



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
(XIX° Ciclo)

*Nuovi sistemi polimerici biocompatibili per la cosmetica
e la veicolazione di farmaci*

SUPERVISORE
Prof. Nevio Picci

CANDIDATA
Dott.ssa Sonia Leta

COORDINATORE
Prof. Giovanni Sindona

Anno Accademico 2005-2006

*Borsa di studio finanziata da RTC
per conto di Cotril*

INDICE

INTRODUZIONE	« 1
CAPITOLO I STRESS OSSIDATIVO ED AZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI	
1.1 Introduzione	« 4
1.2 Stress ossidativo indotto da radicali liberi	« 4
1.3 Radicali liberi di interesse biologico	« 7
1.4 Specie reattive dell'ossigeno	« 9
1.4.1 Anione superossido ($O_2^{\cdot-}$)	« 9
1.4.2 Perossido di idrogeno (H_2O_2)	« 9
1.4.3 Radicale ossidrilico (OH)	« 11
1.4.4 Radicali perossilici (ROO^{\cdot})	« 11
1.4.5 Acido ipocloroso (HClO)	« 12
1.4.6 Ossigeno singoletto (1O_2)	« 12
1.5 Specie reattive dell'azoto	« 13
1.5.1 Radicale nitrossido (NO)	« 13
1.5.2 Perossinitrito (NOO^{\cdot})	« 15
1.5.3 Radicali alchilperossinitrati (ROONO)	« 15
1.6 Antiossidanti	« 16
1.6.1 La classificazione degli antiossidanti	« 17
1.6.2 Antiossidanti enzimatici	« 18
1.6.3 Antiossidanti chelanti i metalli	« 19
1.6.4 Agenti riducenti	« 20
1.7 Antiossidanti naturali	« 21
1.7.1 Vitamina C	« 23
1.7.2 Polifenoli e flavonoidi	« 26
1.7.3 Coenzima Q_{10}	« 28
1.7.4 Vitamina E	« 33
1.7.5 Carotenoidi	« 33
1.7.6 Chitina e derivati	« 34
1.8 Antiossidanti polimerici	« 34
1.8.1 Polimerizzazione radicalica di monomeri funzionalizzati con un antiossidante	« 34
1.8.1.1 Derivato acrilico o vinilico della vitamina E	« 35
1.8.1.2 Derivato vinilico delle fenotiazine	« 35
1.8.1.3 Polianilina e polipirrolo	« 35
1.8.1.4 Polirutina	« 38
1.8.2 Introduzione di gruppi antiossidanti su matrici polimeriche	« 39

1.8.2.1	Inserimento di 2,6-diterzbutilfenolo in matrice polistirenica	« 40
1.8.2.2	Acido lipoico introdotto in matrici polistireniche	« 40
1.8.2.3	Polimeri flavonoidi	« 41
1.8.2.4	Derivato polimerico dell'acido fitico	« 41

CAPITOLO II

ACIDO LIPOICO E ACIDO FERULICO: PROPRIETÀ E APPLICAZIONI

2.1	Introduzione	« 43
2.2	Acido lipoico	« 43
2.2.1	Struttura e proprietà	« 44
2.2.2	Biosintesi	« 46
2.2.3	Metabolismo	« 47
2.2.4	Attività endogena	« 49
2.2.5	Attività antiossidante	« 50
2.2.5.1	Attività scavenger	« 50
2.2.5.2	Attività chelante	« 52
2.2.5.3	Rigenerazione di altri antiossidanti	« 53
2.2.6	Derivati dell'acido lipoico	« 55
2.2.6.1	Sintesi di nuovi antiossidanti 1,2 ditiolani	« 55
2.2.6.2	Analoghi inibitori della NOS	« 58
2.2.6.3	Nuovo derivato dell'acido lipoico: PNLP	« 57
2.3	Acido ferulico	« 58
2.3.1	Struttura e proprietà	« 59
2.3.2	Biosintesi	« 60
2.3.3	Metabolismo	« 61
2.3.4.1	Attività scavenger	« 62
2.3.4.2	Attività chelante	« 63
2.3.5	Derivati feruloilici	« 65
2.3.5.1	Sintesi di composti ammidici dell'acido ferulico	« 65
2.3.5.2	Sintesi di derivati esterei dell'acido ferulico	« 66

CAPITOLO III

METODI DI DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE

3.1	Introduzione	« 69
3.2	Inibizione della Perossidazione lipidica	« 69
3.2.1	Saggio con l'acido tiobarbiturico (TBA)	« 70
3.2.2	Inibizione dell'ossidazione delle LDL: TRAA	« 73
3.2.3	Determinazione della totale attività antiossidante con il tiocianato ferrico	« 73
3.2.4	β -Carotene Bleaching Test	« 74
3.2.5	Emolisi indotta da CuOOH	« 74

3.3	Metodi di determinazione dell'attività scavenger	« 75
3.3.1	Test del DPPH	« 75
3.3.2	Chemiluminescenza	« 76
3.3.3	Metodo di decolorazione con ABTS	« 77
3.3.4	ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity	« 78
3.3.5	NBT e azione scavenger	« 81
3.3.6	Test della DCFH/DCF	« 82
3.4	Metodi che valutano il potere riducente	« 83
3.4.1	Test Frap: ferric reducing antioxidant power assay	« 83
3.4.2	Metodo colorimetrico con il $K_3Fe(CN)_6$	« 83
3.5	Capacità chelante gli ioni ferroso	« 84

CAPITOLO IV

PROGETTAZIONE DI MONOMERI E POLIMERI CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

4.1	Introduzione	« 85
4.2	Strategie di sintesi	« 86
4.2.1	Prima strategia di sintesi	« 88
4.2.2	Seconda strategia di sintesi	« 90

CAPITOLO V

NUOVI SISTEMI POLIMERICI CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

5.1	Introduzione	« 92
5.2	Preparazione del polimero funzionale P 2.1	« 92
5.2.1	Sintesi dell'N-amminoetilmetacrilato cloridrato	« 93
5.2.2	Copolimerizzazione di VO e AEM	« 94
5.2.3	Copolimerizzazione di DMAA e AEM	« 95
5.3	Introduzione covalente dell'antiossidante sul polimero P2.1	« 96
5.4	Sintesi del N-2-lipoil-amminoetilmetacrilato	« 97
5.5	Sintesi del N-2-feruloil-amminoetilmetacrilato	« 102
5.6	Copolimerizzazione di L-AEM e F-AEM con DMAA	« 105
5.7	Determinazione del grado di funzionalizzazione dei polimeri PL1 e PF1	« 106
5.8	Determinazione dei fenolici di PF1 e PF2	« 107
5.9	Determinazione dei gruppi tiolici di PL1 e PL2	« 109
5.9.1	Riduzione dei ponti disolfuro con DTT	« 110
5.9.2	Determinazione dei gruppi tiolici con DTNB	« 111
5.10	Valutazione dell'attività antiossidante	« 113
5.10.1	Inibizione della perossidazione lipidica	« 113
5.10.2	Inibizione diretta di specie radicaliche	« 115

CAPITOLO VI
SVILUPPO DI SISTEMI POLIMERICI CAPACI DI REAGIRE
CON GRUPPI FUNZIONALI CHERATINICI

6.1 Introduzione	« 121
6.2 Valutazione dei gruppi funzionali cheratinici	« 124
6.2.1 Gruppi tiolici delle cisteine	« 125
6.2.2 Gruppi amminici delle lisine	« 127
6.3 Valutazione dei monomeri funzionali	« 128

CAPITOLO VII
SISTEMI POLIMERICI CAPACI DI REAGIRE
CON GRUPPI FUNZIONALI CHERATINICI

7.1 Introduzione	« 131
7.2 Sintesi dell’N-acriloilbenzotriazolo	« 131
7.3 Sintesi del polimero BZP1	« 132
7.4 Formazione del legame BZP1-cheratina	« 133
7.5 Analisi SEM	« 133
7.6 Determinazione del grado di funzionalizzazione secondo Gaur-Gupta	« 134
7.7 Sintesi di polimeri idrosolubili BZP2 e BZP3	« 136
7.8 Reazione cheratina – polimeri BZP2 e BZP3	« 137
7.9 Analisi SEM	« 137

CAPITOLO VIII
ALBUMINA SERICA BOVINA NELLA PREPARAZIONE DI
SISTEMI DI RILASCIO MODIFICATO DI FARMACI

8.1 Introduzione	« 139
8.2 Albumina Serica Bovina: Produzione e caratteristiche	« 141
8.3 Struttura della BSA	« 143
8.4 Proprietà chimico-fisiche della BSA	« 145
8.5 Idrogel di albumina	« 146
8.6 Microsfere di albumina mediante denaturazione termica	« 148
8.7 Microsfere di albumina mediante reticolazione chimica	« 149
8.8 Microsfere di albumina mediante coacervazione	« 152
8.9 Spray Drying e Spray Congealing	« 153
8.10 Applicazione delle microsfere nel rilascio del principio attivo	« 154

CAPITOLO IX

SISTEMI MICROPARTICELLARI DI BSA:
PROGETTAZIONE, REALIZZAZIONE E VALUTAZIONE IN VITRO

9.1	Introduzione	« 158
9.2	Funzionalizzazione con anidride metacrilica della BSA	« 159
9.2.1	Purificazione della BSA funzionalizzata	« 162
9.2.2	Caratterizzazione dei campioni di BSA funzionalizzata	« 163
9.3	Preparazione di sistemi microparticellari	« 164
9.4	Caratterizzazione delle microsfere BSA _f -DMAA	« 170
9.4.1	Determinazione del grado di rigonfiamento	« 170
9.4.2	Spettri FT-IR	« 171
9.4.3	Analisi dimensionale	« 172
9.4.4	Analisi morfologica	« 173
9.5	Inserimento di farmaci nelle microsfere BSA _f -DMAA	« 176
9.5.1	Inserimento di farmaco per impregnazione	« 176
9.5.2	Caratteristiche dei farmaci inseriti nelle matrici	« 177
9.6	Valutazione del rilascio mediante HPLC	« 178
9.6.1	Matrici impregnate con diflunisal	« 179
9.6.2	Matrici impregnate con β -propranololo	« 183
9.6.3	Matrici impregnate con 5-fluorouracile	« 185
9.7	Preparazione di sistemi microparticellari BSA _f -NaM	« 185
9.8	Caratterizzazione delle microsfere BSA _f -NaM	« 187
9.9	Inserimento di farmaco per impregnazione e valutazione del rilascio	« 190
9.9.1	Rilascio di diflunisal	« 192
9.9.2	Rilascio di β -propranololo	« 195
	CONCLUSIONI	« 198
	PARTE SPERIMENTALE	« 202

INTRODUZIONE

L'attrazione esercitata dalle molecole polimeriche sulla ricerca scientifica è dovuta in particolar modo alla scoperta di una loro migliore applicabilità, per aspetti diversi, rispetto alle convenzionali molecole di basso peso molecolare, sia nel settore cosmetico che in quello farmaceutico. 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. La protezione delle varie formulazioni da fenomeni di degradazione richiede la necessaria presenza di composti antiossidanti. Tuttavia molti eventi negativi sull'organismo si verificano proprio con la maggior parte delle molecole antiossidanti convenzionali; è per questa ragione che il loro uso in formulazioni cosmetiche, farmaceutiche o in ambito alimentare è regolato da varie leggi (legge n°283 dell'aprile del 1962, legge n° 713 dell'ottobre del 1986 e successive modifiche), che ne vietano l'impiego o ne restringono l'uso a limiti massimi di quantità applicabili. L'impiego di polimeri "attivi" in ambito di protezione delle formulazioni può evitare le problematiche a carico degli antiossidanti convenzionali.

Lo scopo del presente lavoro è l'inserimento in strutture polimeriche sintetiche biocompatibili di noti antiossidanti naturali, per i quali è stato testato il mantenimento dell'attività dopo modificazioni strutturali. Fra i numerosi antiossidanti, l'acido lipoico e l'acido ferulico, che hanno buone capacità di inibire l'ossidazione di substrati biologici mediante meccanismi diversi, possono subire queste modificazioni. La sintesi di polimeri contenenti residui lipoilici e

feruloilici avverrà secondo due strategie per l'ottenimento di materiali con diversi peso molecolare e diverse proprietà chimico-fisiche. Dei materiali progettati e sintetizzati sarà valutato il potere antiossidante mediante vari metodi di analisi scientificamente proposti; in particolare sarà analizzata l'efficienza di bloccare direttamente specie radicaliche, e di inibire la perossidazione lipidica.

Sul settore cosmetico gravano altri pesanti accuse di tossicità; in formulazioni cosmetiche di alto consumo e riconosciute relativamente sicure, come creme per la protezione solare o tinture permanenti per capelli, si celano infatti alcune sostanze riscoperte oggi tossiche. Studi scientifici dimostrano che benzofenoni, presenti nelle prime, e, parafenilendiammine presenti nelle seconde, sono promotori di molteplici patologie umane, compresa la genesi di neoplasie. Un'altra parte del lavoro di ricerca affronterà, in collaborazione con gli autori, la valutazione dell'efficacia e il miglioramento di alcuni polimeri coperti da brevetto; tali polimeri capaci di legare molecole coloranti e formare legami stabili con la cheratina dei capelli sono stati progettati nell'ottica di una futura sostituzione dei coloranti permanenti tossici attualmente impiegati.

Anche nel settore farmaceutico sono molti i polimeri d'interesse, studiati per lo sviluppo di nuove formulazioni. Negli ultimi anni accanto alla costante ricerca di nuovi principi attivi è cresciuto l'interesse per la realizzazione di sistemi, che rendano più efficace l'azione terapeutica dei farmaci. L'organizzazione di polimeri in strutture matriciali consente di ottenere forme per il rilascio controllato di farmaci, con potenziamento dell'efficacia farmacologica e diminuzione degli effetti tossici dei principi attivi veicolati. Un polimero naturale con grande potenziale applicativo è l'Albumina Serica Bovina (BSA). La BSA, come ultimo progetto di questa ricerca, sarà modificata per l'ottenimento di sistemi idrogel microsferici pH-sensibili. La realizzazione di tali sistemi avverrà mediante preventiva funzionalizzazione della proteina con unità polimerizzabili e successiva copolimerizzazione radicalica con comonomeri acrilici e metacrilici. Per la fase di polimerizzazione si utilizzerà la tecnica di polimerizzazione in sospensione inversa, tecnica utile per la formazione di micro e nanoparticelle di forma sferica in presenza di opportuni sistemi iniziatore ed emulsionante e un giusto rapporto fra fase dispersa e disperdente. La capacità dei sistemi prodotti di

rilasciare farmaci modello di diversa categoria terapeutica e proprietà chimico-fisiche in dipendenza del pH sarà valutata *in vitro* secondo metodi previsti dalla XXII USP.

CAPITOLO I

OSSIDAZIONE DEI SISTEMI BIOLOGICI ED AZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI

1.1 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.

1.2 Stress ossidativo indotto da radicali liberi

I radicali liberi sono atomi o molecole molto instabili che presentano un elettrone spaiato. Possedendo un elettrone in meno, ricercano un nuovo stato di equilibrio appropriandosi dell'elettrone delle altre molecole con le quali vengono a contatto, molecole che divengono instabili e che a loro volta ricercano un elettrone e così via, innescando un meccanismo di reazione a catena. La velocità e la selettività di queste reazioni dipendono dalla concentrazione del radicale e dalla

sua stabilità. La vita media di un radicale biologicamente attivo è dell'ordine dei microsecondi. In questo arco di tempo, i radicali liberi hanno il potere di reagire con le molecole biologiche (proteine, lipidi, DNA) e con le membrane cellulari, danneggiandole^[1]. Il DNA è particolarmente sensibile all'ossidazione da parte dei radicali liberi e, pertanto, è stato ipotizzato che questi atomi o molecole possano contribuire all'insorgere di mutazioni genetiche che precedono lo sviluppo di patologie quali il cancro o alcune malattie degenerative.

Oltre alle normali reazioni metaboliche che portano alla formazione di radicali nelle cellule, contribuiscono alla loro formazione:

- alcune disfunzioni e stati patologici come le malattie cardiovascolari, l'artrite reumatoide, gli stati infiammatori in genere, i traumi al sistema nervoso;
- l'ischemia dei tessuti e conseguente riduzione dell'apporto di sangue;
- le diete troppo ricche di proteine e di grassi animali saturi;
- gli alimenti non tollerati;
- la presenza di un eccesso di ferro che, nella prima fase della trasformazione, fa liberare dal perossido di idrogeno il radicale ossidrile, che è in grado di attivare reazioni chimiche ulteriormente dannose;
- l'azione dei gas inquinanti e delle sostanze tossiche in genere (monossidi di carbonio e piombo prodotti dalla combustione dei motori; cadmio, piombo e mercurio prodotti dall'attività industriale; idrocarburi derivati dalle lavorazioni chimiche, ecc.);
- il fumo di sigaretta, che è una vera e propria miniera di sostanze chimiche;
- l'eccesso di alcool;
- le radiazioni ionizzanti e quelle solari (ozono in eccesso e raggi UVA e UVB).
Le radiazioni solari inducono sulla pelle processi di fotoossidazione che degradano gli acidi grassi poliinsaturi delle membrane cellulari e conseguente formazione di radicali liberi;
- i farmaci;
- l'attività fisica intensa, sia di resistenza organica che di forza muscolare, causa un incremento notevole delle reazioni che utilizzano l'ossigeno (aumento della

¹ J. I.G. Cadogan, *Principles of Free Radical Chemistry*; London: The Chemical Society (1973).

respirazione polmonare e dell'attività dei mitocondri delle cellule muscolari, ecc.) e conseguente surplus di formazione di perossido di idrogeno. Anche le reazioni biochimiche legate all'accumulo e rimozione dell'acido lattico dai muscoli affaticati, contribuiscono ad innalzare la soglia dei radicali liberi. Secondo alcuni studiosi, la lisi della membrana cellulare da parte dei radicali liberi (perossidi), è una delle cause del dolore muscolare. Lo stesso avviene per i globuli rossi, contribuendo a determinare o accentuare l'anemia negli atleti. L'atleta allenato è comunque in grado di fronteggiare la presenza di radicali liberi in maniera nettamente più efficace del sedentario o di chi pratica attività fisica saltuariamente^[1].

Tra i radicali più pericolosi ci sono i composti dell'ossigeno: *anione superossido, acqua ossigenata e idrossilico*. Il più diffuso è l'anione superossido che è estremamente pericoloso perché distrugge l'ossido nitrico determinando ipertensione.

In condizioni fisiologiche vi è uno stato di equilibrio tra la produzione endogena di radicali liberi e la loro neutralizzazione da parte dei meccanismi anti-ossidanti di difesa. In minime quantità si dimostrano un importante aiuto per il sistema immunitario nell'eliminazione di germi e nella difesa dai batteri; se in eccesso possono ossidare le biomolecole e causare, così, lesioni e morte delle cellule. L'organismo umano ha, tuttavia, sviluppato numerosi meccanismi per proteggersi dagli effetti dannosi dei radicali liberi, tra cui enzimi e proteine che decompongono o sequestrano i perossidi.

Le reazioni dei radicali liberi possono essere classificate in intramolecolari quando il radicale va incontro a decomposizione o riarrangiamento prima di reagire con altre molecole; interazioni radicale-molecola quando il radicale interagisce con un sistema insaturo (olefinico o aromatico), e le interazioni radicale-radicalo, quando il radicale è coinvolto in reazioni di dimerizzazione o di disproporzione^[3].

Gli eventi biologici innescati possono essere schematizzati come:

1. Perossidazione lipidica delle membrane;
2. ossidazione e deplezione del glutatione;

¹ <http://www.sporttraining.it>

³ M.Perkins, *Radical Chemistry*, London: Ellis Horwood, (1994).

3. ossidazione dei tioli proteici;
4. alterazione dell'omeostasi ionica (pompe di membrana);
5. danno al DNA;
6. alterazioni citoscheletriche;
7. alterazioni mitocondriali e deplezione di ATP;
8. comparsa di siti di fragilità sulla membrana;
9. morte cellulare^[4].

1.3 Radicali liberi di interesse biologico

I radicali liberi di interesse biologico sono prevalentemente derivati reattivi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) che si formano regolarmente come risultato delle normali funzioni degli organi, ma che, se prodotti in eccesso o in ambienti inappropriati, possono diventare nocivi. ROS e RNS sono componenti delle cascate trasduzionali dei segnali cellulari coinvolti in funzioni quali la proliferazione, l'infiammazione e l'adesione^[5]. Radicali liberi sono anche normalmente prodotti da leucociti e macrofagi che li utilizzano per distruggere gli organismi patogeni durante la fagocitosi.

In qualunque sistema biologico deve essere mantenuto un equilibrio tra la formazione di ROS e RNS e la loro rimozione. Lo spostamento di questo equilibrio verso lo stress ossidativo è causa di numerose manifestazioni patologiche^[6]. Uno stress ossidativo può determinare l'ossidazione di lipidi e proteine, con variazione nella loro struttura e nelle loro funzioni, e il danneggiamento del DNA (rottura della doppia elica, modificazione delle basi, formazione di legami crociati tra DNA e proteine) con conseguente sviluppo di tumori. La lista dei disordini e delle patologie in cui sono coinvolti i radicali liberi comprende, oltre al cancro, patologie del cuore e del sistema cardiocircolatorio^[7] (aterosclerosi); patologie cerebrali^[8] (morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer); patologie oculari (retinopatie, cataratte); patologie renali (nefrotossicità da

⁴ C.L. Galli, E.Corsini, M.Marinovich. *Tossicologia* (2004); **3**:89-90

⁵ O.I.Aruoma, *Free Radical Biology and Medicine* (1996); **20**: 675-705

⁶ B.Halliwell, J.M.Gutteridge, *Methods Enzymol* (1990); **186**: 1-85

⁷ U.P. Streinbrecher, *Biochimica and Biophysica Acta* (1999); 1436: 279-298

⁸ B.Halliwell, *J.Neurochem* (1992); **59**: 1609-1623

aminoglicosidi o autoimmune); patologie del tratto gastrointestinale (pancreatite); problemi infiammatori o autoimmuni (artrite reumatoide); deficienza di globuli rossi (favismo, malaria, anemie).

Le tabelle 1.1 e 1.2 riportano ROS e RNS più comuni con le loro caratteristiche principali.

Specie	Formula	Caratteristiche
Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂	Reattività selettiva
Acido ipocloroso	HOCl	Si forma nei neutrofili presenti nel sito di un'inflammazione
Ozono	O ₃	Determina riduzione degli antiossidanti plasmatici Vitamina D, Vitamina E ed acido urico
Ossigeno singoletto	¹ O ₂	Potente agente ossidante

Tabella 1.1 - ROS e RNS di natura neutra

Specie	Formula	Caratteristiche
Superoossido	⁻ O ₂ [•]	Reattività selettiva
Idrossile	[•] OH	Reattività estremamente elevata
Perossile, Alcossile	ROO [•] RO [•]	Intermedi durante lo stadio di propagazione della perossidazione lipidica
Monossido d'azoto	NO [•]	Viene formato a partire dalla L-arginina ad opera della nitrossido sintasi (NOS)
Diossido d' azoto	NO ₂ [•]	Si forma quando l'NO [•] reagisce con l'O ₂ . Si trova nell'aria inquinata e nel fumo di sigaretta
Perossinitrito	ONOO ⁻	Ossida i gruppi SH delle proteine

Tabella 1.2 - ROS e RNS di natura radicalica

1.4 Specie reattive dell'ossigeno

L'ossigeno ha la proprietà di essere sia una fonte di radicali liberi che un loro bloccante. In condizioni di pressione parziale entro valori fisiologici, l'ossigeno neutralizza più radicali liberi di quanti ne produce. In condizioni di pressione parziale ridotta, quale quella che si ha in un tessuto ischemico, prevale invece la generazione di radicali liberi^[9].

1.4.1 Radicale superossido (O_2^-)

Il radicale superossido viene prodotto da una serie di sistemi enzimatici, da reazioni di autoossidazione e da trasferimenti non enzimatici di elettroni. Il superossido formato in vivo è largamente convertito in perossido di idrogeno mediante dismutazione spontanea o catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD)^[10] (equazione 1.1).



La reattività di questo radicale è limitata^[11], sebbene possa danneggiare direttamente alcune molecole biologiche. In soluzione acquosa può ossidare l'acido ascorbico e ridurre alcuni complessi del ferro quali il citocromo *c* e il complesso Fe^{3+} -EDTA.

La tossicità del superossido all'interno degli organismi viventi è quasi totalmente dovuta alla sua conversione nel radicale idrossilico e in complessi metallici reattivi, processi noti come reazione di Haber-Weiss e di Fenton.

1.4.2 Perossido di idrogeno (H_2O_2)

Il perossido di idrogeno si forma in vivo dalla dismutazione del superossido. A basse concentrazioni è poco reattivo. Tuttavia elevati livelli possono causare il

⁹ E. M Cranton, J. P Frackelton, *Journal of Advancement in Medicine* 1998; **11** : 277-310.

¹⁰ I. Fridovich, *Journal of Biological Chemistry* 1989; **264** : 7761-7764.

¹¹ B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loliger, *Food and Chemical Toxicology* 1995; **33** (7) : 601-617.

danneggiamento di diversi sistemi cellulari di produzione dell'energia, poiché, al contrario del superossido, l' H_2O_2 è capace di legarsi alle membrane biologiche^[12].

La presenza di metalli di transizione in forma ionica, in particolare gli ioni del ferro, ne aumenta notevolmente la tossicità, perchè questi permettono la trasformazione del perossido di idrogeno nel radicale ossidrilico attraverso la reazione di Fenton.

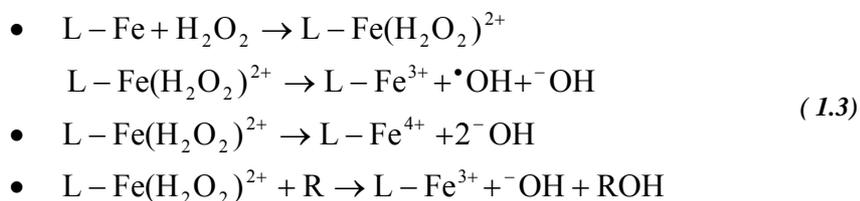
In questa reazione il Fe^{2+} si ossida a Fe^{3+} che può essere nuovamente ridotto generando un ciclo catalitico^[13].

La reazione di Fenton è stata studiata in un grande numero di sistemi chimici e biochimici utilizzando una grande varietà di chelanti del ferro (L) e di sistemi di rilevamento. L'effetto finale comunque varia a seconda del tipo di chelante utilizzato.

Il meccanismo di reazione prevede il trasferimento di un elettrone dal perossido di idrogeno al ferro con produzione del radicale idrossile ($\cdot\text{OH}$) (equazione 1.2).



