IC ₅₀ (mg/ml)
I	0,70
II	0,82
III	1,30

Tabella 8.4

Da tali dati, si può concludere che il materiale sintetizzato ha un'attività antiossidante dovuta al suo contenuto in myo-inositolo polifosfato e che il polimero con attività maggiore è quello con un maggiore contenuto di myo-inositolo e quindi di gruppi fosfati disponibili per la chelazione del ferro trivalente.

8.6 Conclusioni

Nuove microsfere polimeriche antiossidanti e specifiche per la chelazione dei metalli sono state sintetizzate con successo mediante una procedura in due passaggi. Il primo step ha visto la polimerizzazione per precipitazione di derivati del *myo*-inositolo in presenza di un agente reticolante; mediante il secondo step è stata condotta la fosforilazione esaustiva di tali derivati.

L'attività antiossidante delle microsfere sintetizzate è stata testata su membrane microsomiali di fegato di ratto, sottoposte a stress ossidativo indotto dal sistema Fe³⁺/ascorbato.

I polimeri ottenuti si sono rivelati potenti antiossidanti, questa proprietà è stata conferita alla matrice polimerica inserendo unità di *myo*-inositolo fosforilato, infatti tale funzione chimica è capace di coordinare gli ioni ferro e di prevenire la

formazione di radicali liberi ferro-catalizzata. Tale evidenza sperimentale sembra confermare l'ipotesi secondo cui il sistema polimerico realizzato potrebbe essere utile nella prevenzione del danno ossidativo indotto dal ferro in eccesso¹³¹.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'acido fitico mantiene la sua attività antiossidante in una struttura solida, il che conferisce al sistema preparato un alto potenziale per applicazioni chimiche e biomediche.

¹³¹ Iemma F, Cirillo G, Puoci F, Trombino S, Castiglione M, Picci N, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2007**, 59, 597-601

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchiature

Gli spettri IR sono stati registrati su uno spettrofotometro Perkin Elmer FT-IR Paragon 1000 PC usando pasticche o lamine di KBr.

Gli spettri UV sono stati registrati su spettrofotometro UV/VIS Jasco V-530 a 25°C usando celle di quarzo da 1 cm.

La dialisi è stata eseguita utilizzando Tubi da dialisi, taglia 6-27/32”, MEDICELL INTERNATIONAL LTD.

I campioni sono stati liofilizzati utilizzando un apparato “Freezing-drying” Micro Modulyo, Edwards.

La distribuzione dimensionale è stata fatta con un processore di immagini e un sistema di analisi Leica DMRB equipaggiato con uno stereomicroscopio Leica Wild 3D. Questo processore di immagini calcola il diametro delle particelle convertendolo nel diametro di cerchio equivalente.

Gli studi morfologici sono stati eseguiti tramite un microscopio elettronico a scansione (SEM) Jeol JSMT 330A; la superficie dei campioni è stata resa conduttrice mediante la deposizione di uno strato d’oro, effettuata sotto vuoto.

Le analisi riguardo le proprietà tensioattive sono state condotte utilizzando un tensiometro digitale ad anello TD1 Lauda (Postfach, Germania).

La centrifugazione è stata realizzata per mezzo di una centrifuga ALC multispeed PK 121 dotata di controllo della temperatura.

L’analisi HPLC è stata condotta utilizzando un cromatografo Jasco PU-2080 equipaggiato con un iniettore Rheodyne 7725i (adattato con un loop di 10 µl), un detector Jasco UV-2075 e un integratore Jasco-Borwinl. Come fase stazionaria viene utilizzata una colonna C18 a fase inversa (µBondapak 250x 4.6 mm, 10 µm di diametro interno, Waters).

Materiali

Glicidil metacrilato (GMA, 95% da GC; nome sistematico: 2,3-epossipropil metilpropenoato), divinilbenzene (DVB), cloruro di cromo, ferro, 4-dimetilamminopiridina (DMAP), 4-amminometilpiridina, nitrito di sodio, sorbitan trioleato (Span 85), N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TMEDA), persolfato d'ammonio, 2,2'-azobisisobutirronitrile (AIBN), sodio formaldeide solfossilata, t-butilidroperossido, fosfato di sodio dibasico, acido p-toluensolfonico monoidrato, trietilortoformiato, 4-vinilbenzilcloruro, etilenglicoledimetacrilato ed acido tricloroacetico sono stati ottenuti da Fluka Chemika-Biochemika (Buchs, Switzerland).

Acido Salicilico Voluminoso A.C.E.F. S.p.a.

Destrano da colture di *Leuconostoc* spp. ($M_r \sim 15000-20000$), Fluka.

Dimetilsolfossido (DMSO, <0.01% in acqua), glicina (Gly), diglicina (Gly-Gly), cloruro di metacrilato, N,N-dimetilacrilammide (DMAA), poliossietilene sorbitan trioleato (Tween 85), etilen bis acrilammide (EBA), acido metacrilico, paranitroanilina, 5-fluorouracile, teofillina, N-succil-4-o-(4,4'-dimetossitriphenil)butirrato (SDTB), molibdato di ammonio, vanadato di ammonio ed acido tiobarbiturico sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.).

N,N-dimetilaminoetil acrilato metil cloruro quaternario (ADAMEQuat®), N,N-dimetilaminoetil metacrilato metil cloruro quaternario (MADAMEQuat®) sono stati forniti da CIBA.

Acido cloridrico 37%, acido perclorico, acido acetico, 2-propanolo, acetone, n-esano, tetracloruro di carbonio (CCl₄), ammoniaca, acetonitrile, etere etilico, metanolo, tetraidrofurano (THF), trietilammina, N,N,-dimetilformammide (DMF), toluene, cloroformio, acetato di etile, cloruro di metilene, idrossido di sodio, solfato di sodio anidro ed anche acqua per HPLC, metanolo ed acetonitrile per HPLC furono acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

Nuovi sistemi polimerici a base di amminoacidi funzionalizzati

Funzionalizzazione della glicina (metodo Schotten-Baumann)

In un pallone monocollo da 250 ml vengono solubilizzati 2 g di glicina in 80 ml di una soluzione acquosa di NaOH (1M) sotto agitazione. Alla soluzione risultante vengono aggiunti 2,56 ml di cloruro di metacrilolo (agente derivatizzante) mantenendo a freddo (4-5°C) la miscela di reazione. È opportuno verificare che il pH sia basico durante lo svolgimento del suddetto procedimento. Dopo circa 3 h la glicina funzionalizzata viene recuperata mediante un processo di estrazione: la soluzione viene acidificata con HCl 37% fino a raggiungere pH=2 e successivamente estratta con acetato d'etile. Il prodotto estratto viene seccato in presenza di solfato di sodio anidro, successivamente filtrato, concentrato ed ulteriormente seccato fino ad ottenere un composto cristallino di colore bianco.

Funzionalizzazione della diglicina

L'amminoacido diglicina è stato analogamente metacrilato seguendo il procedimento sopra citato. In questo caso 2 g di diglicina sono stati funzionalizzati con 1,46 ml di cloruro di metacrilolo impiegando 40 ml di soluzione acquosa di NaOH (1M).

Polimerizzazione di amminoacidi funzionalizzati

Procedura generale

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, vengono introdotti nel seguente ordine: un opportuno solvente, l'amminoacido funzionalizzato ed il comonomero. Si è osservato sperimentalmente che i migliori risultati si ottengono utilizzando un rapporto molare 1:1 tra monomero e comonomero.

Dopo completa omogeneizzazione di tali reagenti si introduce nella fiala l'iniziatore radicalico, a questo punto la soluzione viene trasferita in un pallone monocollo preventivamente fiammato in corrente di azoto, munito di tappo a vite con setto in silicone e agitatore magnetico. La polimerizzazione viene

condotta sotto agitazione magnetica ad una temperatura stabilita fino ad osservare la formazione di un polimero con caratteristiche organolettiche specifiche.

Polimerizzazione della glicina derivatizzata con DMAA

1,67 g di glicina, precedentemente funzionalizzata, vengono completamente solubilizzati in 6,5 ml di THF distillato in una fiala codata. Successivamente si aggiungono 1,20 ml di DMAA mantenendo il sistema in corrente d'azoto. La polimerizzazione radicalica è stata avviata in seguito all'aggiunta di 141 mg di AIBN (equivalenti allo 0,5% in peso del totale dei reagenti). La miscela di polimerizzazione viene immersa in un bagno ad olio termostato alla temperatura di 62°C sotto agitazione meccanica. Dopo circa 90 minuti la reazione va a completezza; si osserva la formazione di un materiale gelatinoso di colore ambrato. Il polimero risultante (C1) è stato precipitato in acetone per ottenere una resina bianca di consistenza polverosa.