Tuttavia questo meccanismo è termodinamicamente sfavorito. Le evidenze sperimentali suggeriscono un meccanismo in cui si forma un intermedio che può essere considerato come un complesso tra il perossido e lo ione ferroso^[14]. Questo intermedio può generare il radicale ossidrilico e le specie ferrili $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O}_2)^{2+}$ e Fe^{4+} , o ossidare direttamente un substrato R (equazione 1.3)



¹² B.Halliwell, J. M. C.Gutteridge, *Free Radical in Biology and Medicine*; 2nd ed.

¹³ C. Winterbourn, *Toxicology Letters* 1995; **82/83** : 969-974.

¹⁴ S.Goldstein, D.Meyerstein, G.Czapski, *Free Radical Biology and Medicine* 1993; **15** : 435-445.

1.4.3 Radicale idrossilico (OH[•])

Il radicale ossidrilico è estremamente reattivo in quanto interagisce con tutte le molecole presenti nell'organismo con cinetiche di reazione elevate.

La sua formazione avviene in quattro differenti modi:

a) Reazione di Haber-Weiss.

Tale reazione coinvolge $\text{O}_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 in presenza di quantità catalitiche di metalli di transizione, come rame e ferro^[15] (equazione 1.4).



b) Scissione dell'acqua.

L'acqua in seguito all'azione di radiazioni ionizzanti, che si utilizzano ad esempio durante la sterilizzazione dei cibi per prevenire la crescita batterica^[16], può generare radicali idrossilici.

c) Reazione dell' $\text{O}_2^{\bullet -}$ con il nitrossido.

La reazione tra il nitrossido e il radicale superossido procede a velocità paragonabile a quella del superossido con la SOD. Il prodotto, il perossinitrito, ai valori fisiologici di pH si protona e si decompone in un vasto numero di prodotti nocivi come lo ione NO_2^+ , il disossido di azoto NO_2^{\bullet} e l' OH^{\bullet} ^[17].

d) Reazione dell' $\text{O}_2^{\bullet -}$ con l'acido ipocloroso.



1.4.4 Radicali perossilici (ROO[•])

La formazione di radicali perossilici (ROO[•]) rappresenta lo stadio di propagazione della perossidazione lipidica^[18], ma può avvenire anche in sistemi

¹⁵ B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *FEBS Letters*; 1992; **307** : 108-112.

¹⁶ P. S. Elias, *Nutritional Toxicology*; New York: Raven Press 1994; 149-180.

¹⁷ R. Huie, S. Padmaja, *Free Radical Research Communications* 1993; **18** : 195-200.

non lipidici quali ad esempio le proteine^[19]. La decomposizione di perossidi ad opera del calore o di metalli di transizione può portare alla formazione sia di radicali perossilici che alcossilici.

La reazione dell'•OH con i tioli nei cibi o in vivo può produrre radicali tiolici RS• che possono successivamente combinarsi con l'ossigeno per dare radicali ossosulfurici molto reattivi (RSO• e RSS•)^[20].

Una particolare categoria di questa classe di radicali è quella dei radicali perossilici alogenati che sono più reattivi di quelli non alogenati e che si formano in particolari condizioni. Ad esempio, il triclororometilperossile (CCl₃OO•) si forma in seguito all'esposizione di una miscela di tetracloruro di carbonio (CCl₄) e propan-2-olo a radiazioni ionizzanti^[21].

1.4.5 Acido ipocloroso (HOCl)

I neutrofili attivati contengono e secernono l'enzima mieloperossidasi, che utilizza l'H₂O₂ per ossidare gli ioni cloruro formando acido ipocloroso (HOCl), un potente antiossidante che a sua volta reagisce con l'O₂ generando radicali idrossilici.

Gli eosinofili umani contengono un enzima simile che preferisce gli ioni bromuro come substrato e presumibilmente produce acido ipobromoso (HOBr).

Questi acidi contribuiscono ai meccanismi con cui i neutrofili e gli eosinofili attaccano i batteri ingeriti, tuttavia la loro produzione all'esterno dei fagociti può provocare danni ai tessuti^[22].

1.4.6 Ossigeno Singoletto (¹O₂)

L'ossigeno singoletto rappresenta uno stato dell'ossigeno energeticamente eccitato in cui lo spin di uno degli elettroni dei due orbitali esterni viene invertito.

¹⁸ H.Esterbauer, *Oxidative stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfuncions*; London: Portland Press; 1995; 55-79.

¹⁹ M. J.Davies, B. C.Gilbert, R. M.Haywood, *Free Radical Research Communications* 1993; **18** : 353-367.

²⁰ O. I. Aruoma, B.Halliwell, J.Butler, B. M.Hoey, *Biochemical Pharmacology* 1989; **38** : 4353-4357.

²¹ Z. B.Alfassi, R. E.Huie, P Neta, *Journal of Physical Chemistry* 1993; **97** : 6835-6838.

²² C. L.Ramos, G. M.Pou, *Biochemical Pharmacology*; 1995; **49** : 1079-1084.

L' $^1\text{O}_2$ non ha elettroni spaiati e non è perciò classificato come radicale, ma è un potente agente ossidante in grado di combinarsi direttamente con molte molecole biologiche.

L' $^1\text{O}_2$ si produce dal radicale superossido quando questo raggiunge livelli più alti di quelli che possono essere decomposti ad opera della SOD. La produzione di ossigeno singoletto avviene anche durante la perossidazione lipidica probabilmente a causa della reazione tra due radicali perossilici^[23].

1.5 Specie reattive dell'azoto ^[24-25]

Le specie reattive dell'azoto di interesse biologico derivano fondamentalmente dal nitrossido (NO). Il NO è esso stesso un radicale che, se presente in normali quantità, svolge importanti funzioni biologiche, se presente in eccesso, diventa invece dannoso sia per azione diretta che indiretta poiché si converte in altre specie radicaliche come i perossinitriti o gli alchilperossinitrati.

1.5.1 Radicale nitrossido (NO)

L'ossido di azoto (NO), comunemente chiamato ossido nitrico o nitrossido, è una specie chimica reattiva di natura radicalica. È uno dei più potenti mediatori biochimici, importante per la regolazione di numerose funzioni biologiche. L'NO è una sostanza ubiquitaria prodotta a partire dall'amminoacido L-arginina in una reazione multi-step catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) (figura 1.1). La NOS esiste in varie isoforme, alcune costitutive presenti nelle cellule endoteliali, piastrine e sistema nervoso, ed altre inducibili presenti nei macrofagi, leucociti polimorfonucleati, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce ed epatociti.

²³ D. J. Kelman, J. A. De Gray, R. P. Mason, *Journal of Biological Chemistry* 1994; **269** : 7458-7463

²⁴ <http://www.anagen.net>

²⁵ <http://www.gigicabrini.it>

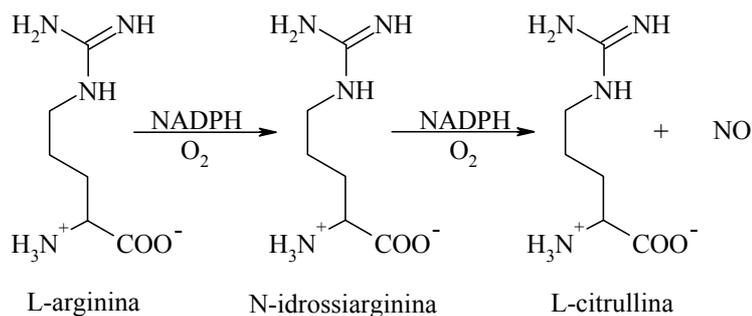


Figura 1.1- Sintesi schematica dell'ossido nitrico a partire dalla L-arginina

Nei sistemi biologici, l'NO agisce come un importante messaggero intra- ed inter-cellulare regolando numerosissime funzioni; una delle più importanti è a carico dell'endotelio vascolare: in seguito a stimolazione meccanica o chimica, le cellule endoteliali producono l'NO che, in parte, diffonde nel compartimento ematico, riducendo l'aggregabilità delle piastrine e l'adesività dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni, e, in parte, raggiunge la sottostante muscolatura liscia vascolare inducendone il rilasciamento. Oltre all'effetto primario sull'endotelio, all'NO è riconosciuto un ruolo determinante di mediatore biochimico in numerose funzioni, a livello cerebrale (es. controllo dell'apprendimento e della memoria), gastrointestinale (modulazione delle secrezioni e della motilità), respiratorio (modulazione del tono della muscolatura liscia bronchiale), renale (autoregolazione del flusso ematico). All'NO, in quanto radicale, è attribuita un'importante funzione di difesa nei confronti delle infezioni batteriche e, probabilmente, nel controllo della crescita dei tumori. Tuttavia condizioni di aumentato stress ossidativo – es. eccessiva produzione di anione superossido – comportano la conversione dell'NO in perossinitrito, una forma radicalica alla quale è legata la tossicità del mediatore primario. Dopo che ha agito, l'NO viene trasformato in una serie di derivati, quali i nitriti ed i nitrati, che si accumulano, in funzione della quantità del mediatore primario prodotto, nel sangue ed in altri fluidi extracellulari per poi essere definitivamente allontanati dall'organismo attraverso le urine.

1.5.2 Perossinitrito (ONOO⁻)

È prodotto dalla reazione tra NO[•] e O₂^{-•} e può causare un danno biologico diretto ossidando i gruppi -SH di proteine, enzimi, ecc.. Inoltre a pH fisiologico può decomporsi producendo numerosi prodotti dannosi tra cui il radicale del biossido di azoto (NO₂[•]), potente iniziatore di perossidazione lipidica nelle membrane biologiche, il radicale idrossile e lo ione nitronio (NO₂⁺), un agente attivo nella nitratura di anelli aromatici. Il perossinitrito, formato a livello dell'endotelio vascolare, può aggravare l'arteriosclerosi esaurendo gli antiossidanti e causando la perossidazione delle LDL. Inoltre la nitratura di aminoacidi aromatici ad opera del perossinitrito può interferire con la trasduzione del segnale cellulare. Anche il bilancio tra RNS e ROS è importante per determinare il danno tissutale. Il rapporto tra NO_• e ROS è quindi molto importante: un rapporto NO/O₂^{-•} di 1:1 genera ONOO⁻ e induce la perossidazione lipidica, mentre un eccesso di NO_• può inibirla funzionando da "scavenger" dei radicali perossidici.

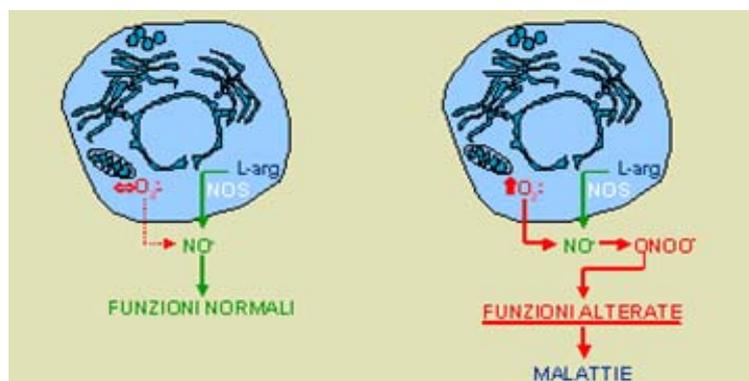


Figura 1.2 – Sintesi di perossinitrito da NO

1.5.3 Radicali alchilperossinitrati (ROONO)

L'ossido nitrico oltre a reagire molto rapidamente con il radicale superossido per generare perossinitrito, reagisce anche con perossiradicali lipofili per generare alchilperossinitrati (ROONO). Tali prodotti appaiono molto più stabili del perossinitrito. Se gli alchilperossidi possono essere metabolizzati

senza rilascio di radicali liberi tossici allora la loro formazione è potenzialmente benefica perché fa sì che il radicale NO. inibisca la perossidazione lipidica.

1.6 Antiossidanti

Gli antiossidanti sono una classe eterogenea di composti accomunati dalla peculiarità di rallentare o bloccare, secondo differenti meccanismi, e contrastare gli effetti dannosi dei processi ossidativi^[26].

L'attenzione alle molecole antiossidanti è in forte aumento, data la loro utilità nei settori più disparati. Sono ampiamente utilizzati nell'industria dove la loro funzione è quella di preservare i polimeri dalla degradazione ossidativa, la gomma e la plastica dalla perdita di resistenza, la benzina dall'auto-ossidazione, i pigmenti naturali e sintetici dalla perdita di colore. Oltre ad essere utilizzati come additivi per cosmetici, bevande e cibi con elevato contenuto di grassi, negli ultimi anni si è largamente sviluppato l'utilizzo di tali sostanze in campo medico e farmaceutico.

Per bilanciare la normale formazione di radicali, il nostro organismo predispone di un sistema di difesa contro lo stress ossidativo mediato dalla produzione di antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Quando si verifica una superproduzione di specie ossidanti diventa di fondamentale importanza un apporto esterno di antiossidanti. Difendono dallo stress ossidativo mediante processi enzimatici e non enzimatici.

La vitamina C e E, ed i precursori come i carotenoidi rappresentano noti antiossidanti non-enzimatici, che riducono la velocità d'iniziazione e prevengono la propagazione di radicali liberi. Negli organismi viventi esiste una grande varietà di antiossidanti la cui importanza dipende dal tipo di ROS generato, dal luogo, dal modo in cui è prodotto e dall'effetto misurato; ad esempio, se si testa la capacità di inibire la perossidazione lipidica indotta dagli ioni ferro nel plasma umano, gli agenti protettivi più importanti sono la ceruloplasmina e la transferrina^[27]; quando il plasma umano, invece, è esposto al diossido di azoto, il

²⁶ D.Health, K.Scheibmeir, Christensen, *Intensive and Critical Care Nursing* (2005); **21**: 24-28

²⁷ J. M. C.Gutteridge, G. J.Quinlan, *Biochimica et Biophysica Acta* (1992); **1159** : 248-254.

ruolo principale è svolto dall'acido urico^[28]. Analogamente, se lo stress ossidativo è prodotto dalla stessa causa, si possono ottenere risultati differenti in base all'effetto misurato: ad esempio l'acido ascorbico blocca la perossidazione lipidica dovuta al fumo di sigaretta, ma non ha effetto sul danno che il fumo provoca alle proteine plasmatiche^[29].

È possibile che un antiossidante abbia effetti protettivi in un sistema e dannosi in un altro: ad esempio, l'idrossianisolo metilato è un potente inibitore della perossidazione lipidica che, se assunto ad elevate dosi con l'alimentazione, può determinare cancro allo stomaco per danni diretti al DNA^[30].

1.6.1 La classificazione degli antiossidanti

Gli antiossidanti a fine esemplificativo si possono distinguere in tre gruppi, poiché non esiste una vera classificazione:

1. Enzimi cellulari: Gli antiossidanti enzimatici comprendono la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPX) e la catalasi (CAT). Più enzimi contengono oligoelementi, come selenio, zinco, manganese e rame.

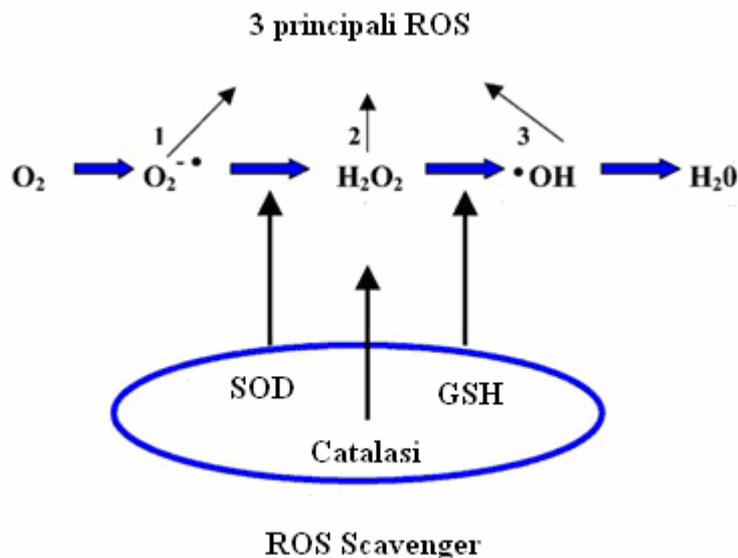


Figura 1.3

²⁸ B.Halliwell, M. L.Hu, S. Louise, T. R.Duvall, et al. *FEBS Letters* (1992); **313** : 62-66.

²⁹ B.Frei, T. M.Forte, B. N.Ames, C. E.Cross, *Biochemical Journal* (1991); **247** : 133-138.

³⁰ P.A. E.L. Schildermann, ten. F. J.Vaarwerk, *Food and Chemical Toxicology* (1995); **33** : 99-109.

2. Chelanti ioni metallici: I chelanti comprendono la transferrina, l'albumina, la ceruloplasmina e le metallotioneine. Sequestrando i metalli, impediscono l'interazione con l' H_2O_2 , una reazione che porta alla formazione di $\cdot\text{OH}$ (reazione di Fenton) e $\text{O}_2^{\cdot-}$.
3. Antiossidanti a basso peso molecolare: comprendono sia molecole di membrana, liposolubili, quali la Vitamina A e la Vitamina E, il β -carotene; sia molecole idrofile come la Vitamina C, il coenzima Q10, la bilirubina, i bioflavonoidi. Molte di queste molecole sono antiossidanti "chain-breaking", cioè bloccano la cascata di reazioni radicaliche a catena.
Il meccanismo è spesso mediato dalla donazione di un idrogeno dagli antiossidanti alle molecole radicaliche^[31].

1.6.2 Antiossidanti enzimatici

Uno dei più importanti sistemi di difesa intracellulari è il ciclo redox del glutatione^[32] (figura 1.4).

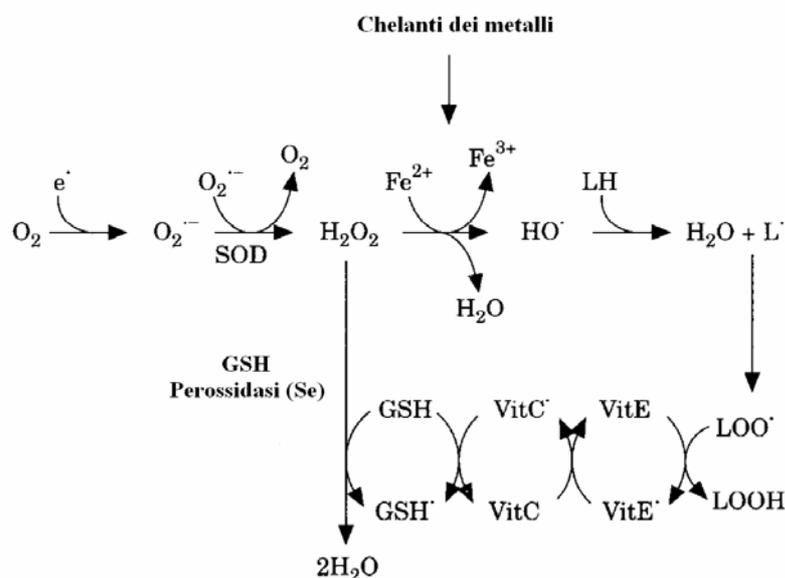


Figura 1.4 – Ciclo redox del glutatione

³¹ N.I.Weijl, F.J. Cleton and S.Osanto. *Cancer treatment Review*.(1997) **23**: 209-240

³² M.Tedeschi,S. Bohm, F.Di Re et al. *Cancer Treat. Rev.* (1990); **17**: 203-208

Il glutatione è un tripeptide formato da glutammato, cisteina e glicina, che protegge le cellule da sostanze tossiche elettrofile (molecole cariche positivamente) attraverso la formazione di tioeteri o attraverso il ciclo ossido-riduttivo in cui funziona da scavenger dei radicali liberi e successivamente ritorna alla sua forma attiva ridotta. I fosfolipidi di membrana sono degradati da parte dei radicali idrossilici mediante il processo noto come perossidazione lipidica. I perossidi possono essere successivamente ridotti dalla vitamina E, reazione in cui si forma il radicale della vitamina E, a sua volta ridotto dall'acido ascorbico, con formazione del radicale della vitamina C. A catena, la vitamina C è ridotta dal glutatione con formazione del glutatione ossidato, ridotto in fine dalla glutatione riduttasi.

La Superossido Dismutasi (SOD) è un metallo enzima inducibile. Esistono tre classi di SOD, ognuna caratterizzata dal sito attivo e dal metallo che partecipa al sito attivo: CuZn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD. Questi enzimi catalizzano la reazione fra due molecole di anione superossido per formare perossido di idrogeno e ossigeno molecolare (equazione 1.1). La catalasi ha l'importante ruolo di convertire velocemente una specie reattiva come H_2O_2 in sostanze meno tossiche come l' H_2O e l' O_2 (equazione 1.6). A conferma che tale enzima possa proteggere da patologie cardiovascolari e dell'invecchiamento è stata l'osservazione della longevità e della presenza di un cuore più sano nei topi in grado di produrre una maggiore quantità di catalasi mitocondriale, grazie alle tecniche di ingegneria genetica.



1.6.3 Antiossidanti chelanti metalli

A catalizzare la produzione di radicali liberi contribuiscono il rame, il ferro e altri metalli di transizione in forma ionica la cui velocità di reazione dipende dalla presenza in soluzione di agenti capaci di complessare il metallo. Se questi non subiscono processi ossidoriduttivi, la concentrazione del metallo cataliticamente

attivo si riduce e viene inibita la formazione dei radicali liberi: è il caso dei complessi Cu(I)-EDTA e Fe(III)-acido lipoico o acido ferulico^[33].

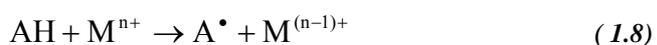
Una seconda possibilità prevede la formazione di un complesso metallo-antiossidante, che non inibisce l'ossidazione del metallo. I radicali liberi prodotti, tuttavia, interagiscono esclusivamente con il complessante, come il caso della complessazione del rame da parte dell'albumina plasmatica che genera radicali idrossilici. Questi tuttavia danneggiano esclusivamente l'albumina preservando le lipoproteine plasmatiche e le membrane dei globuli rossi e delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni^[34].

La loro efficienza antiossidante, come avviene in generale per tutti gli agenti chelanti, dipende dalla stabilità del complesso che essi formano con il metallo.

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 metallo-chelante.

1.6.4 Agenti riducenti

Molti degli antiossidanti di origine naturale (AH), ad esempio le vitamine C ed E, sono agenti riducenti^[35]. Questi possono interagire con radicali liberi (X^\bullet), formando altre specie radicaliche stabili (equazione 1.7), o con metalli di transizione, provocandone la riduzione (equazione 1.8.).



In condizioni di stress ossidativo elevato, quando gli acidi grassi sono esposti ad un flusso elevato di radicali liberi, il radicale risultante dall'equazione 1.2 può reagire con un radicale libero lipidico bloccandolo (equazione 1.9).

³³ Z. D.Liu, C.Hider, *Coordination Chemistry reviews* (2002); **232** : 151-171.

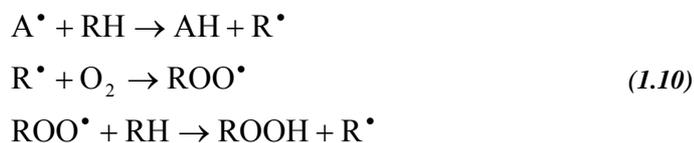
³⁴ B.Halliwell, *Biochemical Pharmacology* (1985); **37** : 569-571

³⁵ A.Kontush, S.Meyer, B.Finckh, A.Kohlschutter, U.Beisiegel, *Journal of Biological Chemistry* (1996); **271** : 11106-11112.



In queste condizioni ogni molecola AH può bloccare due radicali liberi: uno è bloccato mediante la riduzione da parte dell'antiossidante, l'altro dalla reazione rappresentata dall'equazione 1.3. Per questo motivo, questi antiossidanti sono in grado di inibire la perossidazione lipidica indotta sia da metalli di transizione sia da radicali liberi.

Contrariamente, in condizioni di stress ossidativo moderato, il radicale libero A \cdot può indurre una reazione a catena (equazione 1.10) fungendo da pro-ossidante.



Un esempio di tale comportamento può essere ritrovato nella vitamina E (α -tocoferolo), il cui effetto pro-ossidante è dovuto alla formazione del radicale tocoferile in seguito alla reazione del tocoferolo con un metallo di transizione^[36].

1.7 Antiossidanti naturali

Oltre agli antiossidanti endogeni, sono presenti anche molecole esogene che presentano una funzione ugualmente importante nel momento in cui vengono assunte con la dieta o mediante terapie farmacologiche.

C'è un notevole interesse nell'industrie e nella ricerca scientifica per le spezie e le erbe aromatiche perché mostrano una forte attività antiossidante e proprietà antimicrobiche. Queste proprietà sono dovute a molte sostanze, quali vitamine, terpenoidi, flavonoidi, fitoestrogeni e minerali, che rendono le spezie e le erbe aromatiche fondamentali anche nella conservazione dei cibi. Esempi di importanti antiossidanti sono il pimentolo presente in tutte le spezie; gallati, biflorini ed i loro isomeri, eugenolo e acetato di eugenolo nei chiodi di garofalo; carnosolo, acido carnosico, rosmarolo, rosmarichinone, e vari esteri metilici ed

³⁶ R.Buettner, *Arch. Biochem. Biophys.* (1993); **300** : 535-543.

etilici di tali sostanze nel rosmarino; flavonoidi, acido ferulico nel pepe nero; derivati di acidi fenolici, flavonoidi, tocoferoli nell'origano. Secondo il database fitochimico (USDA,2003), le piante con più alto contenuto di antiossidanti sono la noce, il cocco e la guaiava.

Negli ultimi anni, è aumentata l'attenzione sul ruolo della dieta nella mortalità. Studi epidemiologici hanno dimostrato che una dieta vegetariana è associata a un minor rischio di disturbi cronici, come aterosclerosi e cancro^[37].

Questi effetti benefici sono stati attribuiti ai composti antiossidanti. Quelli maggiormente presenti e attivi sono la Vitamina C e E, i carotenoidi, ed i composti fenolici, in particolare i flavonoidi. Altri due composti importanti sono l'acido lipoico e l'acido ferulico, di cui si discuterà più approfonditamente nel capitolo successivo. Questi antiossidanti combattono i radicali e inibiscono l'iniziazione dei processi a catena o bloccano il processo di propagazione (seconda linea di difesa). La vitamina E ed i carotenoidi contribuiscono alla prima linea di difesa contro lo stress ossidativo, poiché catturano l' $O_2^{\cdot-}$ ^[38]. I flavonoidi, come anche la Vitamina C, mostrano un'azione protettiva all' α -tocoferolo, e sono in grado di rigenerare la vitamina E, dal radicale α -cromanossi^[39]. I vari antiossidanti possono agire insieme nel ridurre i livelli di specie reattive dell'ossigeno più efficacemente dei singoli antiossidanti, poiché agiscono sinergicamente. Un esempio è dato dalla combinazione di quercetina o catechine con l' α -tocoferolo; l'attività risulta più alta della somma delle singole attività^[40-41].