Polimerizzazione della diglicina derivatizzata con DMAA

La polimerizzazione procede in maniera analoga a quella sopra descritta; in questo caso sono stati utilizzati: 0,91 g di diglicina in 5 ml di THF e 0,47 ml di DMAA. Come iniziatore è stato scelto AIBN 6,8 mg. Dopo circa 1 h il prodotto (C2) viene recuperato per precipitazione in acetone e, anche in questo caso, si presenta come polvere bianca.

Polimerizzazione della glicina derivatizzata con ADAME

In una fiala codata in atmosfera inerte, si introducono: 2,52 g di glicina metacrilata, 3,5 ml di acqua distillata e 3,15 g di ADAME.

Tale composto quaternario è stato precedentemente purificato in colonna cromatografia al fine di allontanare l'inibitore di polimerizzazione Idrochinone Monometil Etere (MEHQ; figura 1) ad esso associato.

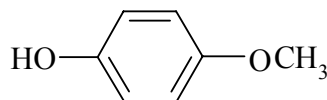


Figura 1

MEHQ è stato allontanato facendo eluire il monomero su allumina mediante una miscela di cloroformio e metanolo.

Il processo di polimerizzazione si genera dalla scissione radicalica del persolfato d'ammonio (50 mg) quando il sistema raggiunge la temperatura di 40°C. Si può notare che il comonomero utilizzato è altamente reattivo, infatti già dopo pochi minuti si osserva la formazione di un polimero gelatinoso, successivamente recuperato sotto forma di precipitato polveroso in acetonitrile (C3). Per ottenere la massima purezza del prodotto sono stati eseguiti diversi cicli di precipitazione.

Polimerizzazione della glicina derivatizzata con MADAME

(iniziatore: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)

La reazione viene avviata sciogliendo 1,18 g di glicina derivatizzata in 2,5 ml di acqua bidistillata. Quando il monomero è completamente solubilizzato si introducono nella fiala codata 1,38 ml di MADAME e, successivamente, 50 mg di $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Mantenendo la miscela di polimerizzazione sotto azoto e fissando la temperatura a 40°C, dopo circa 30 minuti si è osservata la formazione di un polimero semi-gelatinoso di colore vinaceo (C4). Anche in questo caso il prodotto viene precipitato in acetonitrile.

Polimerizzazione della glicina derivatizzata con MADAME

(iniziatore: coppia redox)

La reazione è stata condotta in un pallone monocollo nel quale sono stati introdotti 0,88 g di glicina, 3 ml di acqua bidistillata e 1,00 ml di MADAME. Ciò che differenzia questa reazione dalle precedenti è che, utilizzando come iniziatore un sistema redox la reazione avviene a freddo, in atmosfera inerte, nell'arco di pochissimi minuti.

La coppia redox è costituita da:

- sodio formaldeide solfossilata: 3,6 mg
- ter- butilidroperossido: 9 mg

È necessario monitorare il processo di polimerizzazione mentre è in corso di svolgimento al fine di interromperlo prima che la matrice raggiunga un grado di reticolazione eccessiva; in questo caso risulterebbe più difficoltoso il recupero e la purificazione del polimero. Il polimero C5 viene precipitato in acetone.

Misure della tensione superficiale

I valori di tensione superficiale di una soluzione acquosa di polimero a diverse concentrazioni sono stati misurati mediante tensiometro digitale ad anello. Sono stati preparati 6 campioni del sistema polimero/H₂O a concentrazione crescente.

La temperatura della cella di misura è stata fissata a 25 °C (incertezza $\pm 0.1^\circ\text{C}$). L'incertezza massima su σ è stata di $\pm 0.1 \text{ mNm}^{-1}$. Il tempo richiesto per ottenere valori stabili di tensione superficiale è risultato inferiore a 5 minuti.

I polimeri di cui si è valutata l'attività tensioattiva sono stati: C1, C3 e C4.

Microsfere pH-sensibili di destrano derivatizzato

Funzionalizzazione del destrano

Si solubilizza 1 g di destrano in 9 ml di dimetilsolfossido anidro in un pallone a due colli da 50 ml, munito di agitatore magnetico, fiammato in corrente d'azoto. A solubilizzazione avvenuta, si aggiungono 200 mg del catalizzatore 4-DMAP e 450 μ l di glicidimetacrilato. Le aggiunte sono eseguite sotto atmosfera d'azoto per mantenere anidro l'ambiente di reazione. La reazione viene tenuta sotto agitazione per 48 h a temperatura ambiente.

Dialisi del destrano funzionalizzato

La soluzione acquosa ottenuta dalla reazione di funzionalizzazione del destrano è stata introdotta in una porzione di tubo da dialisi precedentemente bollito in acqua distillata (allo scopo di renderlo permeabile e flessibile). Successivamente il tubo è stato immerso in una vasca di vetro contenente 20 l di acqua distillata, opportunamente termostata al fine di mantenere la temperatura costante a 20 °C.

La soluzione si lascia a dializzare per 48 ore sostituendo l'acqua della vasca con acqua distillata di fresco ogni 12 ore per allontanare le impurezze in essa contenute e favorire l'ulteriore diffusione dei sali attraverso la membrana verso l'esterno. Dopo 48 h è stato prelevato il tubo da dialisi e viene travasata la soluzione in esso contenuta in un pallone da 100 ml; questa è apparsa omogenea pertanto non è stata necessaria la sua filtrazione.

Il campione ricavato, dopo congelamento e liofilizzazione, è risultato un solido molto soffice e vaporoso di colore bianco.

Preparazione delle microsfere

Procedura generale

Un reattore cilindrico di vetro di capacità adeguata (100-150 ml), equipaggiato di agitatore meccanico, imbuto gocciolatore e tappo a vite con setto in gomma forabile, viene fiammato in corrente d'azoto e dopo raffreddamento è immerso in una vasca termostata a 40 °C. Nel reattore vengono introdotte le quantità

richieste di esano e tetracloruro di carbonio distillati (fase disperdente). Separatamente, in una fiala codata munita di agitatore magnetico e tappo a vite con setto in silicone fiammato e mantenuto sotto azoto, vengono poste le quantità pesate di monomero, iniziatore ed acqua distillata (fase dispersa). La miscela omogenea così ottenuta è stata sifonata, mediante ago flessibile, nel reattore contenente i solventi. A questo punto nel reattore viene introdotto, per mezzo di un imbuto gocciolatore, il solvente necessario affinché la densità della fase organica sia approssimativamente corrispondente a quella della fase acquosa. Terminata l'aggiunta, è stata fatta partire l'agitazione meccanica ad una velocità pari a 1000 rpm, quindi vengono aggiunti, tramite siringa, la miscela di tensioattivi (Span85 – Tween85) e dopo 10 minuti di agitazione, l'acceleratore di polimerizzazione TMEDA.

L'agitazione viene mantenuta per 2 h circa a 40 °C.

La resina ottenuta è stata filtrata e ripetutamente lavata con porzioni da 50 ml di 2-propanolo, etanolo ed infine acetone. Dopo l'ultimo lavaggio la resina viene filtrata ed essiccata a pressione ridotta per 12 h.

Determinazione del Water Regain

In un filtro con setto a porosità 2, preventivamente bagnato, centrifugato (5 minuti alla velocità di 5000 rpm) e pesato viene introdotta una quantità nota di resina (circa 50 mg).

Tale filtro viene poi pesato, riempito di un solvente ed immerso in una beuta contenente lo stesso solvente. Dopo un'ora, il filtro viene prelevato dalla beuta ed il solvente in eccesso lasciato gocciolare, quindi viene inserito in una provetta da centrifuga al fine di allontanare il solvente residuo mediante centrifugazione (5 minuti a 5000g/min). Dopo aver pesato il filtro contenente la resina più il solvente inglobato, si rimette il tutto nella beuta contenente il solvente. Lo stesso procedimento viene nuovamente eseguito dopo 4 h e dopo una notte.

Le pesate dopo centrifugazione sono state così determinate:

peso (filtro + resina + solvente inglobato) - peso (filtro umido centrifugato) =
peso (resina + solvente inglobato)

La media dei tre valori ottenuti viene inserita nella seguente formula:

$$WR(\%) = \frac{\text{peso (resina rigonfiata)} - \text{peso(resina secca)}}{\text{peso(resina secca)}} \cdot 100$$

Impregnazione dei farmaci

30 mg di farmaco sono stati disciolti in 5 ml di acqua bidistillata. A solubilizzazione avvenuta, vengono aggiunti alla soluzione 150 mg di matrice, in modo tale che la quantità di farmaco caricata sia pari al 20% p/p rispetto alla matrice. L'impregnazione viene eseguita per 3 giorni sotto agitazione a temperatura ambiente. Infine il solvente è stato rimosso mediante evaporazione sotto vuoto.