Questi composti naturali possono essere suddivisi in base alle loro caratteristiche di solubilità in idrosolubili e liposolubili. Tra i primi i più importanti sono la vitamina C, i polifenoli, i flavonoidi e il CoQ₁₀; tra quelli liposolubili hanno grande rilevanza la vitamina E ed i carotenoidi.

³⁷ J.Gundgaard, J.N.Nielsen, J.Olsen, & Sorensen, J. *Public Health Nutrition* (2003); **6**:25-30.

³⁸ N.I.Krinsky, Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* (2001); **17**: 815-817.

³⁹ M.C.Davey, & D.B.Rodriguez-Amaya, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2000); **80**: 825-860.

⁴⁰ S.Trombino, S.Serini, F.Di Nicuolo, L.Cellino, S.Ando, N.Picci, , et al. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (2004); **52**: 2411-2420.

⁴¹ M.Muratami, T.Yamaguchi, H.Takamura, & T.Matoba, *Journal of Food Science* (2003); **68**(5): 1622-1625.

1.7.1 Vitamina C ^[42]

L-ascorbico (o vitamina C) è una vitamina idrosolubile antiossidante che svolge nell'organismo molteplici funzioni. La vitamina C presenta per l'uomo caratteristiche di essenzialità, il che significa che deve essere obbligatoriamente fornita dall'esterno: infatti gli esseri umani, come anche poche altre specie, non sono capaci di sintetizzarla autonomamente, a causa della mancanza della L-gulonogamma-lattone ossidasi, l'ultimo enzima della catena biosintetica che dal glucosio porta appunto all'acido ascorbico^[43]. La vitamina C, ha un ruolo ben conosciuto nella formazione del collagene, ed una carenza in acido ascorbico, provocata generalmente da errate abitudini alimentari, è stata invocata nella patogenesi di molte dermatopatie. Sono ben note, ad esempio, certe conseguenze cutanee da una deficienza in vitamina C, quali alterazioni dei processi di cicatrizzazione, aggravamento di lesioni acneiche, ipercheratosi follicolare (prima lesione cutanea da scorbutto, cui fanno seguito petecchie e vaste ecchimosi da fragilità capillare), stomatiti afose.

La vitamina C possiede uno stereocentro, quindi esiste in due forme L e D, ma solo la forma L è attiva. E' un composto spiccatamente acido, che si presenta sotto forma di cristalli inodori ed insapori con pH circa 2.5 e rotazione ottica specifica di circa +20 gradi. Assunta con la dieta viene assorbita a partire dalla bocca, nello stomaco e soprattutto a livello dell'intestino tenue grazie ad un processo di diffusione passiva dipendente da sodio. Questo sistema è molto efficiente soprattutto per basse dosi della vitamina. L'efficienza di assorbimento si riduce quando la concentrazione di acido ascorbico cresce fino a valori del 16%. Nel plasma la vitamina circola per il 90-95% come acido ascorbico e nel 5-10% come acido deidroascorbico. La vitamina C viene immagazzinata nei tessuti dell'organismo, in particolare, nel surrene e nel fegato. La quota plasmatica che non viene immagazzinata viene eliminata con le urine.

⁴² [html://www.wikipedia.it](http://www.wikipedia.it)

⁴³ I.B.Chaterjee, *World Rev. Nutr. Diet.* (1978) **30**, 69-87.

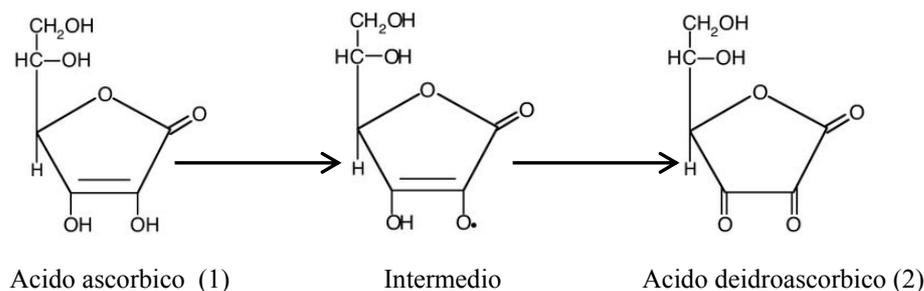


Figura 1.5 – Vitamina C

La vitamina C possiede una forte azione riducente a seguito della presenza di un gruppo enediolico. In presenza di ossigeno e metalli l'acido ascorbico tende ad ossidarsi ed a formare acido deidroascorbico ed acqua ossigenata. Grazie alla forte azione riducente, la vitamina C è utilizzata in molte reazioni di ossidoriduzione. In particolare la vitamina è in grado di donare un elettrone, formando così l'acido semideidroascorbico il quale può donare un secondo elettrone, generando così l'acido deidroascorbico (figura 1.5). I potenziali redox di tali reazioni sono:

- acido semiidroascorbico/acido ascorbico 0,28 Volt,
- acido deidroascorbico/acido semiidroascorbico -0,17 Volt.

Ciò fa della vitamina C un valido donatore di elettroni. Il prodotto finale delle reazioni descritte, l'acido deidroascorbico, può venir ridotto ad opera di un enzima dipendente dal glutatione, la deidroascorbato reduttasi, rigenerando, così, l'acido ascorbico. Sembra, comunque, che abbia un ruolo importante soprattutto in reazioni di ossidoriduzione catalizzate da ossigenasi. Tra i processi più noti in cui la vitamina dovrebbe intervenire si ricordano:

- idrossilazione della lisina e della prolina ad opera della prolina idrossilasi e della lisina idrossilasi, reazioni importanti per la maturazione del collagene,
- idrossilazione della dopamina per formare la noradrenalina,
- sintesi della carnitina,
- catabolismo della tirosina,
- ammidazione di alcuni peptidi con azione ormonale,

- sintesi degli acidi biliari,
- sintesi degli ormoni steroidei per intervento durante le reazioni di idrossilazione,
- riduzione dell'acido folico per formare la forma coenzimatica,
- aumento dell'assorbimento di ferro per riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} ,
- azione di rigenerazione della vitamina E per cessione di un elettrone al radicale α -tocoferossilico.

Funziona da cofattore enzimatico, scavenger dei radicali e come donatore/accettore nel trasporto di elettroni attraverso la membrana plasmatica. Inoltre, l'azione dell'acido ascorbico come chelante dei metalli, con formazione di complessi ascorbato-metallo, che reagiscono meno con l'ossigeno rispetto al metallo libero, contribuisce alla sua attività antiossidante. L'ascorbato trasferisce direttamente un elettrone al metallo di transizione, con formazione del radicale libero dell'ascorbato stesso^[44]. Quest'ultimo reagisce con i radicali perossidici per produrre idroperossidi (specie non radicaliche) e la forma ossidata dell'acido ascorbico. La conversione dell'acido ascorbico nella forma salificata incrementa la sua stabilità e versatilità in differenti sistemi alimentari, con una diminuzione dell'attività biologica (acido ascorbico 100%, ascorbato di calcio 83%). La forma ossidata risulta instabile a pH fisiologico e viene spontaneamente ed enzimaticamente convertita in acido 2,3-dichetogluconico. In vivo, la potenza antiossidante dell'acido ascorbico è dipendente dalla dose somministrata per via orale e dalle conseguenti concentrazioni nel plasma e nei tessuti, dovute ad un assorbimento non lineare attraverso le mucose ed il tratto gastro-intestinale. Essendo idrofilo, la sua attività è svolta a livello del citosol. Combatte la perossidazione lipidica delle LDL, con una protezione più prolungata per inibizione delle modificazioni ossidative delle LDL, nonostante non sia un componente delle LDL. La spiccata azione antiossidante della vitamina C e la sua capacità di mantenere stabili le vitamine A, E, l'acido folico e la tiamina, viene sfruttata dalle industrie che la usano (come tale o sotto forma di sale sodico, potassico e calcico) come additivo nei cibi. La vitamina C topica, pur non essendo

⁴⁴ A.E. Martell, *Ascorbic acid: Chemistry, metabolism and Uses* (1982); 153-167.

uno schermo solare, sembra in grado di proteggere la pelle contro l'esposizione ai raggi ultravioletti. È ugualmente efficace sia contro i raggi UVB (290-320 nm) che UVA (320-400 nm) e l'azione è indipendente dalla lunghezza d'onda. L'acido ascorbico non assorbe i raggi ultravioletti e la sua protezione si realizza a causa delle proprietà antinfiammatorie anche quando è applicata dopo la fotoesposizione^[45]. Oltre all'azione antiossidante, la vitamina C mostra un'azione pro-ossidante dovuta al suo ruolo nel miglioramento dell'assorbimento del ferro a livello intestinale, all'attività di coenzima nel ciclo ossido-riduttivo indotto dai metalli di transizione^[46].

1.7.2 Polifenoli e flavonoidi

Nel mondo vegetale i polifenoli sono composti ubiquitari e presentano una potente attività antiossidante. Il termine include parecchie classi di composti con una struttura chimica comune: sono derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello^[47]. Questa struttura gli consente di funzionare attivamente da *scavenger* per stabilizzare i radicali liberi, da agenti riducenti, da chelanti di metalli pro-ossidanti e da bloccante della formazione dell'ossigeno singoletto.^[48]

Le principali classi di polifenoli vengono distinte in flavonoidi, acidi fenolici, stilbeni e lignani in funzione del numero degli anelli fenolici e degli elementi strutturali che legano tali anelli.

La famiglia più importante è quella dei flavonoidi. Questi composti sono accumulati da uno scheletro flacone C₆-C₃-C₆ e da una elevata bioattività. Furono scoperti dallo scienziato ungherese Albert Szent-Gyorgyi, lo scopritore della vitamina C (premio Nobel nel 1937), il quale osservò che i bioflavonoidi hanno un effetto sinergico con la vitamina C, e hanno grande importanza nel rafforzare i vasi sanguigni, soprattutto i capillari.

⁴⁵ <http://www.lapelle.it>

⁴⁶ D.D. Kitts, *Trends in Food Science & Technology June, (1997) volume B.*

⁴⁷ S.A. Wiseman, M.A.P. Van den Boom, N.J. De Fouw, et al. *Free RadicalbiologyMedical* (1995) **19**: 617-626.

⁴⁸ E. Porkkala-Sarataho, J.T. Salonen, K. Nyssonen, et al. *Men.Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* (2000) **20**:2087-2093.

Nell' ambito della famiglia dei flavonoidi è possibile distinguere sei classi principali: *antocianidine*, *calconi*, *flavanoni*, *flavoni*, *flavonoli*, *iso-flavoni* (figura 1.6).

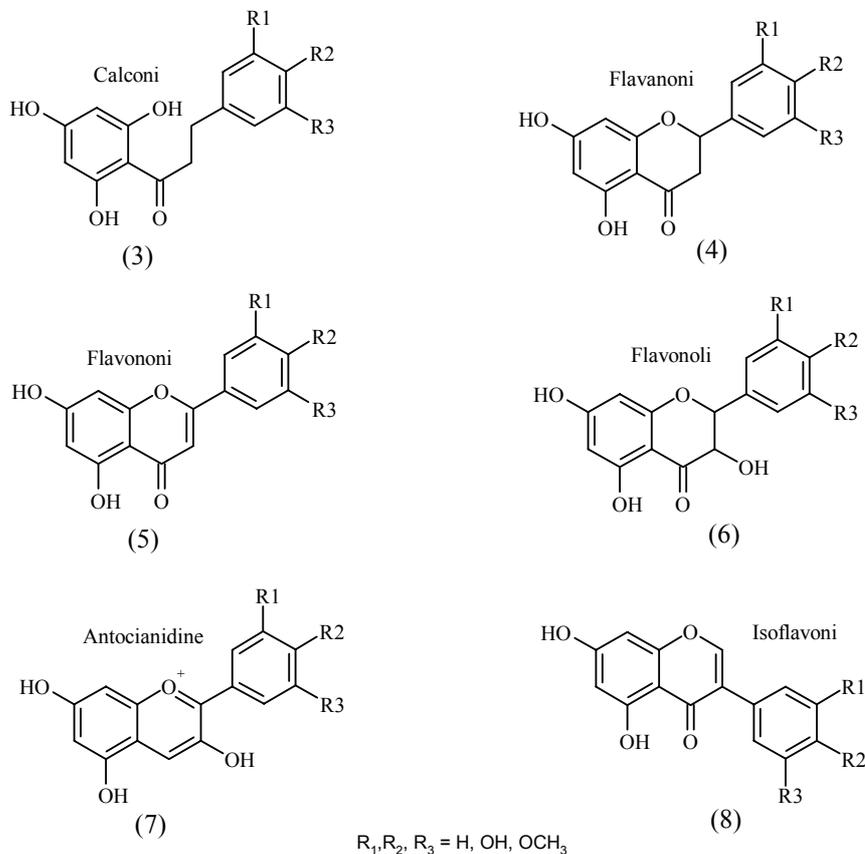


Figura 1.6- Flavonoidi

I bioflavonoidi più conosciuti sono la quercetina, la rutina, l'esperidina, la naringina, la baicalina, il pycnogenolo; aumentano la resistenza dei capillari e regolano la loro permeabilità, sono essenziali per la protezione dall'ossidazione della vitamina C, proteggono dalle emorragie e dalle rotture dei capillari, svolgono attività antivirale e anticancerogena ; l'azione più marcata si ha contro i virus della poliomielite, dell'epatite A e B, dell'influenza e dell' HIV. In vitro la quercetina e il pycnogenolo inibiscono la replicazione dell 'HIV al 100 %. In alcuni studi la genisteina è stata usata nella prevenzione del cancro e la quercetina nella prevenzione delle infezioni virali.

Tra i fattori antagonisti dei bioflavonoidi, ci sono il fumo, lo stress, l'aspirina, il cortisone, gli antibiotici, il caffè, mentre il loro assorbimento è

migliorato dalla vitamina C, dal calcio e dal magnesio. Le proprietà di assorbimento e deposito dei bioflavonoidi sono molto simili a quelle della vitamina C. Essi vengono prontamente assorbiti dal tratto intestinale e immessi nella corrente sanguigna. Le quantità in eccesso vengono eliminate attraverso le urine e la traspirazione.

Dal punto di vista chimico sono difenilpropani distinti in varie classi a seconda del grado di ossidazione dell'anello eterociclico. Il numero e le specifiche posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti e agenti antinfiammatori.

1.7.3 Coenzima Q₁₀

Il coenzima Q (ubiquinone) appartiene ad una classe di chinoni omologhi, ubiquitari, contenenti un nucleo 2,3-dimetossi-5-metilbenzochinone ed una catena isoprenoide laterale in posizione 6. La conoscenza dei livelli di CoQ₁₀ nei tessuti è di grande interesse, data la sua importanza come intermedio chiave della catena respiratoria mitocondriale. È coenzima del sistema della succinico deidrogenasi (SDH) che catalizza il trasferimento degli elettroni dal gruppo metallico non eme della SDH al citocromo C₁; ne segue tra l'altro un diretto rapporto tra la variazione del consumo di ATP (Adenosina-trifosfato) ed i livelli di CoQ₁₀. Inoltre, è stato osservato un ruolo della forma ridotta del coenzima (ubichinolo) che ha la capacità di inibire le reazioni perossidative^[49] a catena iniziate dalle ROS che sfuggono alle degradazioni enzimatiche. Il CoQ₁₀ ha una funzione come agente stabilizzante di membrana, dato che evita la perossidazione lipidica e regola la fluidità: è un importante agente antiossidante^[50] (figura 1.7). Questa molecola è usata in clinica medica, nelle terapie di diverse disfunzioni ad essa correlate. Esiste una relazione tra gli insulti perossidativi e l'aumento della concentrazione di antiossidanti endogeni, come il coenzima, nei distretti interessati.

⁴⁹ A.Mellors, A.L.Tappel. *Lipids* (1966) **1**: 282-284.

⁵⁰ A.Mellors, A.L.Tappel. (1966) **241**: 4353-4356.

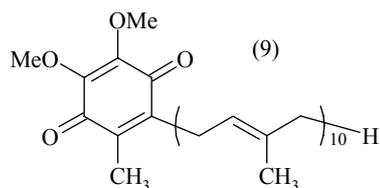
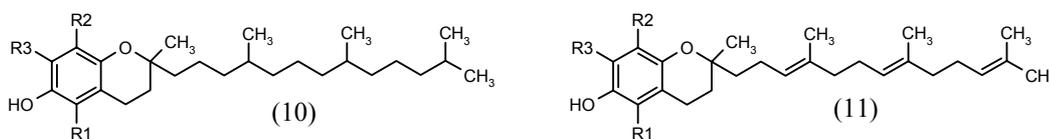


Figura 1.7 – Coenzima Q10

1.7.4 Vitamina E

I tocoferoli^[42] sono derivati del tocololo a cui è legata una catena isoprenoide satura con tre centri chirali. I tocotrienoli, invece, presentano la catena laterale insatura. Ad entrambe le famiglie partecipano membri detti alfa, beta e gamma secondo il numero di sostituenti metilici nel nucleo aromatico. L'attività vitaminica è maggiore per i tocoferoli rispetto ai tocotrienoli, per la forma alfa rispetto alla beta e alla gamma, e infine per gli isomeri R rispetto a quelli S. La forma più biologicamente attiva è quindi il D- α -tocoferolo.



<i>Tocoferoli</i>				<i>Tocotrienoli</i>
	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	
α -Tocoferolo (5,7,8-Trimetiltocolo)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -Tocotrienolo (5,7,8-Trimetiltocotrienolo)
β -Tocoferolo (5,8-Dimetiltocolo)	CH ₃	H	CH ₃	β -Tocotrienolo (5,8-Dimetiltocotrienolo)
γ -Tocoferolo (7,8-Dimetiltocolo)	H	CH ₃	CH ₃	γ -Tocotrienolo (7,8-Dimetiltocotrienolo)
δ -Tocoferolo (8-Metiltocolo)	H	H	CH ₃	δ -Tocotrienolo (8-Metiltocotrienolo)

Figura 1.8 – Tocoferoli e Tocotrienoli

La vitamina E è una delle più importanti molecole antiossidanti, presenti nella membrana cellulare. Esplica la sua azione prevalentemente a livello delle membrane plasmatiche e delle lipoproteine plasmatiche, per la sua liposolubilità.

Interrompe le reazioni a catena della lipoperossidazione^[51]; elimina i radicali liberi generati durante la riduzione monovalente della molecola di ossigeno e durante la normale attività degli enzimi ossidanti. È possibile che la vitamina E promuova la formazione di altri scavengers antiossidanti.

La vitamina E si inserisce parallelamente alle catene idrocarboniose degli acidi grassi e interagisce con i radicali (LOO•), formando (LOOH); così facendo, si trasforma a sua volta in un radicale (E•) poco reattivo, ma impedisce la formazione di nuovi radicali (L•) molto reattivi. La vitamina E è un antiossidante secondario, poiché non previene le ossidazioni, ma le rallenta.

Il radicale della vitamina E, infatti, possiede la specifica caratteristica degli “scavengers”, cioè di quelle molecole che interagendo con un radicale libero gli donano un elettrone, trasformandosi in specie radicaliche poco reattive.

Anche i radicali poco reattivi devono però essere stabilizzati; il riciclaggio della vitamina E sembra avvenire principalmente ad opera della vitamina C (acido ascorbico). L'interazione del radicale vitamina E con l'acido ascorbico, riporta la vitamina E al suo stato molecolare iniziale, ma forma un radicale ascorbato. Due radicali ascorbato possono poi dismutare tra di loro dando luogo ad una molecola di acido ascorbico ed una di acido deidroascorbico, terminando la catena di reazioni. Recenti studi hanno messo in evidenza anche l'esistenza di alcuni enzimi in grado di riportare sia il radicale della vitamina E che quello dell'acido ascorbico allo stato non radicalico.

La vitamina E rappresenta uno dei principali meccanismi difensivi nei confronti dello stress ossidativo della muscolatura scheletrica, e la sua somministrazione con la dieta aiuta a prevenire il danno della muscolatura scheletrica operato dai ROS durante un esercizio fisico intenso, suggerendone l'uso negli atleti, nelle condizioni di astenia muscolare o nell'anziano le cui capacità di lavoro muscolare sono ridotte.

⁵¹ E.Niki, Y.Yoshida, Y.Saito, N.Noguchi, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005); **338**: 668-676.

1.7.5 Carotenoidi

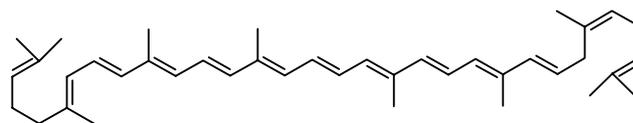
I carotenoidi^[52] devono il loro nome al Carotene, una sostanza gialloarancio, trovata per la prima volta (nel 1831) nella radice di *Daucus carota*, cioè nella comune carota. Sono un gruppo di pigmenti, di colore dal giallo al violetto, molto diffusi in natura, privi di azoto nella molecola e solubili nei grassi, che giocano un ruolo importante di protezione contro i processi fotoossidativi delle piante. L'intensità del loro colore è dovuta al sistema cromoforo, costituito da un elevato numero di doppi legami coniugati, responsabili anche della grande instabilità dei carotenoidi, che si ossidano facilmente all'aria e sono notevolmente modificati dalla presenza di acidi minerali. Per esposizione alla luce e ad altri agenti, i carotenoidi naturali, in cui i doppi legami non ciclici sono sempre nella configurazione *trans*, possono trasformarsi in una miscela di stereoisomeri (isomerizzazione *trans-cis*), nei quali uno o più doppi legami si sono spostati in posizione *cis*. Per il β -carotene, ad esempio, è stata ipotizzata l'esistenza di 272 isomeri, anche se poi in realtà il numero di quelli che si ottengono, per ragioni di ingombro sterico, è minore. Per il licopene sono state ritrovate in natura, in alcune varietà di pomodoro, nelle alghe e nei fiori di calendula, una ventina di queste forme poli-*cis*, che sono state denominate prolicopeni.

I carotenoidi sono terpenoidi, di solito a 40 atomi di carbonio, formati da otto unità isopreniche. Lo scheletro della loro molecola consiste generalmente di una porzione centrale, con 22 atomi di carbonio, e due terminali di 9 atomi di carbonio ciascuna. Le unità terminali possono essere acicliche, come nel licopene^[53], oppure tutte e due cicliche, come nell' α e β -carotene, o una ciclica e l'altra aciclica, come nel γ -carotene (figura 1.9).

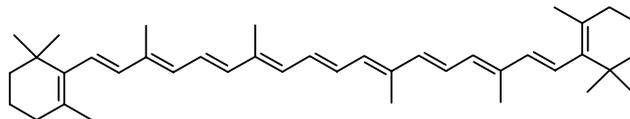
Le unità terminali cicliche possono inoltre presentare una ampia varietà di gruppi, per esempio alcolici, chetonici, epossidici e benzenici.

⁵² A. Chiu, A.B.Kimbal, *British Journal of Dermatol* (2003); **149**: 681-691.

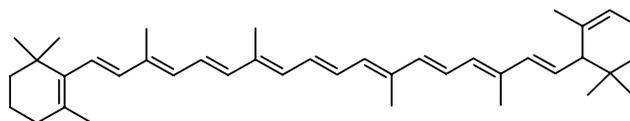
⁵³ P. Di Mascio, S.Kaiser, H.Sies, *Arch. Biochem. Biophysics* (1989); **274**, 532-538.



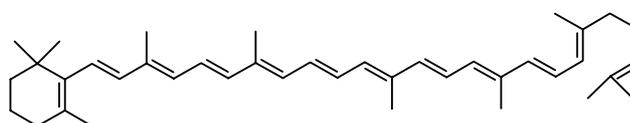
Lycopene (12)



Beta-carotene (13)

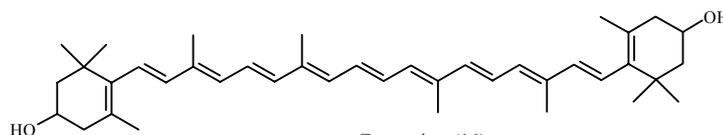


Alfa-carotene (14)

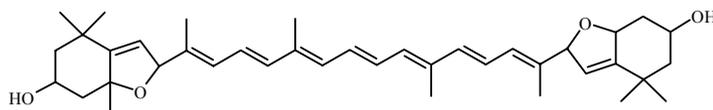


Gamma-carotene (15)

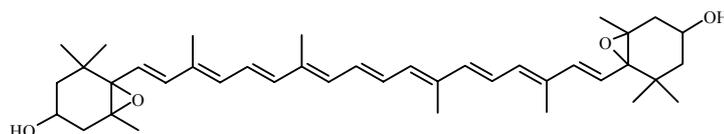
Figura 1.9 – Carotenoidi



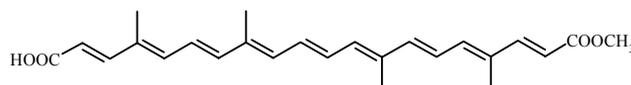
Zeoxantina (16)



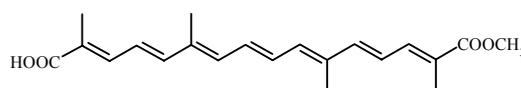
Auroxantina (17)



Violaxantina (18)



Bixina (19)



Crocetina (20)

Figura 1.10 - Carotenoidi

Alla famiglia dei carotenoidi appartengono: i caroteni, a struttura idrocarburica dienica, le xantofille, cioè i derivati ossigenati (alcoli, chetoni, epossidi), e gli acidi carotenici.

Idrocarburi carotenici sono ad esempio: il licopene, il β -carotene e l' α -carotene, mentre alcuni dei principali idrossicarotenoidi sono: la luteina, la zeaxantina, la violaxantina e l'auroxantina; ai carotenoidi acidi appartengono invece la bixina e la crocetina.