Valutazione del rilascio

10 mg di particelle impregnate sono state disperse in 10 ml di HCl 0.1 N (pH = 1, simulante il fluido gastrico). Una parte dei campioni vengono filtrati e le soluzioni risultanti sono state, a questo punto, analizzate mediante HPLC allo scopo di determinare la quantità di farmaco rilasciato ad intervalli di tempo prestabiliti. Dopo due h vengono aggiunti, nei campioni non ancora analizzati, 5 ml di Na₂HPO₄ 0.4 M in modo da portare il pH al valore di 6.8 (simulante il fluido intestinale).

Con questo procedimento sono stati analizzati due farmaci diversi, quindi è stato necessario impostare le condizioni sperimentali di HPLC più idonee per ogni tipo di sostanza:

5-fluorouracile

flusso = 0,7 ml/min; λ = 266 nm; miscela eluente H₂O/MeOH/H₃PO₄ in rapporto 97,95/2/0,05.

Teofillina

flusso = 0,5 ml/min; λ = 280 nm; miscela eluente CH₃CN/H₂O in rapporto 6/4.

Il saggio di rilascio è stato concluso nell'arco di 24 ore.

Rilascio colon-specifico di acido 5-amminosalicilico da microparticelle derivatizzate

Sintesi del supporto microparticellare: polimerizzazione per precipitazione

In un pallone da 100 ml monocollo sono introdotti 16 ml di toluene e 45 ml di acetonitrile dry, nella soluzione così ottenuta sono disciolti 2,5 ml di divinilbenzene e 0,143 ml di glicidilmetacrilato e 80 mg di AIBN.

Successivamente la soluzione viene posta sotto azoto per 10 minuti, quindi è lasciata polimerizzare fissando il pallone ad un opportuno agitatore meccanico per 48 h alla temperatura di 60°C.

Alla fine della polimerizzazione le microparticelle avente colorazione bianca lattiginosa sono filtrate e lavate con acetone, metanolo, isopropanolo, acetato d'etile, etere etilico.

Funzionalizzazione della matrice microparticellare A1 con una miscela di metanolo ammoniacale

In un pallone a due colli da 25 ml vengono introdotti 0,0304 g di matrice microparticellare in 10 ml di una miscela di metanolo ammoniacale e lo si lascia sotto agitazione magnetica per 72 h.

Si filtra e si lava la matrice microparticellare con abbondante acqua e poi, in sequenza, con i seguenti solventi organici: etanolo, isopropanolo, THF ed etere etilico.

Sulla matrice polimerica così funzionalizzata è stata effettuata la determinazione dei gruppi amminici terminali con il metodo di Gaur e Gupta ottenendo come risultato 142,4 $\mu\text{mol/g}$.

La determinazione dei gruppi amminici terminali secondo il metodo Gaur e Gupta è stata eseguita anche sulla matrice ridotta con cloruro di cromo (CrCl_2) ottenendo come risultato 24,2 $\mu\text{mol/g}$.

Procedura per la determinazione dei gruppi amminici terminali con il metodo di Gaur Gupta

A. Funzionalizzazione con N-Succil-4-o-(4,4'-dimetossitriifenil)butirrato

In un pallone da 5 ml vengono posti 10 mg del materiale da analizzare, 250 μ l di SDTB: reattivo per la determinazione dei gruppi amminici terminali secondo Gaur e Gupta, 100 μ l di trietilammina anidra e una quantità catalitica di 4-amminometilpiridina.

La miscela così ottenuta viene lasciata sotto agitazione per 2h a temperatura ambiente, successivamente la fase solida viene lavata prima con etere etilico e poi con tetraidrofurano, quindi seccata per evaporazione del solvente a pressione ridotta (0,05 torr, t.a., 4 h di trattamento).

B. Reazione di rimozione del gruppo 4,4'-dimetossitriifenilmetilico

Un campione (1-3 mg) del solido ottenuto secondo A viene pesato in un matraccio tarato e portato a volume con una miscela detritilante composta dal 52,7% di acido perclorico al 70% e dal 43,7% di metanolo.

La reazione di detrilazione viene lasciata procedere a temperatura ambiente per circa 30 minuti agitando di tanto in tanto, quindi parte del liquido è trasferito in una cuvetta a quarzo (1 cm) per la registrazione dello spettro visibile usando la stessa miscela detritilante come riferimento. Il valore al massimo di assorbimento $\lambda = 498$ nm, trattati secondo Gaur e Gupta forniscono la quantità di gruppi NH_2 liberi nel polimero espressa come $\mu\text{moli/g}$ di solido.