Gli animali, compreso l'uomo, non sono però in grado di sintetizzare questi composti, se ne riforniscono dal mondo vegetale attraverso l'alimentazione, e poi li modificano. Di particolare importanza per l'uomo è la trasformazione degli α , β e γ -caroteni (soprattutto del β -carotene) in vitamina A^[54], a livello della mucosa intestinale. Alcuni di questi pigmenti possono essere considerati quindi provitamine A: in particolare, l'attività provitaminica del β -carotene è circa il doppio rispetto a quella degli α e γ -caroteni. Alcuni carotenoidi sono potenti antiossidanti, e svolgono un importante ruolo di difesa del nostro organismo dai radicali liberi. In particolare β -carotene, licopene e luteina proteggono la pelle dagli effetti dannosi della luce ultravioletta, inibiscono lo sviluppo di cellule cancerose e prevengono i disturbi circolatori e visivi, con efficacia provata sperimentalmente anche nell'uomo. L'efficacia antiossidante dei licopeni, che rappresentano il 50% dei carotenoidi circolanti nel plasma, è addirittura doppia rispetto a quella del β -carotene, nei confronti soprattutto di alcuni radicali liberi specifici, come l'ossigeno singoletto. I carotenoidi^[55] in associazione con vitamine C ed E rappresentano un meccanismo più efficiente per contrastare il deterioramento fisico indotto dai radicali liberi, cioè il risultato che deriva dalla sinergia di questi composti è superiore rispetto a quello ottenuto con gli stessi da soli^[56].

⁵⁴ G.B.Brubacher, H.Weiser, *Int. J. Vit. Nutr. Res.*(1984) **55** :5-15.

⁵⁵ N.I. Krinsky., *Free rad. Biol. Med.* (1989); 627-635.

⁵⁶ H.Heinrich, M.Wiebusch, H.Tronnier, H.Jungmann, *Cosmetics and Toiletries magazine* (1998); **113**: 61-70

L'assunzione del β -carotene e del licopene con la dieta, è associata ad un decremento dell'incidenza di molte importanti patologie come il cancro, l'aterosclerosi e l'invecchiamento cellulare^[57].

Va ricordato che in timociti normali o trasformati, il beta-carotene agisce come antiossidante ad una pressione di ossigeno di 150 mmHg inibendo la perossidazione lipidica indotta da radicali. Quando la pO_2 aumenta a 760 mmHg il beta-carotene perde la sua attività antiossidante ed effettua un effetto pro-ossidante che è dose dipendente.^[58]

1.7.6 Chitina e derivati ^[59]

La chitina è un mucopolisaccaride naturale abbondantemente distribuito nello scheletro dei crostacei e nella cuticola degli insetti. Consiste di residui 2-acetammido-2ossi-(1-4)- β -D-glucopiranosidi, e presenta legami ad idrogeno inter e intramolecolari. La sua insolubilità in acqua rappresenta il suo principale limite. Sono stati sintetizzati derivati della chitina, come i carbossimetilchitina, chitina solfatata e chitina glicosilata in modo da aumentare la solubilità e le applicazioni. In particolare l'amminoetil-chitina (AEC) esibisce una buona attività scavenger dei radicali liberi, dimostrata mediante il test con il DPPH.

1.8 Antiossidanti polimerici

L'interesse nei confronti di molecole antiossidanti a basso peso molecolare è notevolmente aumentato in campo farmaceutico, 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 meccanica.

Alcuni antiossidanti a basso peso molecolare presentano caratteristiche farmacocinetiche sfavorevoli, come ad esempio una rapida metabolizzazione che ne riduce la durata d'azione, o un elevato assorbimento cellulare che ne determina

⁵⁷ A. Mortensen, L. H. Skibsted, and T. G. Truscott. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (2001); **385**: 13-19.

⁵⁸ Munteanu A., Zingg J.M., Azzi A., *J. Cell. Mol. Med* (2004); **8**: 59-76.

⁵⁹ Jae-Young Je and Se-Kwon Kim. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2006); **16**: 1884-1887.

l'interferenza con le cascate trasduzionali dei segnali cellulari. Composti altamente lipofili hanno, inoltre, la possibilità di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) e risultano quindi altamente tossici per il sistema nervoso centrale. Per questo motivo, l'inserimento dell'antiossidante all'interno di una matrice polimerica ne potrebbe impedire l'attraversamento della BEE a causa delle sue elevate dimensioni e conferire 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 mirato^[60].

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

- a. Polimerizzazione o copolimerizzazione radicalica..
- b. Legame chimico di composti a basso peso molecolare con attività antiossidante ad un polimero precedentemente sintetizzato.

1.8.1 Polimerizzazione radicalica di monomeri funzionalizzati con un antiossidante

Il processo è complicato 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 antiossidante, quali ad esempio derivati della vitamina E (α -tocoferolo) o delle fenotiazine.

1.8.1.1 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 stessa^[61].

Sono stati realizzati copolimeri tra un derivato metacrilico della vitamina E, l' α -tocoferilmetacrilato e il 2-idrossietilmetacrilato.

⁶⁰ M. Kurisawa, J.E. Chung, H.Uyama, S.Kobayashi, *Biomacromolecules* (2003); **4** : 1394-1399.

⁶¹ C. Ortiz, B.Vazquez, J.San Roman, *Polymer* (1998); **39** (17) : 4107-4114.

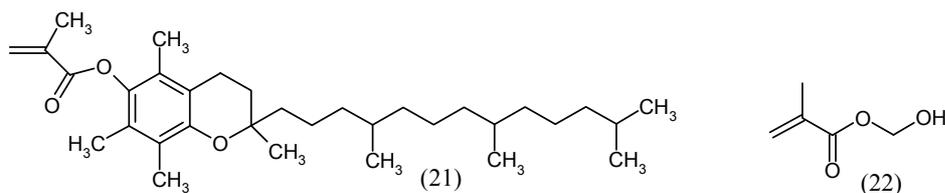


Figura 1.11 – Derivato metacrilico del tocoferolo e 2-idrossietilmetacrilato

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.

1.8.1.2 Derivato vinilico delle fenotiazine

Le fenotiazine sono una classe di composti eterociclici che presentano applicazioni in campo fotografico e, grazie alle loro proprietà antiossidanti, anche farmaceutico.

I derivati vinilici delle fenotiazine, e in particolare la 2-vinilfenotiazina (2-VFT), sono di particolare interesse^[62]. Tuttavia, i primi esperimenti sulla polimerizzazione radicalica della 2-VFT sono falliti in quanto il radicale ottenuto dall'estrazione dell'idrogeno amminico inibisce lo stadio di propagazione della polimerizzazione.

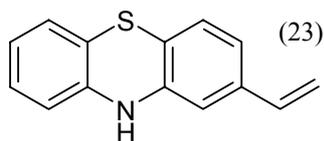


Figura 1.12 – 2-vinilfenotiazina

⁶² S.S.Nikulin, V.M.Misin, V. M.Komarov, M.V.Misin, *Russian Journal of Applied Chemistry* (2003); **76** (8) : 1327-1330

Sono stati comunque realizzati alcuni polimeri della 2-VFT in “bulk” e in soluzione. In quest’ultimo caso, il problema della formazione di un radicale libero stabile determina una bassa conversione. Nella polimerizzazione in bulk la generazione di radicali è facilitata dalle temperature notevolmente elevate utilizzate in questa procedura (185-245°C) rispetto a quelle utilizzate per la polimerizzazione in soluzione (70-100°C). Ciò determina una maggiore concentrazione di specie radicaliche iniziatrici, maggiore velocità dello stadio di iniziazione e quindi maggiore conversione. Il polimero ottenuto ha tuttavia peso molecolare ridotto poiché l’elevata concentrazione di radicali aumenta le possibilità che si verifichino reazioni di terminazione della catena.

La capacità delle fenotiazine di inibire la polimerizzazione radicalica suggerisce che la degradazione termica ossidativa dei polimeri possa essere ostacolata dall’introduzione di queste molecole all’interno di un sistema macromolecolare. La degradazione termica della poli-2-VFT inizia infatti a temperature più elevate (350-380°C) di quelle utilizzate nella polimerizzazione in bulk. L’introduzione di derivati vinilfenotiazinici in diversi materiali polimerici ne ha effettivamente aumentato la resistenza nei confronti della degradazione termica, tuttavia le fenotiazine tendono ad escludere dalla superficie del materiale l’eventuale componente gommosa con conseguente riduzione della stabilità meccanica del materiale. Per evitare che si verifichi questo problema, le fenotiazine vanno introdotte nel sistema polimerico durante la preparazione della gomma e prima del processo di vulcanizzazione. Le gomme così ottenute risultano molto più resistenti alla degradazione termica e all’azione dell’ozono.

1.8.1.3 Polianilina e polipirrolo

Un tipico esempio di polimeri ottenuti con questa procedura sono i polimeri conduttori, come la polianilina e il polipirrolo. Questi composti presentano una serie di applicazioni che ne prevedono il contatto con i tessuti biologici, tra le quali si ricordano la creazione dei muscoli artificiali, il rilascio controllato dei farmaci e la stimolazione elettrica necessaria alla rigenerazione nervosa^[63].

⁶³ M.G. Nikolaidis, J.D. Sejduc, G.A.Bowmaker, R.P.Cooney, P.A. Kilmartin, *Synthetic Metals* (2004); **140** : 225-232.

I risultati ottenuti, valutando il ruolo delle ammine aromatiche e delle più recenti polianiline come antiossidanti per miscele di gomme, indicano che le poliammine, in particolare le polianiline metossi-sostituite, sono molto efficaci nell'abbassare la velocità di ossidazione. Le polianiline metossi-sostituite sono più attive grazie alla natura elettrone-donatrice del sostituente presente sull'anello aromatico che stabilizza per risonanza il radicale formato sulla molecola^[64].

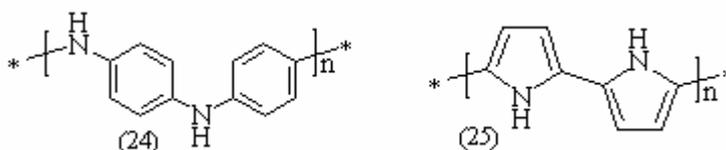


Figura 1.13 – Polianilina e polipirrolo

1.8.1.4 Polirutina

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.

La rutina 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,

⁶⁴ M.G. Nikolaidis, J. D. Sejdud, P.A. Kilmartin, G.A. Bowmaker, R.P.Cooney, *Current Applied Physics* (2004); **4** : 343-346.

antinfiammatorio e antiemorragico, un regolatore della permeabilità capillare e della stabilità delle piastrine^[59]. 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.

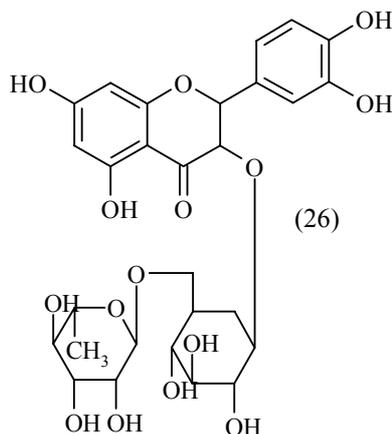


Figura 1.14 – Rutina

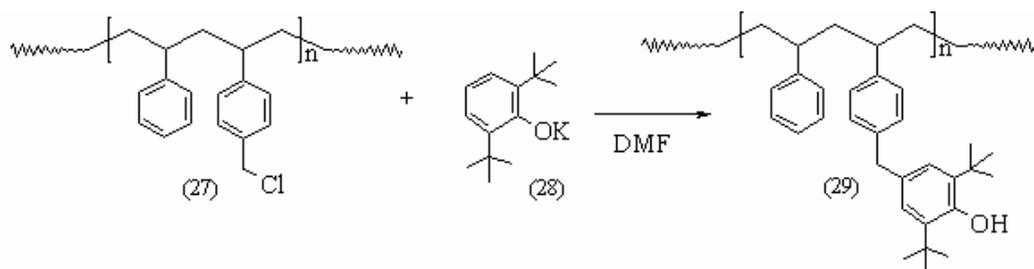
I risultati indicano una capacità concentrazione-dipendente della polirutina di bloccare il radicale superossido (inibizione del 100% quando la concentrazione di unità di rutina è pari a 300 μM) e senza effetti pro-ossidanti. Al contrario la rutina presenta azione pro-ossidante a basse concentrazioni.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

1.8.2 Introduzione di gruppi antiossidanti su matrici polimeriche

L'inserimento di gruppi antiossidanti su matrici polimeriche precostituite, elude le difficoltà sintetiche previste nella maggior parte dei casi di diretta polimerizzazione di molecole antiossidanti, come ad esempio polimeri con pesi molecolari bassi. Questa via sintetica offre il vantaggio di scegliere fra una vasta gamma di monomeri e comonomeri per la sintesi del polimero base che determinerà notevolmente le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto finale.

1.8.2.1 Inserimento di 2,6-diterzbutilfenolo in matrice polistirenica

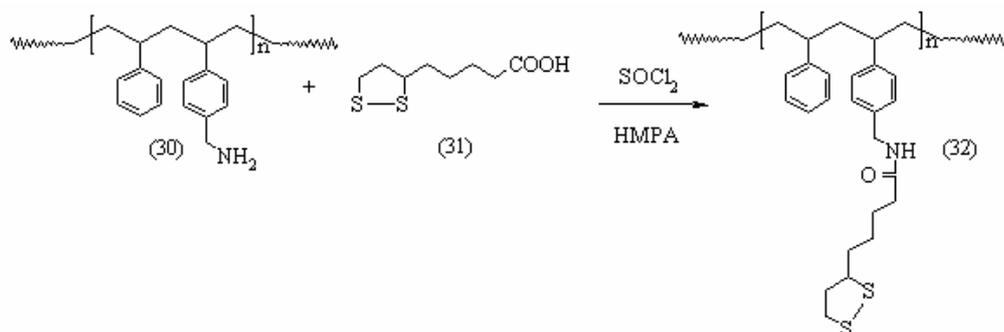
Il 2,6-di-terzbutilfenolo (**28**) è stato introdotto come sale potassico in una struttura polimerica mediante reazione con il copolimero stirene-clorometilstirene (**27**), secondo lo schema 1.1. Il materiale ottenuto trova applicazione in campo industriale come antiossidante polimerico per macromerici acrilonitrile-butadiene-stirene^[65].



Schema 1.1 – Introduzione del 2,6-di-terzbutilfenolo in una struttura polistirenica

1.8.2.2 Acido lipoico introdotto in matrice polistirenica

Il copolimero stirene-amminometilstirene (**30**) è stato funzionalizzato con acido lipoico (**31**) secondo lo schema 1.2^[66].

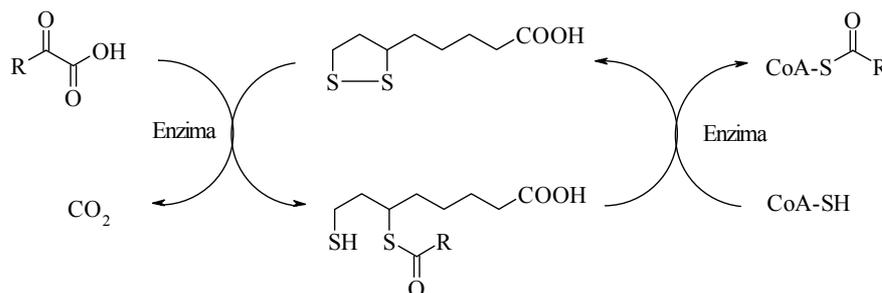


Schema 1.2– Introduzione dell'acido lipoico in una struttura polistirenica

L'attività del risultante copolimero è stata valutata nelle reazioni delle acil-tranferasi di cui l'acido lipoico è un cofattore (schema 1.3).

⁶⁵ T.W.Tseng, Y.Tsai, J.S. Lee, *Polymer Degradation and Stability* (1997); **58** : 241-245.

⁶⁶ Y.Nambu, T Endo, M. Okawara, *Journal of Polymer Science* (1980); **18** : 2793-2802.



Schema 1.3 - Valutazione dell'attività acetiltransferasica di acido lipoico

1.8.2.3 Polimeri flavonoidi

Le reazioni ossidative a catalisi enzimatica sono utilizzate, oltre per la sintesi di polimeri dei flavonoidi, anche per la coniugazioni di fenoli sui polimeri^[67]. 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' $\cdot\text{O}_2$. Il coniugato presenta attività antiossidante maggiore rispetto alla catechina.

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.

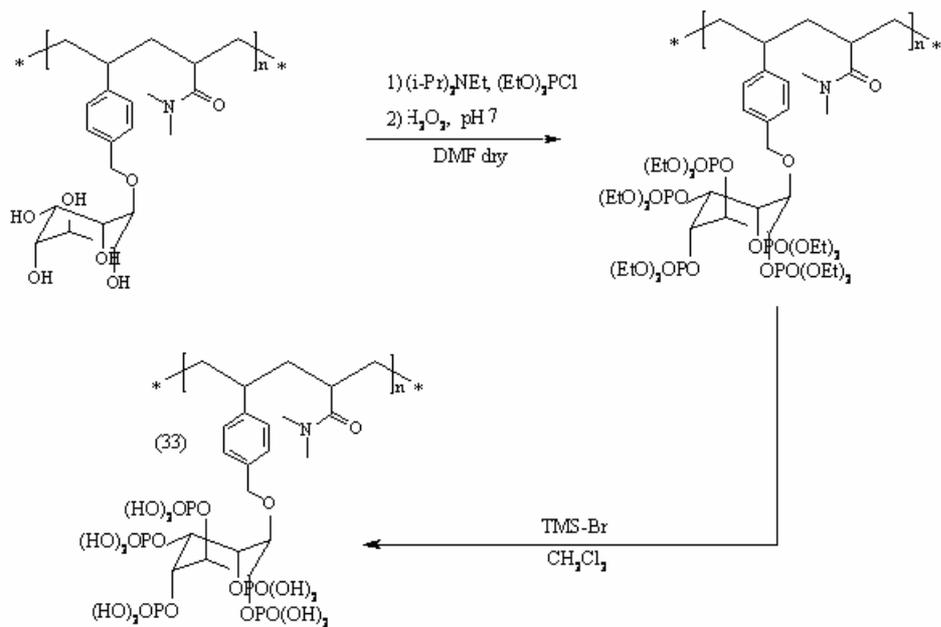
1.8.2.4 Derivato polimerico dell'acido fitico

Recentemente è stato realizzato un derivato polimerico dell'acido fitico^[68] inserendo lungo la catena polimerica unità di mio-inositolo pentafofato. Il polimero sintetizzato presenta proprietà antiossidanti in quanto inibisce la perossidazione lipidica di membrane microsomiali di fegato di ratto, sottoposte a

⁶⁷ J. E.Chung, M.Kurisawa, H.Uyama, S. Kobayashi, *Biotechnology Letters* (2003); **25** : 1993-1997

⁶⁸ F. Iemma; S. Trombino; F. Puoci; G. Cirillo; U.G. Spizzirri; R. Muzzalupo; N.Picci, *Macromolecular Bioscience* (2005); **5** : 1049-1056

stress ossidativo per esposizione al Fe^{3+} in presenza di un agente riducente. Tale sistema ha evidenziato un'attività antiossidante paragonabile a quella dell'acido fitico commerciale (schema 1.4).



Schema 1.4 – Sintesi di un derivato polimerico dell'acido fitico

CAPITOLO II

ACIDO LIPOICO E ACIDO FERULICO: PROPRIETÀ E APPLICAZIONI

2.1 Introduzione

Nel presente capitolo saranno approfondite le proprietà dell'acido lipoico e dell'acido ferulico, due antiossidanti ai quali, negli ultimi anni, la ricerca scientifica ha dedicato grande attenzione.

La scelta di tali composti è giustificata dalla possibilità di realizzare dei loro derivati monomerici e polimerici che, come sarà dimostrato nei capitoli successivi, sono in grado di conservare l'attività antiossidante. Importante è la presenza di un gruppo funzionale nella loro struttura, quale il gruppo carbossilico, che oltre a permettere la formazione di nuovi legami, non interferisce con l'attività scavenger e chelante dei composti in oggetto.

2.2 Acido lipoico

L'acido lipoico (**31**) è un agente antiossidante con molte potenzialità; un potente attenuatore dei danni in vitro e in vivo mediati da specie reattive. È un universale antiossidante in ambiente lipofilo e acquoso. Fu isolato nel 1951 dal fegato di bue e, prima di scoprire la sua biosintesi nelle piante e nei mammiferi, è stato inserito nella classe delle vitamine liposolubili; nell'uomo la sua sintesi diminuisce dopo i cinquant'anni e per questo diventa essenziale la sua assunzione con la dieta. È presente in tutti gli organismi eucarioti e procarioti. Tra le sue funzioni endogene, l'acido lipoico agisce da cofattore per numerosi enzimi che partecipano al processo di conversione del glucosio, degli acidi grassi e delle altre

fonti energetiche in adenosin trifosfato (ATP)^[16] (es. piruvato deidrogenasi, alfa-chetoglutarato deidrogenasi, isocitrato).

2.2.1 Struttura e proprietà

L'acido lipoico (LA, acido 1,2-ditiolano-3-pentanoico, acido 1,2-ditiolano-3-valerico o acido 6,8,tiottico) (figura 2.1) si presenta come polvere gialla, è solubile in etanolo, etere etilico, DMF, solventi alogenati come cloroformio e diclorometano, ed in molti altri solventi organici; è solubile anche in acqua e questo fa di lui un composto molto versatile. Può essere purificato per ricristallizzazione da esano e cicloesano. Il suo peso molecolare è 206, assorbe nel range ultravioletto con assorbanza massima alla lunghezza d'onda di 333 nm.

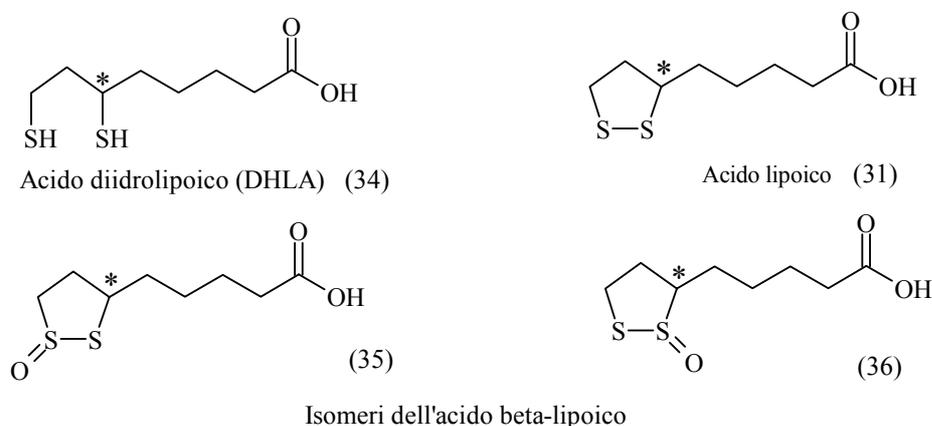


Figura 2.1 La struttura chimica dell'acido diidrolipoico (19), dell'acido lipoico (DHLA) (20) e degli isomeri del acido β -lipoico (21) (22).

La sua struttura contiene un atomo di carbonio asimmetrico^(*), che può esistere nella configurazione R ed S. La forma R è comunque quella più abbondante in natura, ma negli studi terapeutici è generalmente somministrato come racemo. Generalmente i composti antiossidanti possiedono attività antiossidante nella loro forma ridotta. L'acido lipoico è unico fra queste molecole, perché mantiene funzioni protettive in entrambe le forme, ossidata e ridotta^[17]. Tuttavia il DHLA è un antiossidante più efficiente. Una peculiare caratteristica dell'acido lipoico, che

¹⁶ T.Konrad, P.Vivina, K.Kusterer, Alpha lipoic acid treatment decreases seum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2-diabetes, (1999); **22**: 280-287.

¹⁷ L. Packer, E.H. Witt, H.J. *Free Rad. Biol. Med.* (1995); **19**: 227-250

lo rende “unico” fra i molteplici antiossidanti, è la capacità di essere sia un composto liposolubile, sia idrosolubile. Il basso peso molecolare, intermedio fra quello dell’acido ascorbico e del tocoferolo, lo rende solubile sia in acqua che in ambienti lipofili, consentendogli di collegare l’attività degli antiossidanti di membrana con quelli citoplasmatici, rafforzando così il network antiossidante della cellula. Questa sua proprietà amfifilica gli consente, infatti, di esplicare il proprio meccanismo d’azione a livello di vari compartimenti cellulari, essendo in grado di attraversare le membrane e di proteggere dai radicali liberi sia le strutture esterne che quelle interne alla cellula. Possiede alcune caratteristiche che lo rendono straordinariamente efficace per contrastare i danni associati alla formazione di radicali liberi.

Un’altra ragione per la duplice solubilità della molecola risiede nella sua struttura chimica: contiene un gruppo carbossilico finale che lo rende più solubile in acqua rispetto al tocoferolo e allo stesso tempo possiede più atomi di carbonio rispetto all’acido ascorbico, che lo rendono più solubile nei compartimenti lipofili delle membrane. I due gruppi tiolici presenti nell’acido lipoico gli conferiscono una particolare reattività, infatti i composti biologici contenenti zolfo e i disolfuri aventi una struttura ciclica a cinque membri sono soggetti a reazioni di riduzione e/o nucleofile molto più veloci rispetto ai derivati a catena aperta quali la cisteina e il glutathione^[18]. Il minore angolo di torsione del ciclo a cinque membri fa sì che sul ponte disolfuro ci sia una maggiore densità elettronica, inoltre i gruppi tiolici, separati solo da tre atomi di carbonio, condizionano l’ossidazione del DHLA.

Una proprietà importante dell’acido lipoico è quello di polimerizzare senza iniziatore per apertura dei legami disolfuro e successiva formazione di ponti disolfuro intermolecolari. La polimerizzazione avviene per semplice sonicazione o a temperature superiori alla sua temperatura di fusione^[19,20,21]. Un esempio è dato dalla copolimerizzazione dell’acido lipoico (bp 61-62°C) con l’1,2-ditiano (bp 31-32 °C) che fu condotta a 80°C, con ottimi risultati e rese elevate^[22] (figura 2.2).

¹⁸ A. Senning, *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry*. New York (1971).

¹⁹ K.Endo, T.Shiroi, N.Murata, *Polm. J.* (2005); **37** :512-516.

²⁰ K.Endo, T.Shiroi, N.Murata, G.Kojima, T.Yamanaka, *Macromolecules* (2004); **37**: 3143-3150.

²¹ K.Endo, Y.Kimpara, *Polym. Prepr. Jpn* (1998); **47**: 1542-1543.

²² K.Endo, T.Yamanaka, *Macromolecules* (2006); **39**: 4038-4043.

Questo stesso polimero [poli(LPA-co-DT)] è decomposto attraverso raggi UV a temperatura ambiente usando una lampada ad alta pressione.

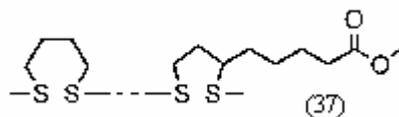


Figura 2.2 - Acido lipoico copolimerizzato con 1,2-ditiano

2.2.2 Biosintesi

Sebbene si conosca molto sulla funzione dell'acido lipoico nei complessi multienzimatici dove è coinvolto, la sua biosintesi non è ben conosciuta in tutti gli organismi.