Reazione di apertura degli anelli epossidici mediante paranitroanilina

La reazione è stata condotta facendo reagire, in un pallone monocollo da 25 ml, 533,7 mg di resina A1 con 1,6 g di paranitroanilina. Per ottimizzare la reazione vengono utilizzati il minor quantitativo di solventi in parti uguali: 2,5 ml di DMF e 2,5 ml di trietilammina sotto corrente di azoto. La reazione viene condotta con agitazione meccanica a temperatura 50/55 °C per un tempo di 72 h.

Reazione di riduzione dei nitrogruppi

Per questa reazione sono state condotte due differenti metodologie di analisi.

Nel trattamento B, in un pallone monocollo da 5 ml fiammato sotto corrente di azoto, la matrice comprensiva di nitrogruppi, dal peso di 151,58 mg, viene fatta reagire con una aliquota pari a 65 mg di CrCl_2 e con 2 ml di DMF dry come solvente. La reazione prosegue sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente per 6 h in modo da ottenere successivamente dei gruppi amminici sulla molecola. Per questo trattamento sono state messe a punto delle prove con quantitativi differenti riportati nel capitolo VI, tabella 6.2.

Per il trattamento A, la reazione viene condotta inserendo in un pallone monocollo i quantitativi opportuni di matrice, Fe, acido acetico e HCl, quindi sottoposti ad agitazione meccanica. Anche per questo trattamento sono state messe a punto delle prove con quantitativi differenti (capitolo VI, tab. 6.1).

Per il trattamento A, a fine reazione la resina viene lavata con 200 ml di acqua distillata, 100 ml di acetone e 100 ml di etere etilico.

Per il trattamento B, invece, la resina viene successivamente lavata con le seguenti porzioni di solvente da 15 ml l'uno: DMF, metanolo e CH_2Cl_2 al fine di rimuovere i residui di cloruro di cromo.

Basificazione del supporto ridotto mediante NaOH

Il lavaggio per la basificazione del polimero è stato effettuato con 25 ml di NaOH 0,1 M in etanolo. Successivamente il prodotto viene lavato con 100 ml di acqua distillata, 100 ml di acetone e 100 ml di etere etilico.

Reazioni di diazotazione ed attacco dell'acido salicilico

La reazione di diazotazione si effettua utilizzando un pallone ad un collo da 10 ml nel quale vengono inseriti 49,11 mg di matrice, 17,36 mg di NaNO_2 , 6 ml di acqua distillata, 1 ml di etanolo, 3,2 ml di acido cloridrico concentrato. Questa reazione procede a freddo in dewar, sotto agitazione meccanica a temperatura compresa tra -1 e $+4$ °C per un tempo di 3 h.

Successivamente a questa fase si prosegue con l'attacco dell'acido salicilico inserendo nel pallone una quantità pari a 12,61 mg; risulta di particolare

importanza, in questo passaggio, il mantenimento di una temperatura compresa tra -1 e $+4$ °C che però dovrà essere, successivamente, lasciata risalire fino a temperatura ambiente per le successive 24 ore di agitazione meccanica necessarie allo svolgimento della reazione.

Microsfere polimeriche di myo-inositolo fosforilato: chelazione del Fe³⁺ ed attività' antiossidante

Sintesi del myo-inositolo ortoformiato

In un pallone a due colli da 250 ml, munito di agitatore magnetico, condensatore a ricadere e imbuto gocciolatore, accuratamente fiammato e mantenuto sotto corrente di azoto, vengono sciolti 5.4 g (30 mmol) di myo-inositolo in 80 ml di DMF anidra. La soluzione così ottenuta viene scaldata a 100°C e addizionata di 1.5 g (7.9 mmol) di acido p-toluensolfonico monoidrato (p-TsOH·H₂O) e 9 ml (54.1 mmol) di trietilortoformiato. La miscela di reazione viene lasciata agitare a 140°C per 18 h. Dopo raffreddamento, si aggiungono 10 ml di una soluzione acquosa di NaHCO₃ al 10% e si continua ad agitare per 30 min. Si allontana il solvente a pressione ridotta e il grezzo ottenuto, ripreso in un minimo di H₂O, viene purificato su colonna di gel di silice (eluente: CH₃CN). Si ottengono 4,42 g (23.3 mmol) del myo-inositolo ortoformiato (2) (Resa 76%). M/z: 190 (M⁺, 0.1%); 115 (5%); 73 (100%). IR ν (cm⁻¹): 3381, 2922, 1664, 1444, 1406, 1165, 999. ¹H-NMR (D₂O) δ (ppm): 5.46 (s, 1H); 4.44 (t, 2H, J=3.6 Hz); 4.19 (m, 1H); 4.12 (d, 1H, J=1.5 Hz); 4.09 (m, 2H).