Nelle cellule procariotiche gli otto atomi di carbonio dell'acido lipoico derivano probabilmente dall'acido ottanoico; gli acidi 8-tio-ottanoico e 6-tio-ottanoico sono possibili intermedi della biosintesi, come è stato dimostrato da esperimenti fatti su *Escherichia Coli*. In particolare sembra che nella formazione dei due legami C-S, che molto probabilmente avviene attraverso un meccanismo radicalico, siano coinvolti tre geni. Per l'inserimento del primo atomo di zolfo nello scheletro ottanoico, il gene lipA codifica per la sintesi della lipoil sintasi, enzima simile alla biotina sintasi. Altri due geni, lipB e lila, sono stati identificati per la sintesi di ligasi, che trasferiscono il gruppo lipoilico sulla subunità E₂ dei complessi della piruvato deidrogenasi e della α -chetoglutarato ^[23].

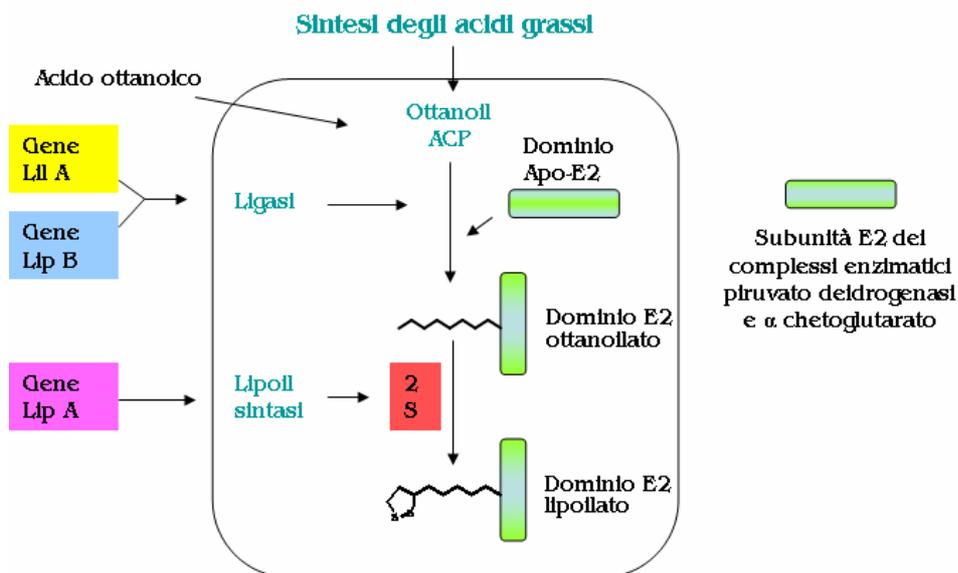
Studi genetici su *E.coli* hanno dimostrato che le cellule con mutazioni nel gene lipA non sono capaci di produrre acido lipoico e che quindi fra i tre geni menzionati il lipA è l'unico responsabile della sintesi (schema 2.1).

Nelle cellule eucariotiche i mitocondri sono il compartimento cellulare degli enzimi che legano l'acido lipoico. In *Saccharomyces cerevisiae* è stato isolato un altro gene, il LIP5, che è un analogo del LipA isolato in *E.coli*. Come avviene per *E.coli*, la proteina lipoil sintasi, codificata da tale gene, ha un'estensione amminoterminale con caratteristiche dei segnali target mitocondriali; ciò suggerisce che la biosintesi dell'acido lipoico nelle cellule eucariotiche avviene proprio nei

²³ K. E. Reed, J.E. Cronan Jr, *J. Bacteriol.* (1993); **175**: 1325-1336.

mitocondri. Ulteriori dati confermano che nella sintesi dell'antiossidante è coinvolta anche un'altra proteina: l'ACP (Acyl Protein Carrier)^[24].

Studiando la funzione della proteina ACP nei mitocondri di alcune piante si è scoperto che l'ACP è coinvolta nella sintesi degli acidi grassi, e che la maggiore funzione di questo sistema è destinata alla produzione dei precursori della LA sintasi.



Schema 2.1 – Biosintesi dell'acido lipoico in *E. Coli*

2.2.3 Metabolismo

L'acido lipoico a livello fisiologico può subire una serie di reazioni di riduzione e di ossidazione.

È risaputo che i disolfuri possono essere ridotti da altri tioli. In condizioni normali il tiolo glutatione (GSH ridotto) è presente abbondantemente. Nella fase iniziale, il GSH riduce il ponte disolfuro intramolecolare dell'acido lipoico. Tuttavia, questa reazione procede così lentamente che il contributo del GSH può essere trascurato^[25]. Più importante invece è la riduzione enzimatica: nei mitocondri avviene a spese del NADH ad opera della LipDH, mentre nel citosol avviene a spese del NADPH catalizzata dalla la GSH reduttasi. Questi enzimi hanno una marcata e opposta stereospecificità, infatti la GSH reduttasi catalizza la riduzione

²⁴ H. Wada, D. Shintani, J. Ohlrogge, *Pro. Natl. Acad. Sci.* (1997); **94**: 1591-1596.

²⁵ G. P. Biewenga, M.F. Vriesman, G.R.M.M. Haenen and A. Bast, *The metabolism of lipoic acid in ma.* (1996 b)

dell'enantiomero S due volte più velocemente dell'enantiomero R; la LipDH invece riduce l' R-acido lipoico 28 volte più velocemente dell'enantiomero S.

La stereochimica di LA e DHLA riveste un ruolo importante nel loro stesso metabolismo, infatti diversi studi hanno dimostrato che l'enantiomero S, occupando il sito della LipDH, può inibire la riduzione dell'altro enantiomero.

Un altro evento metabolico dell'acido lipoico è quello relativo alla ossidazione della catena dell'acido pentanoico. Nel batterio *Pseudomonas putida* l'acido bisnorlipoico, l'acido tetranorlipoico e l'acido β -idrossibisnorlipoico sono stati identificati come i principali metaboliti della β -ossidazione^[26] (figura 2.3).

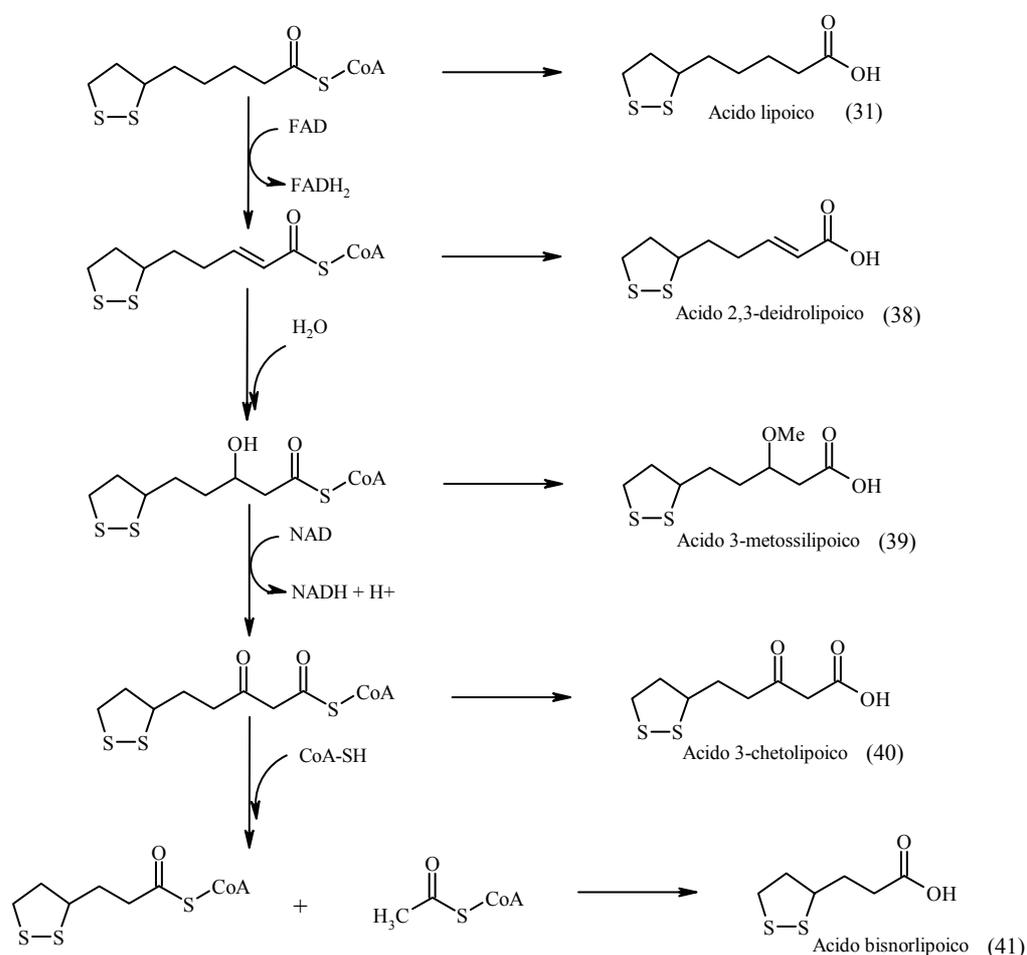


Figura 2.3 - Principali metaboliti della β -ossidazione dell'acido lipoico

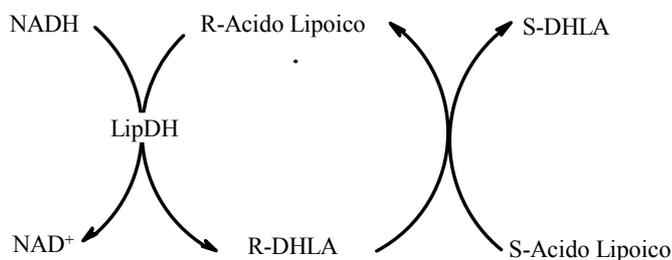
Metodi di analisi con molecole detector, quali l'acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), l' α_1 -antiproteasi (α_1 -AP) o l'albumina serica bovina (BSA), il citocromo

²⁶ H.C. Furr, H.H.Chang and D. B McCormick, *Arch. Biochem. Biophys.* (1978); **185**:576-583

C, l'acido salicilico, la tirosina hanno dimostrato che anche questi metaboliti dell'acido lipoico manifestano delle buone capacità antiossidanti.^[27]

2.2.4 Attività endogena

LA gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo di cellule eucariotiche e procariotiche. E' coinvolto in differenti complessi multienzimatici quali la piruvato deidrogenasi, α -chetoacidi deidrogenasi e il complesso della glicina decarbossilasi. Il suo gruppo carbossilico è legato covalentemente attraverso un legame ammidico agli ϵ -ammino gruppi di una specifica lisina presente sulla subunità diidrolipoammide acil transferasi (E₂) del complesso piruvato deidrogenasi, e alla proteina H del complesso glicina decarbossilasi^[28]. La sua funzione è quella di legare i gruppi acilici e di trasferirli da una parte all'altra del complesso enzimatico. In questo processo l'acido lipoico si riduce ad acido diidrolipoico (DHLA), che è successivamente riossidato dalla lipoammide deidrogenasi (Lip-DH) con la formazione del NADH. In particolare l'acido lipoico e la sua forma ridotta agiscono come coppia redox, trasferendo elettroni dalla deidrogenasi al NAD⁺ ^[3] (schema 2.2).



Schema 2.2

Per questo suo ruolo può influenzare la velocità di ossidazione del glucosio. Nel 1970 è stato osservato che l'acido lipoico incrementa il reuptake del glucosio indotto da insulina^[29]. Per questo si pensa ad una applicazione futura dell'acido lipoico nel diabete.

²⁷ Ph.Gerreke, Biewena, R.M.M. Haenen and Aalt Bast, *Gen. Pharmac.* (1997); **3**: 315-331.

²⁸ P. Reche, R.N. Perham, Structure and selectivity in post-translational modification: attaching the biotinyl-lysine and lipoyl-lysine swinging arms in multifunctional enzymes, *EMBO J.* (1999); **18**: 2673-2682

²⁹ N.Haugaard, E.Haugaard, *Biochem.Biophys.Acta.* (1970); **222**: 583.

2.2.5 Attività antiossidante

Generalmente la capacità antiossidante di un composto può dipendere da vari fattori, quali la specificità verso i radicali liberi, l'interazione con altri antiossidanti, l'attività di chelare i metalli, e la capacità di riparare i danni ossidativi. Ovviamente un antiossidante ideale dovrebbe soddisfare i criteri sopraelencati. La coppia redox LA/DHLA si avvicina molto alla condizione di idealità e può essere considerata un "antiossidante universale"^[30].

2.2.5.1 Attività scavenger

L'acido lipoico e il DHLA sono composti più facilmente ridotti e ossidati rispetto ai monotioili. Ciò può risultare dall'attivazione di reazioni di interscambio di SH - S-S, dal momento che il valore del potenziale standard redox della coppia di DHLA e LA è più negativa rispetto alla coppia ridotta/ossidata del glutatione (GSSG/GSH) e della coppia cisteina/cistina (CSSC/CSH). A causa del potenziale redox il DHLA può ridurre il GSSG a GSH e CSSC a CSH, ma il GSH e il CSH non possono ridurre LA a DHLA. LA si è rivelato un moderato antiossidante, mentre il DHLA un buon antiossidante^[31]; in particolare è stata riportata la capacità del DHLA di inibire la perossidazione lipidica, ruolo comune agli altri tioili. Sia LA che DHLA eliminano i radicali idrossilici generati dal reagente di Fenton in fase acquosa. Comunque il DHLA a concentrazioni relativamente basse può manifestare delle proprietà pro-ossidanti, sia perché è in grado di ridurre il ferro, sia perché è capace di liberare specie radicaliche reattive contenenti zolfo. Tuttavia tale azione pro-ossidante potrebbe essere inibita nei sistemi fisiologici dall'interazione con altri antiossidanti. Gli effetti protettivi antiossidanti di DHLA contro la perossidazione possono effettivamente coinvolgere il ripristino di altri antiossidanti come il glutatione, l'ascorbato o il tocoferolo^[32].

L'efficienza antiossidante dell'acido lipoico e del DHLA è stata testata studiando le loro interazioni con tre tipi di radicali: (a) radicali perossilici, generati in membrana e in fase acquosa; (b) radicali cromossilici, derivanti

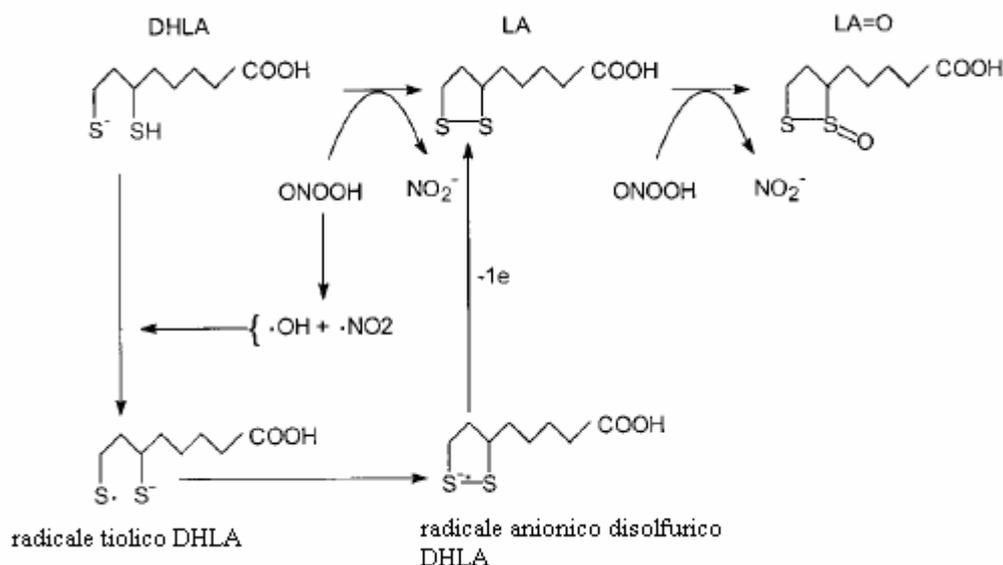
³⁰ F. Navari-Izzo, M.F. Quartucci, C. Sgherri, *Plant Physiol. Biochem* (2002); **40**: 463-470

³¹ V.E.Kagan, A.Shvedova, E.Serbinova, S.Khan, C.Swanson, R.Powell, L.Packer. *Biochem. Pharmacol* (1992); **44**: 1637-1649

³² A. Bast, G.R.M.M. Haenen, *Biochim. Biophys. Acta* (1988); **963**: 558-561.

dall' α -tocoferolo; (c) radicali ascorbici, generati dall'ossidazione dell'acido ascorbico. Sembra che l'acido lipoico non sia in grado di bloccare direttamente i radicali ossidrilici in entrambe le fasi, acquosa e lipidica^[33]; mentre il DHLA è capace di bloccare direttamente le specie radicaliche in entrambe le fasi senza alcuna necessità di glutazione o di tocoferolo.

LA e DHLA, oltre a limitare i danni indotti dai ROS, svolgono anche un ruolo fondamentale nell'inibizione dei radicali perossinitriti, che sono responsabili di varie patologie (patologie autoimmuni, neurodegenerative, infiammazione cronica). I perossinitriti si formano *in vivo* dalla reazione diffusione-controllata tra il nitrossido ($\cdot\text{NO}$) e il superossido ($\text{O}_2\cdot^-$)^[34]. L'eliminazione dei perossinitriti passa attraverso la reattività dei gruppi tiolici dell'acido diidrolipoico, che sono convertiti a ponte disolfuro o per ossidazione diretta o per ossidazione dipendente da radicali liberi. In tale reazione si ha quindi la formazione di acido lipoico, che può subire una seconda ossidazione ed essere convertito in un derivato tiosulfonico^[35]. Il meccanismo di reazione è mostrato con lo schema 2.3.



Schema 2.3 - Reazione della coppia LA/DHLA con perossinitriti

³³ B.C.Scott, O.I.Aruoma, P.E.J.Evans, A. van der Vliet, C.E. Cross, H. Tritschler, B. Halliwell, *Free Ra. Res.* (1994); **20**:119-133.

³⁴ R. Radi, A. Denicola, B. Alvarez, G. Ferrer Sueta, G., and H. Rubbo, *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (2000).

³⁵ M. Trujillo, R. Radi, *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2002); **397**: 91-98.

2.2.5.2 Attività chelante

L'attività antiossidante dell'acido lipoico contro i radicali idrossilici è dovuta anche alla sua capacità di chelare i metalli.

Sia l'acido lipoico che il DHLA formano in soluzione complessi stabili con i metalli di transizione e questo li rende capaci di eliminare i metalli pesanti dai sistemi biologici. Tuttavia anche nella chelazione dei metalli l'acido lipoico e l'acido diidrolipoico non sono completamente analoghi^[8]. L'acido lipoico può formare complessi con il Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e probabilmente il Fe^{2+} ^[16], ma non è in grado di chelare il Fe^{3+} ^[36], mentre il DHLA oltre al Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , e Hg^{2+} , può anche chelare il Fe^{3+} formando un complesso molto più stabile che con il Fe^{2+} . La loro capacità chelante è dovuta ai vicini atomi di zolfo e al gruppo carbossilico presenti nella struttura; quando i metalli sono in eccesso, possono prendere parte a reazioni di riduzione dell'ossigeno, catalizzando il trasferimento di elettroni da una specie di ossigeno ad un'altra, in reazioni come quella di Fenton. La chelazione dei metalli li rende inattivi, si ha così un effetto protettivo per inibizione dei processi ossidativi metallo-catalizzati.

Ad esempio, il complesso lipofilico LA- Cu^{2+} può proteggere i lipidi dalla perossidazione Cu^{2+} -indotta. DHLA può prendere parte alla stessa reazione chelando sia Cd^{2+} che Cu^{2+} ^[37]. Il DHLA può chelare il Cu^{2+} attraverso i gruppi tioli terminali. La chelazione ed il rilascio del rame è pH dipendente. A pH 6, il complesso Cu^{2+} / DHLA è molto stabile ed il rame non è rilasciato; a pH pari al pKa del gruppo carbossilico, il gruppo carbossilico è protonato e il complesso è formato mediante i gruppi tiolici. Quando il pH aumenta, il gruppo carbossilico si deprotona e può intervenire nella chelazione (figura 2.4).

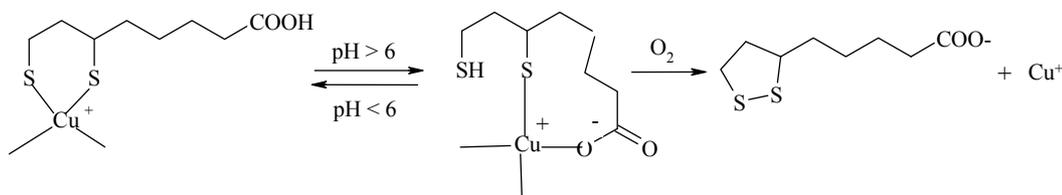


Figura 2.4 – DHLA chelante il rame

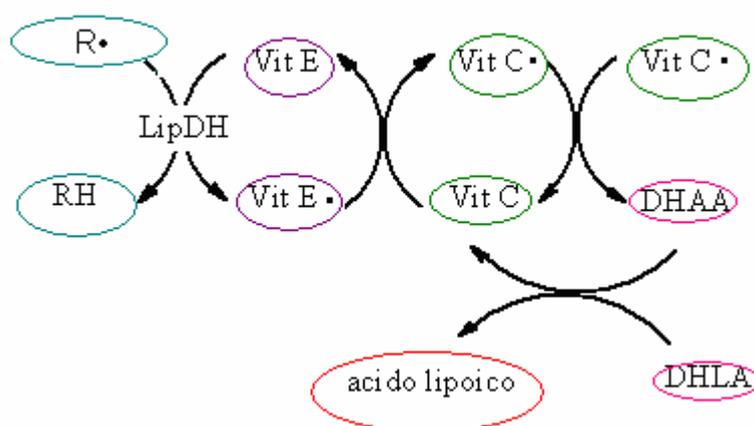
³⁶ U.Cornaro, F. Cariati and F.Bonomi, *Rev. Port. Quim.* (1985); **27**: 273-274.

³⁷ J.K. Lodge, M.G. Traber, L.Packer, *Free Rad. Biol. Med.*(1998); **25**: 287-297.

Inoltre, a seconda del rapporto $\text{Cu}^{2+}/\text{DHHA}$ e del pH, DHHA è capace di svolgere azioni diverse: quando il DHHA è in eccesso è in grado di chelare il Cu^{2+} , quando invece è il Cu^{2+} ad essere in eccesso, il DHHA lo inattiva riducendolo.

2.2.5.3 Rigenerazione di altri antiossidanti

Negli organismi aerobi, lo stress ambientale origina radicali liberi, che sono formati da un controllo improprio della riduzione dell'ossigeno. La rimozione delle specie di ossigeno attivato è efficace quando i prodotti ossidati formati sono rapidamente rigenerati o degradati. La più probabile funzione del glutathione e della vitamina C (acido ascorbico) è quella che si verifica nel ciclo vitamina C/glutathione. Tuttavia sia la vitamina C che il glutathione possono servire come mediatori tra la fase idrofila e quella lipofila per mantenere le proprietà antiossidanti dei sistemi protettivi localizzati sulla membrana. Come meccanismo principale, glutathione e vitamina C evitano la perossidazione lipidica attraverso la riduzione del radicale tocoferossilico a tocoferolo (vitamina E). La vitamina E è il principale antiossidante che interrompe la catena radicalica proteggendo le membrane dalla perossidazione lipidica.^[38] Comunque, la vitamina C e il glutathione agiscono come scavenger dei radicali tocoferossilici solo quando vi è un'efficiente rimozione delle loro forme ossidate (schema 2.4).



Schema 2.4 – Rigenerazione di antiossidanti endogeni per azione dell'acido lipoico

³⁸ T.F. Slater, *Biochemistry* (1984); **222**:1-15.

I radicali formati per rigenerare il tocoferolo sono di volta in volta rigenerati da equivalenti riducenti disponibili come NADPH in associazione con i loro specifici enzimi reduttasici. L'acido lipoico dopo la riduzione a DHLA, può contribuire a una rigenerazione non enzimatica di GSH e vitamina C.

Né LA né DHLA da soli mostrano un rilevante effetto protettivo sulla perossidazione lipidica indotta da Fe^{2+} /ascorbato, che invece è mostrato dalla combinazione di DHLA e di GSSG. L'effetto protettivo è dovuto alla capacità di DHLA di ridurre GSSG a GSH. Il verificarsi di riduzioni DHLA-mediate di radicali ascorbici suggerisce che DHLA può proteggere le membrane dall'ossidazione rigenerando l'ascorbato, il quale a sua volta rigenera il tocoferolo. Tale reazione è stata confermata dalla formazione di GSH e vitamina C^[39] in presenza di DHLA. Si è visto inoltre che DHLA fornisce una protezione contro la perossidazione lipidica microsomiale in presenza di vitamina E. In questo sistema DHLA potrebbe ridurre o direttamente i radicali tocoferossilici o il glutatione e l'ascorbato, che successivamente rigenerano il tocoferolo. La regolazione redox dello stato tiolico della cellula è di centrale importanza per l'attività cellulare, e l'accoppiamento rigenerante lipoile/diidrolipoile con GSSG può rappresentare un sistema alternativo alla glutatione-reduttasi.

La vitamina C è un essenziale antiossidante cellulare che normalmente viene rigenerato dalla sua forma ridotta (acido diidroascorbico o DHAA) dal GSH. In assenza di GSH, l'acido diidroascorbico non può essere riconvertito ad acido ascorbico, può piuttosto essere degradato. In queste condizioni il lipoato può ripristinare indirettamente il livello di ascorbato attraverso la riduzione di GSSG. Per questi motivi sebbene la concentrazione cellulare di LA sia molto più bassa rispetto a quella di altri antiossidanti sulfidrilici (come il GSH), è stato ipotizzato che una piccola quota di LA moduli cataliticamente lo stato di ossidoriduzione cellulare, accoppiando il livello NADH/NADPH al livello di GSH/GSSG.

L'acido diidrolipoico agisce su specifici siti nello spazio matriciale dei mitocondri dove sono presenti i complessi deidrogenasici soggetti ad essere attaccati da specie di ossigeno attivato. A causa del potenziale redox della coppia LA/DHLA e alla loro capacità di agire sia nel citosol che nella regione lipidica,

³⁹ G.R.M.M. Haenen, A.Bast, *Modulation of microsomal lipid peroxidation by dihydrolipoate in interplay with vitamine E, C and Glutathione* (1989); 137-153

l'acido diidrolipoico può ridurre GSSG senza richiedere equivalenti riduttivi dal NADPH così come fa la glutatione reduttasi. Ciò assume un particolare significato in condizioni di stress ossidativo, soprattutto se lo stato di ossidoriduzione delle cellule è compromesso e la riserva di NADPH è ridotta^[10].

2.2.6 Derivati dell'acido lipoico

Conosciuta l'attività antiossidante dell'acido lipoico, molti studiosi hanno sperimentato derivati e analoghi con buone potenzialità. I derivati che si possono preparare mantenendo inalterate le proprietà strutturali dell'agente antiossidante, sono sistemi legati tramite formazione di legami ammidici o esterei al gruppo carbossilico dell'acido lipoico^[40].

2.2.6.1 Sintesi di nuovi antiossidanti 1,2ditiolani

Derivati dell'acido lipoico sono stati sintetizzati mediante reazione dell'acido lipoico e il ciclo morfolinico N-alchilsostituito, attraverso la formazione di un legame tioammidico o tiocarbammico (Z) (figura 2.5).

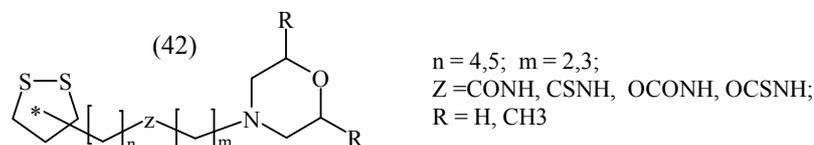
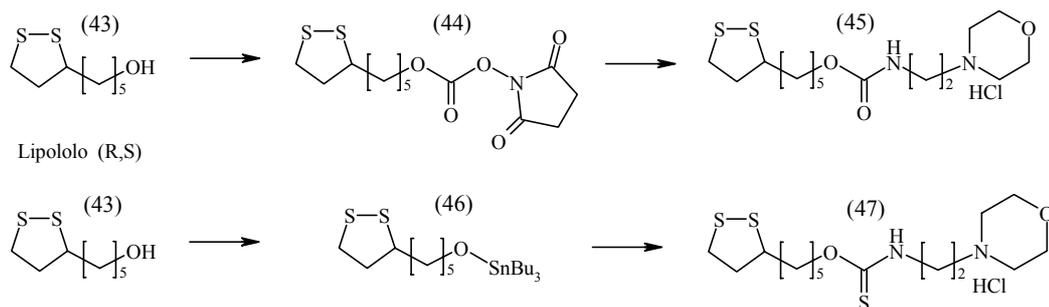


Figura 2.5 – Derivati morfolinici dell'acido lipoico

Altri derivati possono essere ottenuti utilizzando come reagente iniziale il (R,S) lipololo, ottenuto dalla riduzione dell'acido lipoico. Il lipololo è stato utilizzato per la sintesi di derivati carbammaci e tiocarbammaci (schema 2.5).

⁴⁰ C.Anselmi, M.Centin, P.Granata, A.Sega, A.Buonocore, A.Bernini, R.Maffei Facino, *J. Agric. Food Chem.* (2004); **52**: 6425-6432.



Schema 2.5 - Sintesi di derivati carbammici e tiocarbammici dell'acido lipoico

Sono stati sintetizzati altri composti analoghi, che differiscono solo per il numero degli atomi di carbonio. Dei composti descritti è stata valutata l'attività antiossidante mediante il saggio della perossidazione lipidica. Tutti mostrano una buona e a volte maggiore % di inibizione rispetto all'acido lipoico. La diversa attività antiossidante di tali derivati è dipendente dal tipo di legame formato tra il gruppo lipoilico e altri gruppi; ad esempio, la tioammide presenta una % di inibizione maggiore dell'ammide; i tiocarbammati maggiore dei carbammati. In generale i nuovi composti mostrano in vivo profili farmacologici superiori dello stesso acido lipoico^[41].

2.2.6.2 Analoghi inibitori della NOS

Consistono nel legame chimico tra l'acido lipoico o strutture omologhe e un inibitore selettivo neuronale della nitrossido sintetasi (nNOS) (figura 2.6)

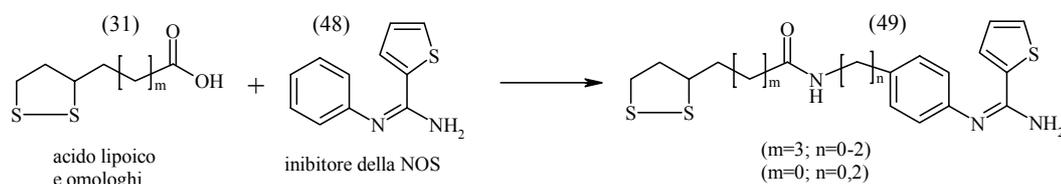


Figura 2.6 – Derivati lipoilici con attività d'inibizione della NOS

⁴¹ C.Guillonau, Y.Charton, Y-M.Ginot, M-V.Fouquier-d'Hèrouel, M.Bertrand, B.Lockhart, P.Lestage, S.Goldstei. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2003); **38**: 1-11.

I composti così ottenuti sono stati valutati in vitro per la loro capacità di inibire la nNOS attraverso la misura del loro effetto sulla conversione dell' [^3H] L-arginina in [^3H]L-citrullina^[42]. I derivati dell'acido lipoico mantengono l'attività dell'inibitore nNOS ed hanno simili valori di IC_{50} allo stesso mentre l'acido lipoico da solo è inattivo^[43].

2.2.6.3 Nuovo derivato dell'acido lipoico: PNLP

È stato sintetizzato un nuovo antiossidante anfifilico chiamato PNBLP, un ibrido di acido lipoico e di α -fenil-N-terbutil-nitrone (PNB) (figura 2.7).

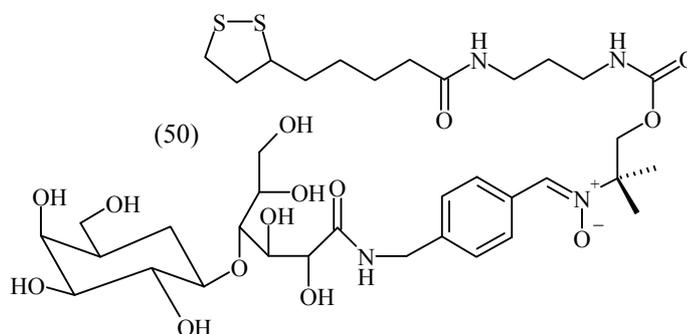


Figura 2.7 – Derivato anfifilico dell'acido lipoico

Floyd e altri^[44], furono i primi a dimostrare che il PNB presenta un'attività neuroprotettiva.

In questo caso la funzione nitronilica è inserita nel cuore di un tensioattivo tra la coda lipofila e la testa polare. Mentre la porzione idrofobica è rappresentata dal gruppo lipoico, la testa polare è formata da una lactobionammide legata in posizione para del nucleo benzenico del PBN.

L'attività antiossidante del PNBLP è stata valutata e comparata a quella dei due precursori mediante il test biologico basato sull'emolisi^[45] indotta da radicali liberi formati dalla decomposizione termica di una soluzione del 2,2'-azobis(2-

⁴² D.S.Bredt, S.H.Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990); **87**: 682.

⁴³ J. J. Harnett, M.Auguet, I.Viossat, C.Dolo, D.Biggs and P.E.Chabrier, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2002); **12**: 1439-1442.

⁴⁴ R.A.Floyd, K.Hensley, M.J. Forster, J.A.Kelleher-Andersson, P.L.Wood. *Mech. Aging De.* (2002); **123**: 1021.

⁴⁵ J.Kumagai, T.Kawura, T.Miyazaki, M.Prost, E.Prost, M.Watanabe, J.Quetin-Leclere. *Radiat. Phys. Chem.* (2002); **66**: 17.

amidinopropano)diidrocloreuro (AAPH). In un grande range di concentrazioni, il nuovo composto esibisce una più alta attività protettiva contro l'aggressione da radicali liberi rispetto ai precursori immoificati.

2.3 Acido ferulico

L'acido ferulico è un composto fenolico ubiquitario in natura, che deriva dal metabolismo della fenilalanina e della tirosina, presente, sotto forma esterea, soprattutto nella crusca del riso^[46]. Nelle piante abbonda nelle foglie e nei semi sia sottoforma libera che legato covalentemente alla lignina e ad altri biopolimeri. Anche molti microrganismi sono in grado di metabolizzare l'acido ferulico, in particolar modo alcuni possono utilizzarlo come unica fonte di carbonio e di energia. Il suo nucleo fenolico e la sua catena laterale coniugata gli permettono di formare rapidamente un radicale stabilizzato per risonanza, che spiega il suo elevato potere antiossidante e le sue capacità fotoprotettive. Il composto, oltre a trovare largo impiego come additivo alimentare, per la sua capacità di inibire l'autossidazione degli oli ^[47,48], costituisce un ingrediente attivo in molte lozioni della pelle e viene frequentemente utilizzato come schermo solare per i suoi effetti fotoprotettivi^[49,50]. Studi epidemiologici, inoltre, hanno fornito prova che un alto consumo di alimenti che ne sono particolarmente ricchi, come grano, riso e mais, può ridurre il rischio di malattie croniche, quali patologie cardiovascolari e alcune forme di cancro^[51]. Recentemente è stato riportato che l'acido ferulico e i composti ad esso correlati quali l'acido p-cumarico, l'acido caffeico e l'acido sinappico, sono in grado di inibire l'autossidazione del metil linoleato e dell'acido linoleico così come l'ossidazione di liposomi indotta dall'iniziatore idrosolubile 1,1 difenil-2-picrilidazile (DPPH). Ai composti fenolici naturali viene anche attribuita la capacità di aumentare l'efficienza antiossidante della lattoferrina nell'inibire l'ossidazione dei liposomi e delle emulsioni olio in acqua; inoltre

⁴⁶ E.Graf, *Free Radical Biology Medicin* (1992); **13**: 435-448.

⁴⁷ S.C.Dziedzic, B.J.F.Hudson, *Food Chemistry* (1984); **14**: 45-51.

⁴⁸ M.ZCho, T.B.Kwon, S.K.Oh, Antioxidant effect of some phenolics on soybean oils. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*, (1989); **32** :37-43

⁴⁹ M.Egawa, K.Ishida, M.Maekawa, Y.Sato, Skin preparation containing antioxidants and ellagic acids. (1990); **89**: 50-118.

⁵⁰ OCourtin, *Moisturizing cosmetic comprising liquid crystals*, (1990); **88**: 8880.

⁵¹ E.Niki, H.Ohigashi, T.Osawa, J.Terao, S.Watanabe, T.Yioshikawa, *In Food factors for Cancer prevention* (1997); 55-57.

l'acido ferulico incrementa l'attività antiossidante del plasma e la resistenza delle proteine a bassa densità LDL ad ossidarsi.

2.3.1 Struttura e proprietà ^[28]

L'acido ferulico è il nome comune dell'acido 3-4-(idrossi-3-metossifenil)-2-propenico. Altri nomi includono l'acido 3-metossi-4-idrossicinnamico, l'acido caffeico 3-metil etere e l'acido coniferico. Le piante producono l'acido isoferulico o acido 3-idrossi-4-metossi cinnamico. L'acido ferulico isolato nelle piante esiste anche come isomero *trans*. La risoluzione della struttura è stata suggerita mediante spettroscopia NMR C^{13} successivamente confermata anche mediante cristallografia ai raggi X. Durante la conservazione in acqua dell'acido ferulico *trans* o *cis* a temperatura ambiente è risultata una lenta isomerizzazione intorno alle due settimane fino ad una situazione di equilibrio del 23% della forma *cis* e del 77% della forma *trans*.

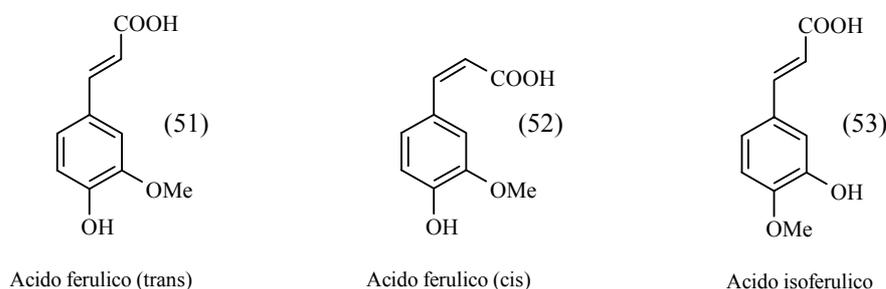


Figura 2.8 – Isomeri strutturali e configurazionali dell'acido ferulico

L'acido *cis*-ferulico non è in forma di cristalli, ma è un olio giallo che in etanolo assorbe all'UV alla lunghezza d'onda di 316 nm, mentre i cristalli dell'acido *trans*-ferulico si possono ottenere per cristallizzazione da acqua calda. Il suo peso molecolare è di 194 e il suo punto di ebollizione è a 174°C. E' solubile in etanolo, acetato di etile, acqua calda, moderatamente in etere etilico e scarsamente solubile in benzene e in etere di petrolio.

L'acido ferulico è un forte acido dibasico. La prima dissociazione protonica produce l'anione carbossilato; la seconda dissociazione genera un anione fenolato.

L'alto grado di stabilizzazione di risonanza dell'anione fenolato attraverso l'intera molecola coniugata aumenta notevolmente la sua acidità relativa, rispetto agli altri acidi fenolici simili. L'acido ferulico assorbe fortemente nel range UV con assorbimento massimo 284 nm a 370 nm in soluzione acquosa a pH 6, e mostra anche una forte fluorescenza^[52].

È pressochè stabile quando è disciolto in solventi organici, tuttavia in alcune condizioni può subire modificazioni chimiche, per esempio in acqua può formare il 4-vinil guaiacolo per lenta decarbossilazione termica, mentre il ferro catalizza la sua ossidazione a dilattone.

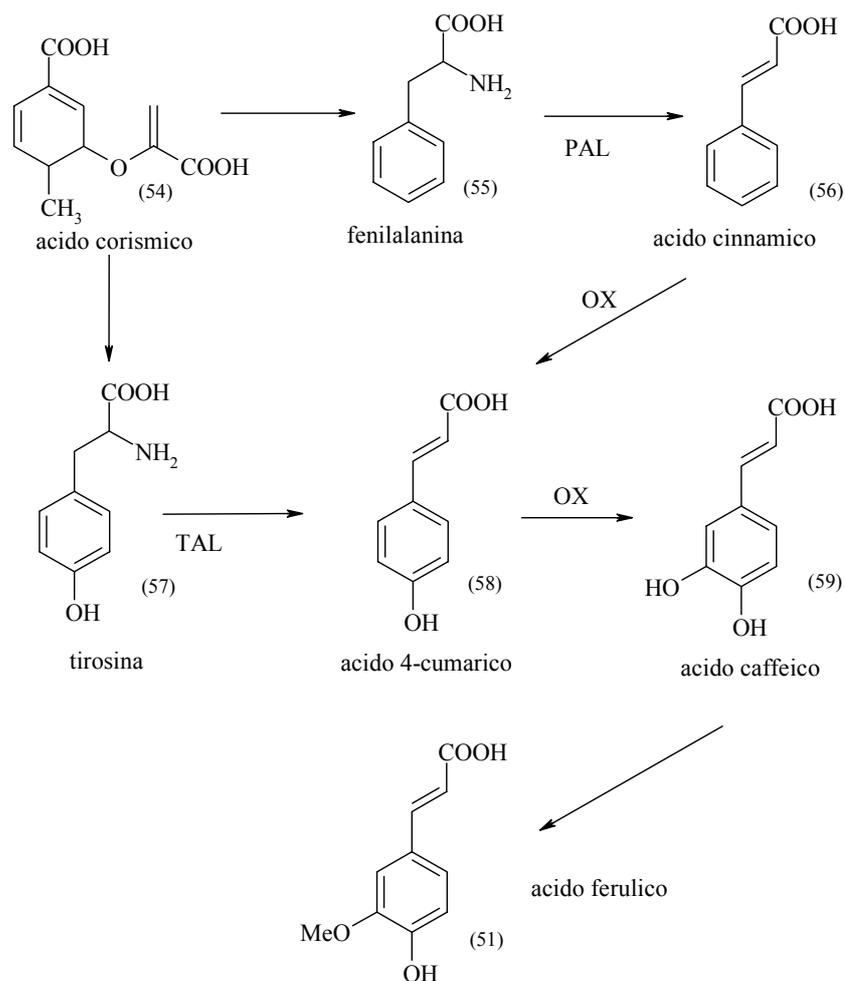
2.3.2 Biosintesi

In natura l'acido ferulico è sintetizzato a partire dall'acido scikimico (schema 2.6). La via dello scikimato^[53] prevede innanzitutto la formazione dell'acido corismico dal quale si ottengono sia la tirosina che la fenilalanina. Dai due amminoacidi si ottiene la formazione dell'acido 4-cumarico per vie diverse; la tirosina ad opera dell'enzima tirosina ammoniacasi (TAL) è convertita ad acido 4-cumarico, mentre la fenilalanina è convertita dapprima ad acido cinnamico dall'enzima fenilalanina ammoniacasi (PAL) e successivamente ad acido 4-cumarico attraverso un'ossidrilazione. Una successiva ossidrilazione dell'acido 4-cumarico produce l'acido caffeico, un composto con proprietà chimiche ed antiossidanti simili all'acido ferulico, nonché suo precursore; infatti la metilazione dell'ossidrile in meta converte l'acido caffeico in acido ferulico (schema 2.6). Negli organismi l'acido ferulico può non essere completamente libero, ma legarsi attraverso un legame estereo ad altre molecole, principalmente zuccheri come il galattosio e l'arabinosio. L'acido ferulico è successivamente liberato per scissione del legame estereo da specifici enzimi, le esterasi feruliche (FAE-A)^[54].

⁵² F.Wolf, *Advan Front. Plant* (1968) 169-172.

⁵³ T.W.Fenton, M.M. Mueller, *J. Chromat.* (1978) **152**: 517-522.

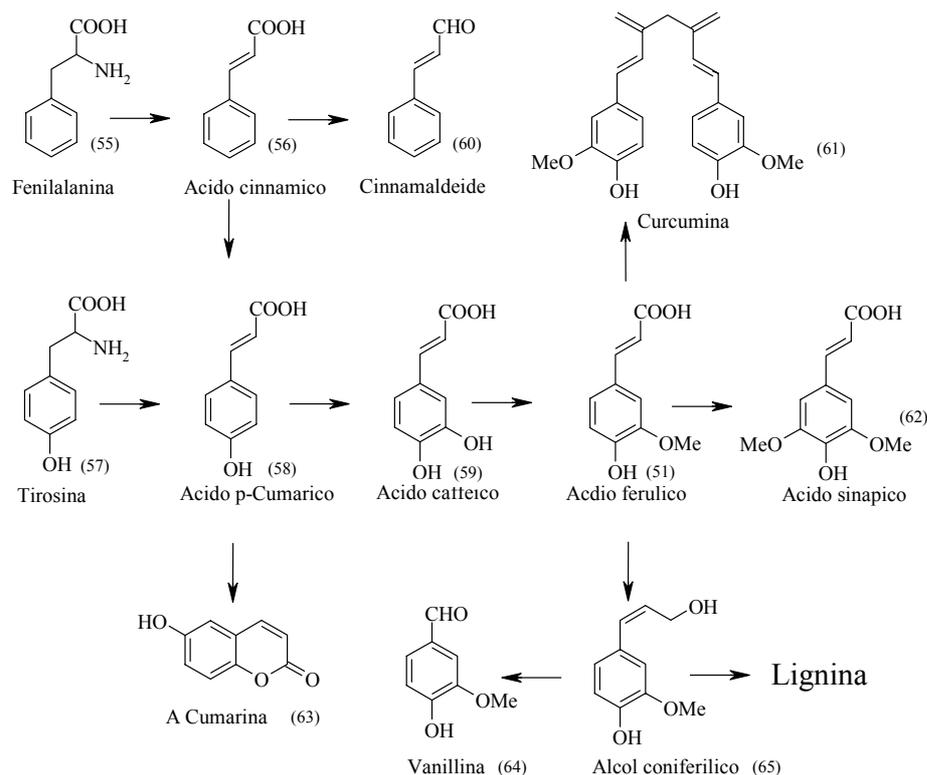
⁵⁴ A.Andersen, J.Svendsen, J.Vind, S.F.Lassen, C.Hjort, K.Borch, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2002); **26**:47-55.



Schema 2.6 – Biosintesi dell'acido ferulico

2.3.3 Metabolismo

Il principale sistema biosintetico dell'acido ferulico è presente nelle piante. Le reazioni sono avviate da fenilalanina e tirosina ammonio liasi, due enzimi vegetali che convertono la fenilalanina in trans-cinnamato e la tirosina in p-cumarato. L'acido ferulico deriva dall'acido cumarico per idrossilazione, seguita dall'introduzione del gruppo metilico fornito dalla metionina dell'S Adenosil L-metionina, catalizzata dall'acido caffeico 3-O-metil transferasi. L'ossidazione seguita da metilazione comporta la formazione di derivati del cinnamato con funzioni di- e tri-idrossiliche; questi composti diventano materiale di partenza per la formazione di lignina)^[28] (schema 2.7).



Schema 2.7 – Biosintesi della lignina dall'acido ferulico

La formazione della lignina è stata studiata seguendo il percorso biochimico dell'acido ferulico marcato con trizio, e degli analoghi marcati con C¹⁴ o fluoro. La degradazione ossidativa dell'acido ferulico porta alla formazione di vanillina e guaiacolo. Altre alterazioni che si verificano sulla catena laterale propenoica potrebbero produrre classi addizionali di composti con struttura fenilpropanoide come ad esempio i flavonoidi.

Altri composti sono stati riconosciuti quali metaboliti dell'acido ferulico, come il metil-ferulato, che si trova nell'olio di riso, e l'acido 5-idrossi-ferulico, ritrovato in *zea mais* e *hordeum vulgare*.

2.3.4 Attività antiossidante

È noto che l'attività antiossidante dell'acido ferulico è data sia dalla sua capacità di stabilizzare direttamente specie radicaliche attraverso la sua struttura fenolica, sia di bloccare reazioni di ossido riduzioni ferro-catalizzate

coordinandosi al metallo con gli atomi di ossigeno presenti nei suoi gruppi funzionali ossidrilico e metossilico.

2.3.4.1 Attività scavenger

L'acido ferulico provvede al 70,9% dell'inibizione in vitro della perossidazione lipidica del cervello dei ratti come determinato dalla generazione della malondialdeide.

L'acido caffeico era mille volte più efficace, mentre l'acido cinnamico non ha affatto attività antiossidante. Una simile relazione era stata osservata durante l'ossidazione di Ghee^[55], come dimostrato nella figura 2.9.

Il potenziale antiossidante aumenta con il numero di idrossili fenolici, infatti è più potente l'acido caffeico e più debole l'acido cinnamico. In contrasto con questi risultati, un recente articolo ha riportato che l'acido ferulico, diversamente dall'acido p-cumarico e dall'acido caffeico, ha attività scavenger sull'anione superossido e ne inibisce la perossidazione lipidica^[56]. L'effetto è simile a quello della superossido dismutasi (SOD). Si è osservato che l'idrossilazione dell'acido cinnamico provoca un enorme aumento del potenziale antiossidante, infatti, mentre l'acido cinnamico ha poca attività, l'acido cumarico e l'acido ferulico sono fortemente attivi sia nei tessuti del cervello che nell'ossidazione di Ghee.

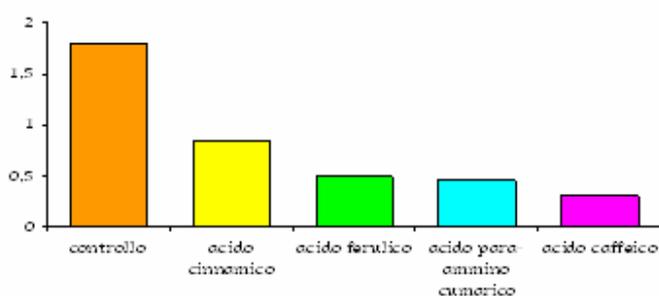


Figura 2.9 –Inibizione della perossidazione lipidica dell'acido ferulico e composti analoghi

⁵⁵ S.Gupta, P.S.Sukhija, I.S.Bhatia, Role of phenolics and phospholipids as antioxidants for Ghee. (1979); **34**: 205-206.

⁵⁶ S.Toda, M.Kumura, M.Ohnishi, *Planta Medica* (1991); **57**:8-10.

Da questa osservazione è evidente che il potenziale antiossidante dell'acido ferulico è derivato dalla sua abilità di seguire un meccanismo di reazione radicalica a catena. Alcuni radicali reattivi, collidendo con l'acido ferulico, strappano facilmente un atomo di idrogeno formando un radicale fenossilico (figura 2.10)^[57].

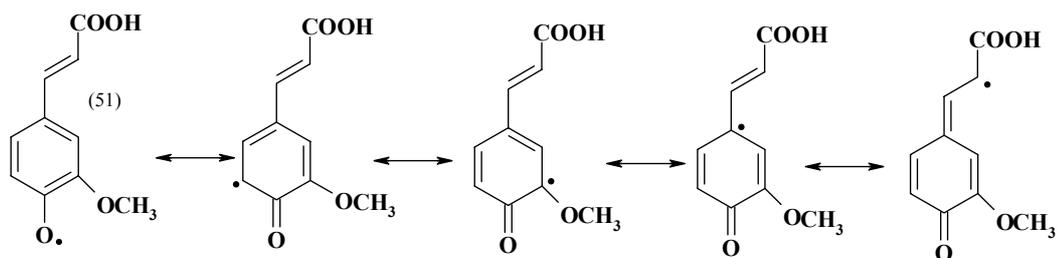


Figura 2.10 - Stabilizzazione per risonanza del radicale dell'acido ferulico

Questo radicale è fortemente stabilizzato per risonanza in quanto l'elettrone spaiato, non solo può essere presente sull'ossigeno, ma può essere localizzato sull'intera molecola. Una stabilizzazione di risonanza supplementare del radicale fenolico è dovuta inoltre alla presenza di una catena laterale insatura. La stabilizzazione per risonanza, oltre a permettere la formazione dello stesso radicale ferulico, ne inibisce una conseguente. Pertanto tale radicale è incapace di avviare o propagare una reazione radicalica, ma il suo destino più probabile è una collisione e condensazione con un altro radicale, per esempio un altro radicale fenossilico con il quale potrebbe dimerizzare a curcumina. Tale accoppiamento può portare alla formazione di una gamma di prodotti, che mantengono ancora gruppi ossidrilici liberi capaci di bloccare radicali. Sia il cloruro di tionile che l'ossalil cloruro catalizzano una sua rapida policondensazione a poli(acido ferulico).

La presenza di un secondo gruppo ossidrilico fenolico cambia sostanzialmente la sua attività antiradicalica, dovuta alla stabilizzazione per risonanza e alla formazione dell'o-chinone.