Sintesi del 4-(4-vinilbenzil)-myo-inositolo ortoformiato

In un pallone a due colli da 250 ml, munito di agitatore magnetico e imbuto gocciolatore, accuratamente fiammato e mantenuto sotto corrente di azoto, vengono introdotti 0.320 g (10.4 mmol) di NaH (pesata in sospensione di paraffina all'80% e successivamente lavata più volte con esano anidro) in 15 ml di DMF anidra. La miscela viene addizionata di 2.00 g (10.5 mmol) di (2) sciolti in 130 ml di DMF anidra ed è lasciata agitare a temperatura ambiente per 1 h. Successivamente si aggiungono 2 ml (14.2 mmol) di 4-vinilbenzilcloruro in 5 ml di DMF anidra. La miscela così ottenuta viene lasciata agitare per 2.5 h a temperatura ambiente e successivamente idrolizzata con 5 ml di H₂O. Si allontana il solvente a pressione ridotta e il grezzo ottenuto viene ripreso con 200 ml di CHCl₃ e filtrato per allontanare l'NaCl.

L'allontanamento del CHCl_3 lascia un grezzo liquido che viene purificato su colonna di gel di silice (eluente: esano/acetato di etile 50/50 vol/vol). Si ottengono 1,76 g (5.76 mmol) di (3) (Resa 55%). M/z: 306 (M^+ , 3%); 117 (100%); 91 (5%). IR ν (cm^{-1}): 3455, 2958, 1664, 1630, 1516, 1398, 1157, 1108, 1085, 1017, 939, 889, 850, 767. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 7.43 (d, 2H, $J_o = 8.1$ Hz); 7.27 (d, 2H, $J_o = 8.1$ Hz); 6.67 (dd, 1H, $J_{\text{trans}} = 17.7$ Hz, $J_{\text{cis}} = 11.1$ Hz); 5.78 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 17.7$ Hz); 5.44 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz); 5.30 (d, 1H, $J_{\text{cis}} = 11.1$ Hz); 4.66 (d, 2H, $J = 3.6$ Hz); 4.42 (m, 2H); 4.26 (m, 4H).

Sintesi delle microsfere

I. Preparazione delle microsfere

Le microsfere polimeriche antiossidanti sono state preparate secondo la seguente procedura. Si è solubilizzato (3) in acetonitrile (55 ml) all'interno di un pallone da 100 ml, si è aggiunto l'EGDMA assieme all' AIBN (100 mg), nelle quantità riportate nella tabella A. La miscela di polimerizzazione è stata degassata gorgogliando azoto per 5 minuti. Il pallone è stato messo a reagire a lenta rotazione (40 giri/min) in un bagno ad olio mediante un sistema "tipo rotavapor". Dopo 24 ore a 60°C la resina polimerica ottenuta, è stata filtrata, lavata con 80 ml di Metanolo, 80 ml di Isopropanolo, 80 ml di acetone e 80 ml di Etere Etilico. Le microparticelle ottenute sono state seccate successivamente sotto vuoto.

Polimero	4-Vinilbenzil Myo-inositolo Orthformiato mg (mmol)	EGDMA ml (mmol)
I	600 (1,96)	1.17 (5,88)
II	500 (1,63)	1.23 (6,52)
III	420 (1,37)	1.29 (6,85)

II. fosforilazione delle microsfere

In un pallone da 250 ml munito di condensatore a ricadere, viene introdotto 1 g di resina. Si aggiungono 100 ml di H_3PO_4 85 % p/v, si agita il pallone in modo

tale da ottenere una sospensione omogenea e si pone il pallone in bagno ad olio a 120°C. Dopo 14 ore le microsfele fosforilate ottenute si filtrano, si lavano prima con acqua distillata fino ad ottenere un filtrato a pH neutro, e in seguito con 80 mL di Metanolo, 80 ml di Isopropanolo, 80 ml di acetone e 80 ml di Etere Etilico. Le microparticelle così ottenute vengono seccate sotto vuoto.

Determinazione quantitativa dei gruppi fosfato

I. Preparazione del reagente vanado-molibdato di ammonio

Si sciolgono separatamente 10 g (42.4 mmol) di molibdato di ammonio e 0,50 g (4.2 mmol) di vanadato di ammonio in un volume di H₂O distillata necessario alla solubilizzazione dei sali. Si uniscono le due soluzioni in un matraccio da 500 ml, si aggiungono 70 ml di HNO₃ conc. e si porta a volume.

II. Preparazione della curva di taratura

Si pesano 3.835 g (28.18 mmol) di KH₂PO₄ preventivamente essiccato in stufa a 105°C, si sciolgono con H₂O distillata in un matraccio da 1 l e la soluzione è portata a volume in modo da ottenere una concentrazione finale pari a 2.0 g/l di P₂O₅. Si prelevano 25 ml della soluzione ottenuta e si trasferiscono in un matraccio da 250 ml portando a volume con H₂O distillata per ottenere una soluzione di concentrazione pari a 200 mg/l di P₂O₅. Con una buretta di precisione si prelevano rispettivamente 13, 15, 17, e 19 ml della soluzione di P₂O₅ e si trasferiscono in matracci da 100 ml. Si aggiungono, in ogni matraccio, 25 ml della soluzione vanado-molibdica e si porta a volume. La soluzione ottenuta viene analizzata mediante spettrofotometro UV ($\lambda = 420$ nm).

III. Misura dei gruppi fosfati presenti nelle microsfele

In un pallone da 50 ml munito di condensatore a ricadere, vengono sospesi 100 mg del polimero in 10 ml di H₂O distillata. Si aggiungono 2.5 ml di HNO₃ conc. e 2.5 ml di HCl conc. La sospensione così ottenuta è vigorosamente agitata a 100°C per 18 ore. Successivamente si filtrano le microsfele, si trava

quantitativamente il filtrato in un matraccio da 100 ml ,si aggiungono 25 ml della soluzione vanado-molibdica e si porta a volume con H₂O distillata. La soluzione ottenuta viene analizzata mediante spettrofotometro UV ($\lambda = 420$ nm).

Attività antiossidante

I. Sospensione microsomiale

I microsomi di fegato sono stati preparati da ratti Wistar omogenizzando il tessuto con cinque volumi di una soluzione fredda di Saccarosio 0.25 M contenente Hepes 5mM, EDTA 0.5 mM a pH 7.5 in un omogenizzatore Potter-Elvehjem. Le membrane microsomiali sono state isolate mediante rimozione della frazione nucleare a 8000 g per 10 minuti e della frazione mitocondriale a 18000 g per 10 minuti. La frazione microsomiale è stata sedimentata a 105.000 g per 60 minuti, lavata una sola volta con KCl 0.15 M, raccolta e centrifugata ancora a 105.000 g per 30 minuti. Le membrane, sospese in un tampone fosfato 0.1 M a pH 7.5, sono state conservate a – 80 °C. La concentrazione proteica è stata determinata mediante metodo Bradford usando il saggio Bio-Rad.

II. Addizione dei polimeri ai microsomi

I microsomi sono stati sospesi in un tampone fosfato 0.1 M a pH 7.5. Le microsfeere sono state addizionate rapidamente al sistema per ottenere concentrazioni finali di antiossidante pari a 0.5, 1, 2, 3 e 6 mg/mL. Ai microsomi di controllo è stata invece somministrata una stessa quantità di acqua distillata. A tutti i microsomi sono state aggiunte aliquote di cloruro ferrico ed acido ascorbico per raggiungere la concentrazione finale di 30 μ M e 300 μ M. Le sospensioni sono state incubate in un bagno a 37°C, sotto agitazione, all'aria e al buio per 30 minuti.

III. Formazione di Malondialdeide (MDA)

Aliquote di 1 ml di sospensione microsomiale (0.5 mg di proteine), prelevate ogni 10 minuti, sono state aggiunte ad una soluzione cosuita da: 3 ml di acido

tricloroacetico (TCA) 0.5%, 0.5 ml di una soluzione di acido tiobarbiturico (TBA) (due parti di TBA 0.4% in HCl 0.2 M e una parte di H₂O distillata) e 0.07 ml di idrossitoluene butilato (BHT) 0.2% in etanolo al 95%. I campioni sono stati quindi incubati per 15 minuti in un bagno a 80°C e centrifugati. La formazione di MDA è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 535 nm.