L'allontanamento di un atomo di idrogeno dall'acido caffeico forma uno stabile radicale fenossilico che può facilmente cedere un altro atomo di idrogeno e

⁵⁷ H.Kikuzaki, M.Hisamoto, K.Hirose, K. Akiyama, *J. Agric. Food Chem.* (2002); **50** : 2161-2168.

riarrangiare a o-chinone. Ogni allontanamento di un H• porta alla terminazione di una reazione radicalica a catena. Pertanto la mancanza dell'attività scavenger dell'acido caffeico sembra essere in contrasto col meccanismo radicalico proposto.

La metossilazione dell'acido p-cumarico, che porta alla formazione dell'acido ferulico, in qualche modo destabilizza il radicale fenossilico e diminuisce leggermente il suo potenziale antiossidante. Ciononostante grazie al suo gruppo ossidrilico e alla sua catena laterale insatura, l'acido ferulico è un efficace scavenger di radicali. L'acetilazione dell'acido ferulico riduce maggiormente la sua attività antiossidante. Ciò conferma il meccanismo discusso precedentemente, nel quale una reazione radicalica a catena termina con l'estrazione di un atomo di idrogeno dal gruppo ossidrilico fenolico, poiché si forma un radicale fenossilico stabilizzato per risonanza.

2.3.4.2 Attività chelante

Nelle emulsioni e in sistemi biologici costituiti da membrane idrofobiche, gli agenti chelanti possono ulteriormente agire come antiossidanti attraverso la chelazione dei metalli. In particolare l'inibizione delle reazioni catalizzate dagli ioni ferro nei substrati lipidici può effettivamente ridurre il grado di ossidazione in situ. La presenza del gruppo ossidrilico e carbossilico fa dell'acido ferulico un ottimo candidato per la chelazione del ferro^[58]. Tuttavia l'acido ferulico, essendo una molecola planare, non è in grado di occupare tutti i siti di coordinazione del ferro, infatti aggiungendo un'opportuna quantità di ferro in NaHCO₃ a pH 8 si osserva l'immediata formazione di un precipitato corrispondente all'idrossido di ferro. In realtà la chelazione del ferro avviene soltanto se più molecole di acido ferulico occupano i suoi siti di coordinazione. Se sono presenti delle molecole di acqua, queste possono partecipare alla coordinazione, intervenendo, però, nelle reazioni di ossido-riduzione ferro-dipendenti, infatti il Fe³⁺ può ossidare l'acido ferulico a dilattone. Anche i lantanidi pesanti possono formare complessi con l'acido ferulico^[29]. Da tutto ciò si deduce che l'azione antiossidante dell'acido ferulico è principalmente dovuta alla stabilizzazione dei radicali liberi e alla sua

⁵⁸ E.Graf, J.W.Eaton, *Free Radical Biology and Medicin* (1990); **8**: 61-69.

abilità di prevenire gli effetti dannosi delle radiazioni UV piuttosto che alla sua capacità chelante.

2.3.5 Derivati feruloilici

Come per l'acido lipoico, anche per l'acido ferulico si è dimostrato che derivati feruloilici, formati per reazione del gruppo carbossilico, mantengono una buona attività antiossidante^[21]. Un esempio è dato da due derivati dell'acido ferulico isolati dai rizomi di *Eremostachys Glabra*, l'esacosil-E-ferulato e il leucosceptoside A (figura 2.11), che presentano una buona attività antiossidante dimostrata mediante il saggio del DPPH^[59].

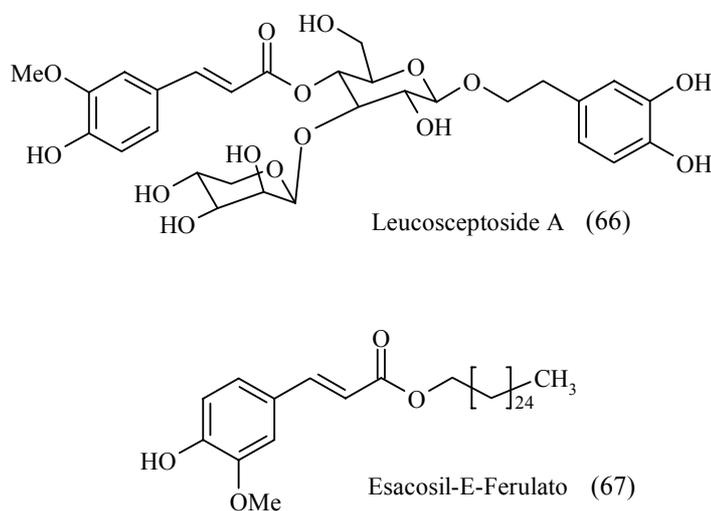


Figura 2.11 – Derivati attivi dell'acido ferulico

2.3.5.1 Sintesi di composti ammidici dell'acido ferulico^[60]

Sono stati sintetizzati vari composti ammidici a partire dall'acido ferulico usando diverse ammine, per sperimentare effetti stimolatori sulla secrezione di insulina. Molti di tali composti esibiscono una significativa promozione di rilascio dell'insulina a concentrazioni di 10 μ M e in particolare le ammidi contenenti gruppi quali l'n-butilico, n-pentile, pirrolidone e piperidina. Tali composti sono

⁵⁹ A.Delazar, M.Shoeb, Y.Kumarasamy, M.Byres, L.Nahar, M.Modarresi, S.D.Sarker, *Daru*, (2004); **12**(2).

⁶⁰ E.Nomura, A.Kashiwada, A.Hosoda, K.Nakamura, H.Morishita, T.Tsuno and H.Taniguchi, *Biorganic & Medicinal Chemistry* (2003); **11**: 3807-3813.

stati sintetizzati attraverso reazioni di condensazione del cloruro dell'acido p-acetil ferulico con varie ammine, seguite da deacetilazione (figura 2.12).

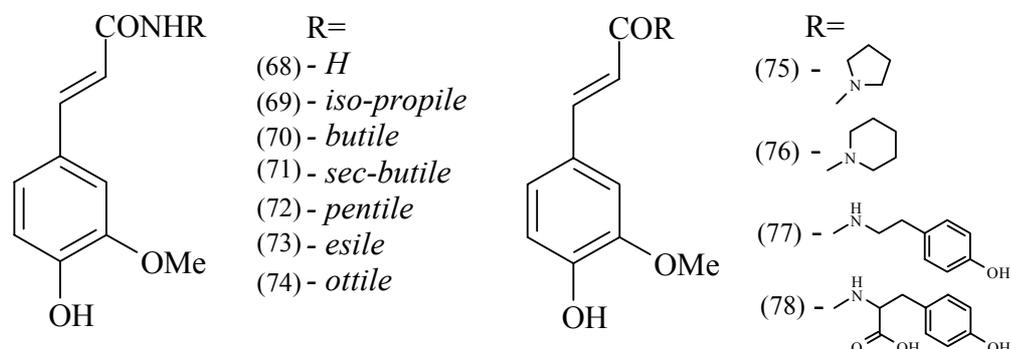


Figura 2.12 – Derivati ammidici dell'acido ferulico

2.3.5.2 Sintesi di derivati esterei dell'acido ferulico^[61]

Sono stati anche sintetizzati nuovi derivati in cui l'acido ferulico è legato al gruppo idrossilico di derivati del mio-inositolo 1,3,5-ortoformiato. Il feruloil-mio-inositolo sopprime l'attività promotrice della ciclossigenasi-2 (COX-2) in modo dipendente alle concentrazione.

È stata focalizzata l'attenzione su 7 derivati esterei formati da acido ferulico e mioinositolo (figura 2.13), e il loro effetto inibitorio della generazione dell'anione superossido indotta dal 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA).

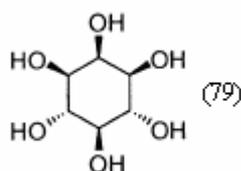


Figura 2.13 – Mioinositolo

In questi studi è stato dimostrato che solo l'3,4,5,6-tetra-O-acetil-1,2-di-O-[3-(4'-acetossi-3'metossipenil)-2-propenoil]-mio-inositolo mostra una distinta attività inibitoria. Questo suggerisce che sono essenziali 2 gruppi feruloilici.

⁶¹ A.Hosoda, Y.Ozaki, A.Kashiwada, M.Mutoh, K.Wakabayashi, K.Mizuno, E.Nomura and H.Taniguchi, *Biorganic & Medicinal Chemistry* (2002); **10**: 1189-1196.

CAPITOLO III

METODI DI DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE

3.1 Introduzione

È stata ormai appurata l'efficienza di molti metodi in vitro che valutano l'attività antiossidante. Il fatto che questi diversi metodi possano dare risultati differenti non sorprende, perché misurano diverse proprietà dell'antiossidante. Si possono distinguere metodi che valutano l'attività *scavenger*, altri la chelazione, la capacità d'inibire i processi di perossidazione lipidica e la capacità riducente.

3.2 Inibizione della Perossidazione lipidica

Negli ultimi 50 anni, la perossidazione lipidica è stata oggetto di numerosi studi per quel che riguarda il meccanismo, la dinamica, l'inibizione e gli effetti biologici. I lipidi sono ossidati attraverso 3 meccanismi distinti^[62]:

- Ossidazione enzimatica;
- Ossidazione non enzimatica mediata da radicali liberi;
- Ossidazione non enzimatica non mediata da radicali liberi.

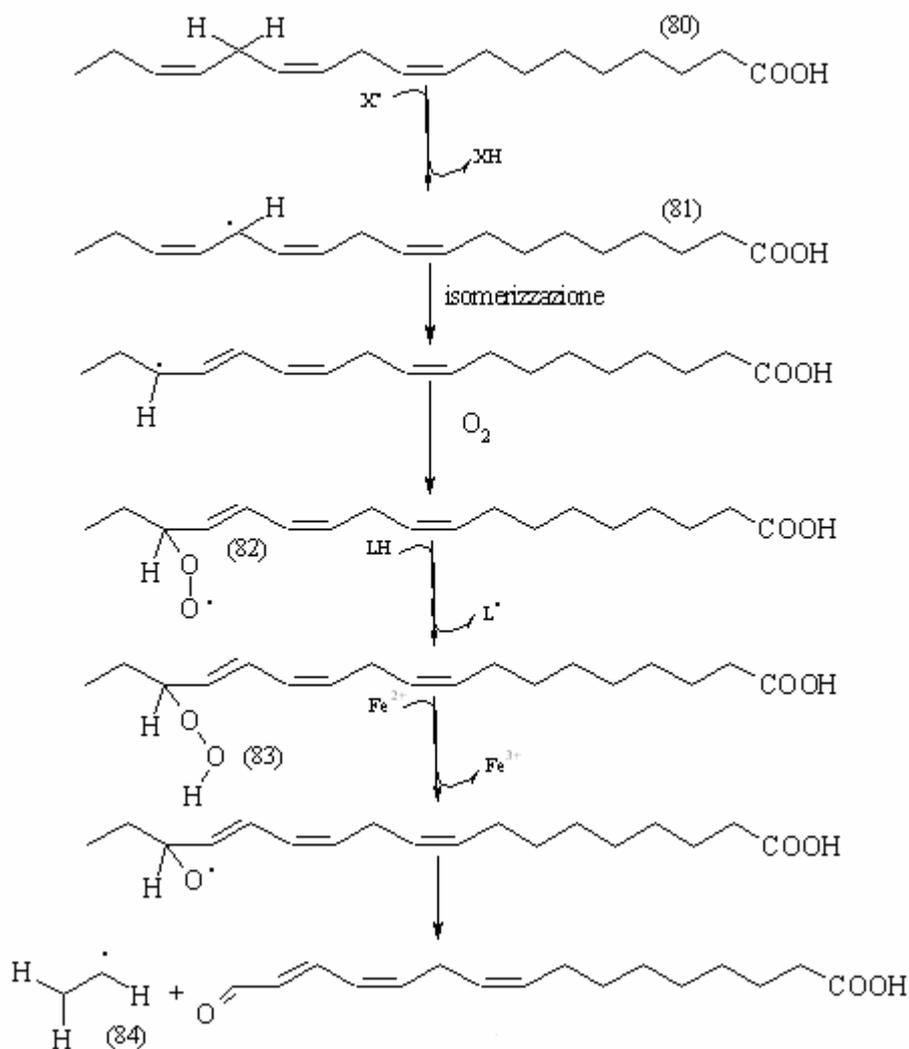
Gli acidi grassi poliinsaturi quali l'acido linoleico, linolenico e arachidonico presenti nei sistemi biologici in forma di esteri con fosfolipidi, trigliceridi e colesterolo sono maggiormente coinvolti in questo meccanismo ossidativo.

Nel primo passaggio un atomo di idrogeno è sottratto dall'acido grasso poliinsaturo (**80**) per l'azione dei ROS (X^*) generati nel sistema biologico ad opera di iniziatori radicalici o mediante reazioni catalizzate da metalli di transizione come ad esempio rame e ferro. Nel primo caso la presenza dell'AAPH

⁶² E.Niki, Y.Yoshida, Y.Saito, N.Noguchi, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005); **338**: 668-676.

o del TBOOH permette una costante produzione di radicali liberi, nel secondo l'azione dei metalli di transizione prevede un ciclo redox del metallo catalizzatore.

Il radicale alchilico (R^\bullet) (**81**) generato reagisce con l'ossigeno molecolare e forma un radicale perossilico (ROO^\bullet) (**82**) che può successivamente strappare un idrogeno da un'altra molecola di acido grasso (LH) generando l'idroperossido corrispondente (ROOH) (**83**) ed un nuovo radicale alchilico (L^\bullet) (**84**) (Schema 3.1). Queste ultime due reazioni a catena rappresentano la fase di propagazione della perossidazione lipidica. L'idroperossido si degrada successivamente in frammenti più piccoli: i radicali alcossilici e le aldeidi. L'esposizione delle cellule alle aldeidi può determinare inibizione della crescita, alterazione delle attività enzimatiche e inibizione della sintesi proteica. Questi effetti sono il risultato delle proprietà altamente nucleofile delle aldeidi che le rendono capaci di reagire con siti elettrofili quali i gruppi amminici e tiolici di enzimi e proteine.



Schema 3.1- Degradazione di idroperossidi (ROOH)

La valutazione dell'attività antiossidante, quale inibizione del processo di perossidazione lipidica, può essere effettuata attraverso diverse metodiche che prevedono l'uso di membrane microsomiali di ratto, di lipidi, quali l'acido linoleico o arachidonico e delle LDL come substrato target. La perossidazione può essere indotta da diversi iniziatori radicalici come l'AAPH, TBOOH, CuOOH ed enzimatici come la lipossigenasi e la cicloossigenasi.

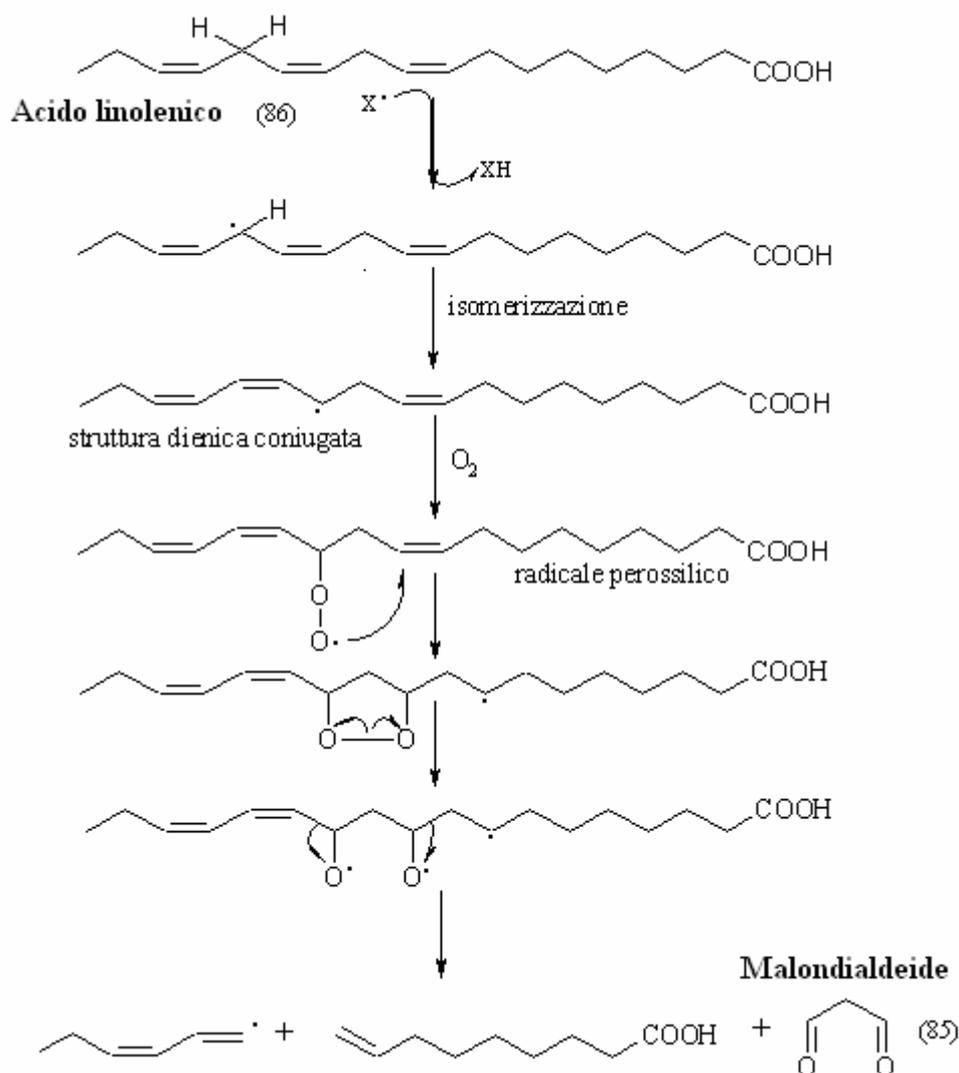
Vari tipi di antiossidanti inibiscono la perossidazione lipidica e gli effetti deleteri causati dai prodotti che si formano. A seconda del meccanismo determinante il processo perossidativo, l'azione degli antiossidanti verrà valutata diversamente.

L'inibizione dell'ossidazione lipidica enzimatica potrebbe essere determinata attraverso l'inibizione del processo di attivazione o della reazione di un enzima. La perossidazione lipidica indotta da radicali potrebbe essere bloccata attraverso l'inibizione della fase d'iniziazione o di propagazione della reazione a catena e/o accelerazione della fase di terminazione. La perossidazione lipidica indotta, infine, dall' $^1\text{O}_2$ potrebbe essere inibita bloccando la sua formazione, per esempio, schermando la luce ultravioletta.

3.2.1 Saggio con l'acido tiobarbiturico (TBA)

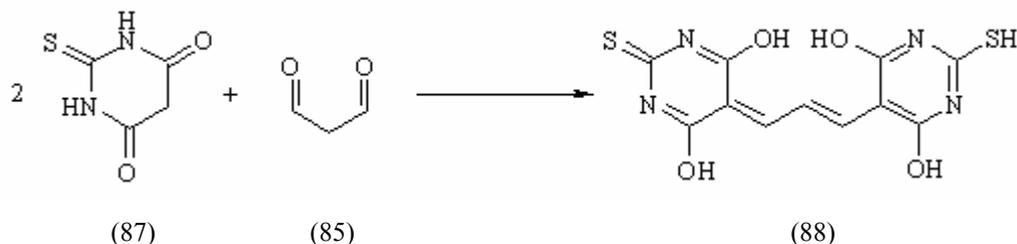
Uno dei metodi più accreditati per la valutazione dell'attività antiossidante dei composti è quello che prevede l'uso delle membrane microsomiali di fegato di ratto^[63]. Queste, costituite da fosfolipidi ad elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi, rappresentano il substrato ideale del processo di perossidazione lipidica. Durante tale reazione, infatti, gli acidi grassi vengono trasformati in metaboliti tossici come le aldeidi. In particolare la malondialdeide (**85**) (MDA) è generata in modo relativamente costante e rappresenta, quindi, un buon indicatore della velocità di perossidazione^[5]. La produzione di MDA dalla perossidazione dell'acido linolenico (**86**) è rappresentata nello schema 3.2.

⁶³ J.A.Buege, S.D.Aust *Methods Enzymol* (1978); LII: 302-310



Schema 3.2 – Produzione di malondialdeide dalla perossidazione lipidica

Per determinare la quantità di MDA, in vitro, si sfrutta la reazione con acido tiobarbiturico (87) che porta alla formazione di un addotto rilevabile (88), mediante spettrofotometria UV-VIS, alla lunghezza d'onda di 535 nm (schema 3.3).



Schema 3.3 – Formazione di un addotto cromoforo per reazione della malondialdeide con acido tiobarbiturico

3.2.2 Inibizione dell'ossidazione delle LDL ^[64,65] :TRAA

Un rapido e conveniente metodo per valutare la capacità d'inibire la perossidazione lipidica delle lipoproteine a bassa densità, è chiamato TRAA (abilità di attenuare i radicali tocoferossilici). Tale metodo si basa sulla capacità di un antiossidante di attenuare la reattività di radicali tocoferossilici generati da raggi UV che colpiscono micelle contenenti tocoferolo, misurata direttamente attraverso spettroscopia (ESRS). TRAA si avvale delle micelle caricate positivamente e negativamente per addizione dell' α -tocoferolo. Prevedendo l'uso della ESR è un metodo molto costoso.

3.2.3 Determinazione della attività antiossidante totale con tiocianato ferrico^[66].

Il metodo misura la quantità di perossidi prodotti durante lo stadio iniziale di ossidazione. Consiste nell'utilizzo di un'emulsione di acido linoleico contenente Tween20 e una soluzione di un tampone fosfato (pH=7). Questa soluzione è incubata a 37°C in recipienti di vetro. La quantità di perossidi è determinata mediante lettura spettrofotometrica a 500 nm dopo reazione con FeCl₂ e tiocianato (SCN⁻) a diversi intervalli. Durante l'ossidazione dell'acido linoleico, si formano i perossidi che determinano l'ossidazione di Fe^{II} a Fe^{III}.

Gli ioni secondari formano un complesso con il tiocianato e tale complesso presenta un massimo di assorbimento a 500 nm. La presenza di antiossidanti

⁶⁴ E.N.Frankel, J. Kanner, J.B.German, E.Parks, J.E.Kinsella. *Lancet* (1993); **341** : 454-7.

⁶⁵ M.Nardini, M. D'Acquino, G.Tomassi, V.Gentili, M.Di Felice, C.Scaccini. *Free Rad Biol Med* (1995); **19** : 541-52.

⁶⁶ H.Mitsuda, K.Yuasumoto, K.Iwami, Antioxidation action of indole compound during the autoxidation of linoleic acid *Eijo to Shokuryo* (1996); **19**: 210-214.

diminuisce i valori di assorbanza. La percentuale d'inibizione della perossidazione lipidica è calcolata tramite l'equazione:

$$\% \text{ In} = 100 - [(A_{\text{controllo}} / A_{\text{Campione}}) \times 100] \quad (\text{eq. 3.1})$$

Dove $A_{\text{controllo}}$ è l'assorbanza della reazione di controllo e A_{campione} è l'assorbanza del campione in presenza dell'antiossidante o dello standard.

3.2.4 β -Carotene Bleaching Test

Questo metodo si basa sull'ossidazione accoppiata del β -carotene e dell'acido linoleico. La tecnica consiste nella misurazione della decolorazione (bleaching) del β -carotene dovuta all'ossidazione causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico. L'aggiunta alla miscela di reazione (β -carotene e acido linoleico) di una sostanza antiossidante inibisce l'ossidazione del β -carotene e mantiene costante nel tempo i valori di assorbanza.

I campioni sono posti in un incubatore a 55°C e l'assorbanza è letta alla lunghezza d'onda di 470 nm dopo 60 e 120 minuti di incubazione.

L'attività antiossidante degli estratti è calcolata mediante un coefficiente, RAA (Relative Antioxidant Activities), che si ottiene in base alla seguente equazione:

$$\text{RAA} = \text{Assorbanza del campione} / \text{assorbanza del BHA} \quad (\text{eq. 3.2})$$

3.2.5 Emolisi indotta da CuOOH

Il metodo si basa sulla valutazione dell'effetto protettivo di molecole antiossidanti nei confronti del processo emolitico di una sospensione di eritrociti indotto da radicali liberi promossi da CuOOH. La scelta degli eritrociti come modello è dovuta al fatto che è un sistema cellulare completo che presenta caratteristiche simili ai microsomi epatici (alto contenuto di acidi grassi polinsaturi) ^[67].

Il processo emolitico è mediato da due fattori: 1) lipoperossidazione dei fosfolipidi di membrana; 2) ossidazione e degradazione di proteine

⁶⁷ T.M.Delvin, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation* (1997); 179-216.

citoscheletriche. L'agente citotossico lipofilo CuOOH , una volta insidiato nelle membrane, innesca la perossidazione lipidica che si propaga fino alle proteine del citoscheletro. Vi è perdita di stabilità e le membrane eritrocitarie vanno incontro a shock emolitico.

L'integrità cellulare è misurata turbidimetricamente a $710 \text{ nm}^{[68]}$ ogni 30 min. La percentuale emolitica è valutata considerando come 100% di emolisi il valore di assorbanza misurato dopo sonicazione delle sospensioni eritrocitarie per 5 min.

3.3 Metodi di determinazione dell'attività *scavenger*

3.3.1 Test del DPPH

Questo metodo prevede l'impiego di un composto radicalico, il 1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH) (figura 3.1). Tale metodo consiste nel misurare con uno spettrofotometro l'assorbanza di una soluzione etanolica o metanolica di DPPH, alla lunghezza d'onda di 517 nm con e senza l'aggiunta di un agente antiossidante a concentrazioni differenti. Normalmente il DPPH è di un colore viola ma l'aggiunta di un agente antiossidante ne determina la decolorazione.

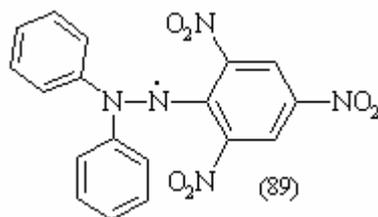
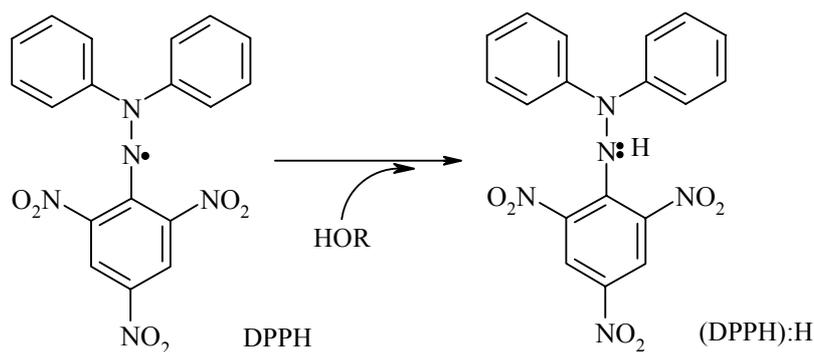


Figura 3.1 – DPPH

Il meccanismo di reazione prevede il trasferimento di un elettrone dall'atomo di azoto dell'antiossidante al radicale DPPH^{\bullet} con neutralizzazione del radicale e formazione di un'unità di antiossidante ossidato.

⁶⁸ M.Soszynski, A.Filipiak, G.Bartosz, I.Gencki, *Free Radical Biology Medicin* (1996); **20**: 45-52.



Schema 3.4 – Neutralizzazione del radicale DPPH^{*}

Nella forma radicalica, questa molecola ha un'assorbanza a 517 nm che diminuisce dopo acquisizione di un elettrone o idrogeno dal composto antiossidante per diventare una stabile molecola diamagnetica^[69].

Quello del DPPH è un semplice test di valutazione per soluzioni metanoliche di composti antiossidanti puri. La cinetica di reazione con gli antiossidanti segue tre differenti meccanismi^[70]: raggiunge rapidamente la stabilità, reagisce più lentamente raggiungendo la stabilità dopo 30 min, o reagisce lentamente andando a completezza dopo 6 ore circa. Generalmente, una molecola di antiossidante reagisce con 1-3 molecole di DPPH^[71]. Il saggio è semplice e si effettua a temperatura ambiente, evitando la degradazione termica delle sostanze .

3.3.2 Chemiluminescenza^[72]

Un metodo sensibile e semplice di valutazione dell'attività antiossidante è il metodo chemiluminescente. È basato sull'estinzione dipendente dalla concentrazione dell'antiossidante, della chemiluminescenza generata dai reagenti idroperossidi lipidici e isoluminolo/microperossidi. Questo metodo valuta l'attività antiossidante tramite la misura della concentrazione che determina il

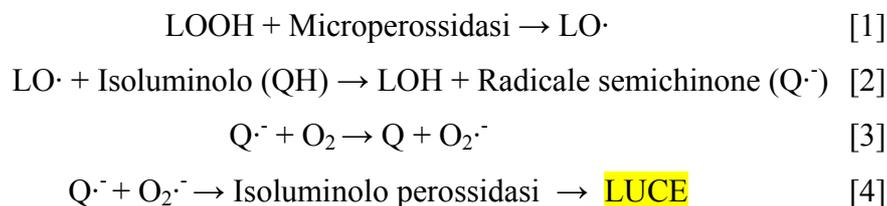
⁶⁹ I.Gucidlcin, *Toxicology* (2006); **217**: 213-220.

⁷⁰ D.M.Peterson, *Journal of Cereal Science*, (2001); **33**: 115-129.

⁷¹ W.Brand-Williams, M.E.Cuvelier, and C.Berset, *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie* (1995); **28**: 25-30.

⁷² O.Hirayama, M.Takagi, K.Hukumoto, and S. Katoh, *Analytical Biochemistry*, (1997); **247**: 237-241.

50% d'inibizione (IC₅₀). Il meccanismo^[73] di reazione degli idroperossidi lipidici (LOOH) è rappresentato nello schema 3.5.



Schema 3.5 - Chemiluminescenza generata dai reagenti idroperossidi lipidici e isoluminolo/microperossidi

Quando un antiossidante è presente blocca i radicali dell'ossigeno (LO·) e diminuisce la chemiluminescenza. Così con l'uso di una costante quantità di idroperossidi lipidici (donatori di radicali) si può valutare la capacità degli antiossidanti mediante decremento della chemiluminescenza.

3.3.3 Metodo di decolorazione con ABTS

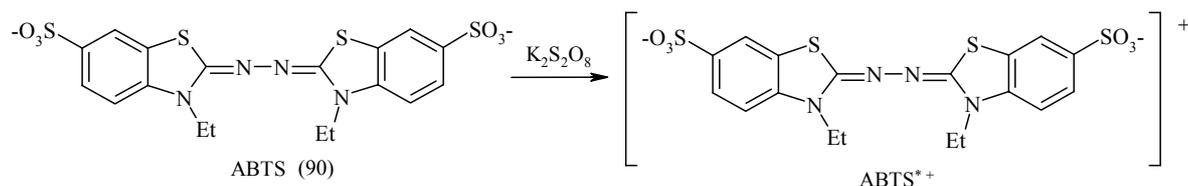
Metodo applicabile sia ad antiossidanti lipofili che idrofili. La generazione del radicale cationico^[74] rappresenta la base di un metodo spettrofotometrico che è stato applicato per la misurazione dell'attività antiossidante di soluzioni di sostanze pure^[75] e miscele acquose.

Il metodo originale dell'ABTS⁺ era basato sull'attivazione di metamioglobina con perossido d'idrogeno in presenza di ABTS per produrre il radicale cationico, in presenza o in assenza dell'antiossidante. Tale metodo fu criticato sulla base della più veloce reattività dell'antiossidante che avrebbe potuto contribuire alla riduzione del radicale ferroso della mioglobina. Una forma più appropriata del metodo consiste in una tecnica di decolorazione in cui il radicale è generato in una forma stabile prima di reagire con l'antiossidante. Il radicale monocationico dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonico) (ABTS⁺) è generato attraverso l'ossidazione dell'ABTS con il persolfato di potassio ed è ridotto in presenza di antiossidanti donatori di idrogeno.

⁷³ Y.Yamamoto, M.H.Brodsky, J.C.Baker, and B.N.Ames, *Analytical Biochemistry* (1987); **160**: 7-13.

⁷⁴ B.S.Wolfenden, R.L.Wilson, *J.Chem. Soc. Perkin Tran*, (1982); **2**: 805-812.

⁷⁵ C.A.Rice-Evans, N.Miller, G.Paganga, *Free Radical Biology Meicin* (1996); **20**: 933-956.



Schema 3.6 – Formazione del radicale dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonico) per reazione di ABRS con per solfato di potassio

Il radicale è una sostanza cromofora, che da una colorazione blu/verde, e presenta un massimo assoluto d'assorbimento ad una lunghezza d'onda di 415 nm e tre massimi relativi a 645, 734 e 815 nm.

L'antiossidante aggiunto al radicale preformato, lo riduce a ABTS, in dipendenza della durata di reazione, dell'attività antiossidante e dalla concentrazione dell'antiossidante. Dalla decolorazione e variazione dell'assorbanza si determina la percentuale d'inibizione del radicale cationico.

3.3.4 ORAC: Oxigen Radical Absorbance Capacity^[76,77,78]

Il saggio ORAC viene utilizzato per determinare la capacità antiossidante totale^[79]. Si tratta di un metodo molto sensibile che utilizza la beta-ficoeritrina (beta-PE) come proteina indicatrice (*marker* di fluorescenza) e possono essere utilizzati vari generatori di radicali liberi. In particolare, sono utilizzati, il generatore perossilico 2,2'-azobis(2-ammidinopropano)·HCl (AAPH), e il Cu²⁺ in associazione all' H₂O₂. Il 2,2'-azobis(2-ammidinopropano)cloridrato (AAPH), è un azocomposto solubile in acqua, si decompone termicamente, portando alla formazione di radicali perossilici con velocità costante^[80]. La fluorescenza della beta-ficoeritrina è altamente dipendente alla conformazione ed all'integrità chimica della stessa proteina. La perdita della fluorescenza in presenza di radicali perossilici è un indice del danno ossidativo generato dalle specie reattive. La conservazione della sua fluorescenza, grazie all'azione protettiva degli

⁷⁶ G.Montevecchi, Radicali liberi e capacità antiossidante, *ORAC, Metodologia e Livelli in Natura, Ferrara*.

⁷⁷ Glazer, A. N. *Methods Enzymol.* (1990); **186**, 161–168.

⁷⁸ G.Cao, H.M.Alessio, and R.G.Cutler, *Free Radical Biol. Med.*(1993); **14**, 303–311.

⁷⁹ G.Cao ,R.L. Prior, *Meth Enzymol* (1999); **299**: 50-62

⁸⁰ B.Frei, Stocker, B.M.Ames, *Proc Natl Acad Sci* (1988); **85** :9748-9754.

antiossidanti presenti, è una misura della loro capacità antiossidante nei confronti delle specie reattive. Finché gli antiossidanti sono in grado di catturare i radicali, essi proteggono il *marker* di fluorescenza dal decadimento; terminato l'effetto degli antiossidanti, i radicali reagiscono con la beta-ficoeritrina che perde fluorescenza. Il tempo di decadimento della fluorescenza è proporzionale alla quantità ed alla attività degli antiossidanti presenti nel campione.

Questo saggio consente di determinare quantitativamente la capacità antiossidante totale, e distinguere quali siano gli antiossidanti ad azione rapida quali ad azione lenta ed il loro rapporto. La beta-ficoeritrina reagisce con i radicali dell'ossigeno oltre 100 volte più lentamente della maggior parte degli antiossidanti biologici come tioli, acido urico, bilirubina e ascorbato. Perciò, tutti gli altri antiossidanti attivi sono completamente ossidati prima che lo sia la beta-ficoeritrina, facilitando così la misura della loro capacità antiossidante. In ogni caso, la beta-ficoeritrina è oltre 60 volte più reattiva di altre proteine non antiossidanti, che dunque non interferiscono nell'analisi. I risultati del saggio sono quantificati permettendo alla reazione di giungere a completezza e integrando successivamente l'area al di sotto della curva cinetica relativamente ad una reazione in bianco (*blank reaction*) non contenente antiossidanti aggiunti. L'area al di sotto della curva (AUC) è proporzionale alla concentrazione di tutti gli antiossidanti presenti nel campione. Questa metodica consente di combinare due parametri, il *tempo di inibizione* e la *quota percentuale di inibizione* delle specie reattive dovuta agli antiossidanti totali calcolati come quantità singola: per questo il metodo è migliore di quelli analoghi che utilizzano l'inibizione percentuale a un tempo fisso o il tempo di inibizione ad una quota percentuale fissa di inibizione^[81].

I risultati finali sono calcolati usando la differenza delle AUC di decadimento della beta-ficoeritrina (fluorescenza relativa vs tempo) tra il campione in esame ed il bianco.

⁸¹ G.Cao , R.L.Prior. *Clinical Chemistry* (1998); **44**: 1309-1315

$$20K \times \frac{S_{\text{campione}} - S_{\text{bianco}}}{S_{\text{Trolox}} - S_{\text{bianco}}} \quad (\text{eq. 3.3})$$

K = fattore di diluizione

S = Area sotto la curva di decadimento della fluorescenza

Ciascuna reazione è calibrata usando uno *standard* Trolox® (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) un analogo idrosolubile della vitamina E (figura 3.3).

I risultati del saggio sono riportati sulla base dell'equivalenza seguente:

$$1 \text{ unità ORAC} = 1 \mu\text{M di equivalenti Trolox}^{\circledR}$$

Con il metodo ORAC, si può calcolare sia la capacità antiossidante dei componenti idrosolubili (*Aqueous ORAC*), che di quelli liposolubili (*Lipid ORAC*); addizionando le due quantità si ottiene il valore di ORAC totale del prodotto. La beta-ficoeritrina è stata recentemente sostituita con la fluorescina (FL) e l'analisi ribattezzata ORACFL^[82]. Esiste un fattore di conversione che consente di comparare i dati ottenuti con le diverse metodiche.

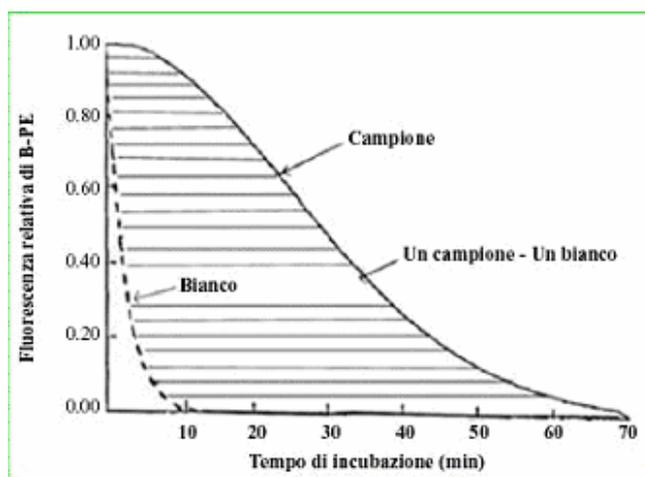


Figura 3.2 - Area sotto la curva di decadimento della beta-ficoeritrina (B-PE)

⁸² B.Ou, M.Hampsch-Woodill, R.L.Prior, *J Agric Food Chem.* (2001); **49** :(10) 4619-4626

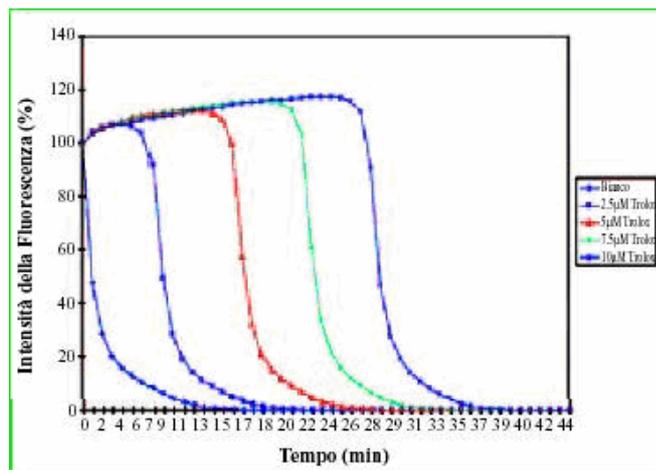


Figura 3.3 - Curve di calibrazione dello standard Trolox

3.3.5 NBT e azione scavenger ^[83]

L'anione superossido deriva dalla dissoluzione dell'ossigeno nel sistema di reazione PMS (fenazina metossisolfato)-NADPH attraverso l'ossidazione del NADPH. In questo metodo, l'anione superossido riduce il colorante giallo NBT²⁺ per produrre il composto ridotto di colore blu che assorbe a 560 nm. Gli antiossidanti inibiscono la formazione dell'NBT di colore blu^[84] (figura 3.4).

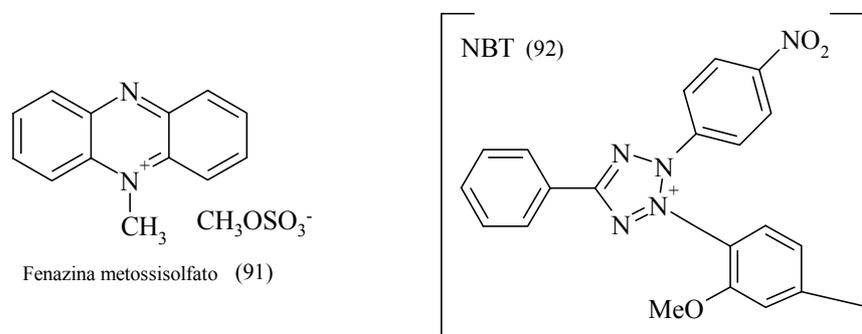


Figura 3.4 - PMS (fenazina metossisolfato) - NBT

Il decremento dell'assorbanza a 560 nm con gli antiossidanti indica la loro azione scavenger. La percentuale d'inibizione (PI) della formazione dei radicali è calcolata come:

$$PI = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (eq.3.4)$$

⁸³ Q.Liu, G.Zhu, P.Huang, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* (1991); **161**: 50-65.

⁸⁴ I.Parejo, F.Viladomat, J.Bastida, A.Rosas-Romero, N.Flerlage, J.Burillo, C.Codina *J. Agric. Food Chem.* (2002); **50**:6882-6890.

3.3.6 Test della DCFH/DCF

La degradazione termica dell'ABAP[2,2'-azobis(amidinopropano)] produce radicali perossilici ($\text{ROO}\cdot$), che ossidano la diclorofluoresceina (DCFH) non fluorescente a diclorofluoresceina (DCF) fluorescente (figura 3.5). Il grado d'inibizione dell'ossidazione della DCFH, attraverso antiossidanti che intrappolano i radicali liberi, è utilizzato come base per il calcolo dell'attività antiossidante. La reazione è condotta a 37°C e la fluorescenza è monitorata a 485 nm e 538 nm con lo spettrofotometro fluorescente.

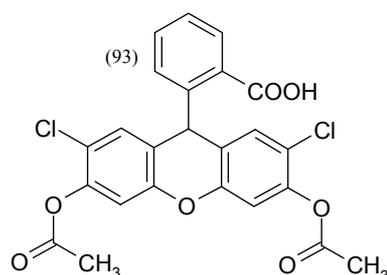
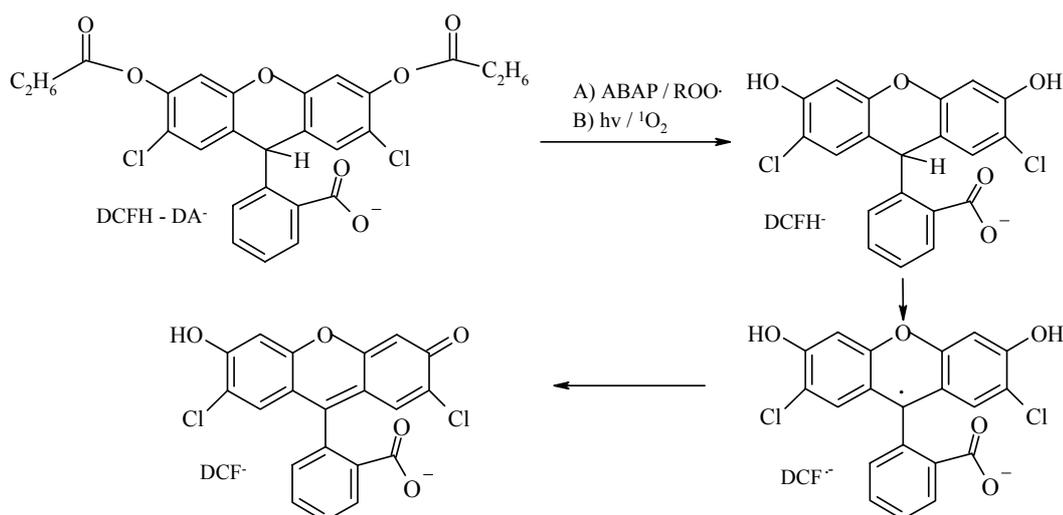


Figura 3.5 – Diclorofluoresceina (DCF)

L'ossidazione della DCFH può essere fotoindotta, attraverso una lampada Xe-Hg a 450 watt, mediante la formazione di $^1\text{O}_2$.



Schema 3.7– Conversione della fluoresceina (DCF) in fluoresceina fluorescente (DCHF)

34 Metodi di determinazione del potere riducente

34.1 Test Frap: ferric reducing antioxidant power assay ^[85]

Il FRAP test è un metodo semplice e automatizzato che misura il potere antiossidante, AP, inteso come capacità riducente di un determinato composto. Tale metodo è basato sulla riduzione di un complesso Fe(III)-tripiridiltriazina (Fe^{III}-TPTZ) al corrispondente Fe(II)-tripiridiltriazina (Fe^{II}-TPTZ).

A pH 3.6 circa, tale riduzione sviluppa un'intensa colorazione con un picco di assorbimento a 593 nm^[86,87]. La reazione non è specifica, e si verifica la riduzione del complesso del Fe(III) in qualunque ambiente di reazione che presenti un potenziale redox meno-positivo. La riduzione del complesso e quindi lo sviluppo della colorazione, dimostra che è presente un antiossidante riducente. La ferrozina^[88], un composto molto simile al TPTZ, è stato ampiamente usato con un eccesso di acido ascorbico per misurare le concentrazioni di ferro. Nel saggio FRAP è usato un eccesso di Fe^{III}, e la formazione del complesso Fe^{II}-TPTZ rappresenta l'abilità riducente del campione.

Le variazioni dei valori di assorbanza dipendono dalle concentrazioni del campione, che può essere una miscela di antiossidanti, incluso il plasma, o soluzioni contenenti un antiossidante in forma pura.

34.2 Metodo colorimetrico con K₃Fe(CN)₆^[89]

In tale saggio, si utilizza una soluzione iniziale di ferrocianuro di potassio che presenta una colorazione gialla. Il viraggio a colorazioni che vanno dal verde al blu, dipendono dal potere riducente di campioni antiossidanti.

La presenza di antiossidanti causa la riduzione del complesso ferrocianuro(Fe^{III}) nella forma ridotta contenente Fe^{II}. Gli ioni Fe²⁺ possono essere monitorati attraverso la formazione del blu prussiano di Perl a 700 nm^[90].

⁸⁵ I.F.F.Benzie, J.J.Strain, *Anal. Biochem.* (1996); **239**: 70–76.

⁸⁶ Benzie, I. F. F. *Clin. Biochem.* (1996) **29**: 111–116.

⁸⁷ T.Z.Liu, N. Chin, M.D. Kiser, W.N. Bigler, *Clin. Chem.* (1982); **28**: 2225–2228.

⁸⁸ L.L. Stookey *Anal. Chem.* (1970); **42**: 779–783.

⁸⁹ M. Oyaizu, *Jpn. J. Nutr.* (1986) **44**: 307–315.

⁹⁰ Y.C. Chung, C.T. Chang, W.W. Chao, C.F. Lin, S.T. Chou, *J. Agric. Food Chem.* (2002) **50**: 2454–2458.

3.5 Capacità chelante gli ioni ferroso

I composti con attività chelante possono esplicare la propria azione antiossidante perchè sequestrano quei metalli che catalizzano processi di perossidazione lipidica.

Lo ione Fe^{2+} è uno degli ioni proossidanti più potenti^[91]. La ferrozina può quantitativamente formare complessi con il Fe^{2+} di una colorazione rossa. In presenza di agenti chelanti, il complesso Ferrozina- Fe^{2+} è disgregato, con una conseguente decolorazione. La misura della decolorazione è stimata mediante spettrofotometro e la riduzione dell'assorbanza indica una più alta attività chelante.

⁹¹ B.Halliwell, J.M.Gutteridge, *Biochem. J.* (1984) **219**: 1-4.

CAPITOLO IV

PROGETTAZIONE DI MONOMERI E POLIMERI CON RESIDUI ANTIOSSIDANTI

4.1 Introduzione

Scopo del presente lavoro di tesi è la realizzazione di sistemi polimerici legati a molecole antiossidanti per possibili applicazioni cosmetiche e/o farmaceutiche.

La funzione più importante degli antiossidanti è quella di impedire l'ossidazione di sistemi biologici; tale funzione si verifica generalmente perché sono bloccate le condizioni di stress ossidativo indotte da specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto.

Antiossidanti esogeni possono coadiuvare l'azione dei normali sistemi difensivi antiossidanti delle cellule, che a volte non sono sufficienti per contrastare l'insorgenza di patologie indotte da radicali.

L'azione di una molecola antiossidante convenzionale è condizionato da molteplici fattori che ne possono limitare anche l'impiego; per esempio una sua rapida metabolizzazione da parte di specifici sistemi enzimatici o un suo veloce allontanamento dall'organismo ne riduce la potenziale efficacia, oppure un suo rapido assorbimento e accumulo in particolari distretti può favorire la comparsa di effetti tossici indesiderati. Questi eventi negativi si verificano infatti con la maggior parte delle molecole antiossidanti convenzionali; è per questa ragione che il loro uso in formulazioni cosmetiche, farmaceutiche o in ambito alimentare è regolato da varie leggi (legge n°283 dell'aprile del 1962, legge n° 713 dell'ottobre del 1986 e successive modifiche), che ne vietano l'impiego o ne restringono l'uso a limiti massimi di quantità applicabili.

L'idea di realizzare antiossidanti polimerici nasce dal fatto che un tale sistema potrebbe offrire delle migliori caratteristiche rispetto ai semplici

antiossidanti convenzionali; i sistemi polimerici per la loro struttura macromolecolare non sono in grado di oltrepassare le membrane cellulari, ne consegue l'assenza di tossicità d'accumulo; presentano generalmente una maggiore stabilità e sono degradati più lentamente, per cui potrebbero avere una maggiore durata d'azione e migliori caratteristiche farmacocinetiche. Un siffatto polimero potrebbe essere costituito da una matrice polimerica alla quale sono legate molecole più piccole che hanno attività antiossidante; se il legame polimero-antiossidante è labile, la matrice polimerica svolgerebbe in questo caso il ruolo di sistema veicolante, capace per esempio di trasportare l'antiossidante in siti specifici anche in ambienti a lui poco affini, oppure di rilasciarlo gradatamente nel tempo.

4.2 Strategie di sintesi

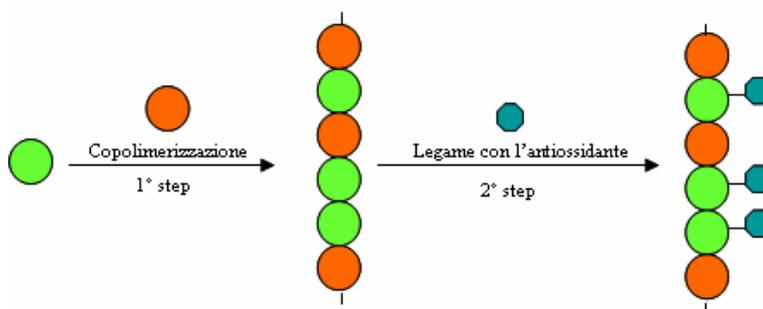
Per realizzare un polimero contenente residui con attività antiossidante bisogna fare alcune considerazioni preliminari sulle proprietà strutturali sia delle unità monomeriche da impiegare che sui sistemi antiossidanti da legare covalentemente alla matrice macromolecolare.

Per quanto riguarda la tecnica di preparazione dei polimeri è stata presa in considerazione la polimerizzazione radicalica, in quanto presenta numerosi vantaggi rispetto alle altre tecniche di polimerizzazione. Uno dei maggiori vantaggi è la possibilità di impiegare più monomeri in rapporto uguale o diverso e la variazione di tale rapporto consente spesso l'ottenimento dei polimeri con proprietà chimico-fisiche modulabili.

I monomeri che possono essere impiegati devono presentare gruppi funzionali insaturi (acrilici o stirenici) in grado di generare radicali capaci di dar luogo ad un processo a cascata in cui si formano legami C-C covalenti con formazione di molecole ad elevato peso molecolare. Il peso molecolare di un polimero è una proprietà importante, che dipende da molte variabili come la quantità d'iniziatore radicalico. Maggiore è la quantità d'iniziatore maggiore è la possibilità che si formino radicali primari e quindi catene polimeriche nascenti con conseguente formazione di oligomeri o polimeri a più basso peso molecolare; d'altro canto minore è la quantità d'iniziatore più probabile sarà la realizzazione

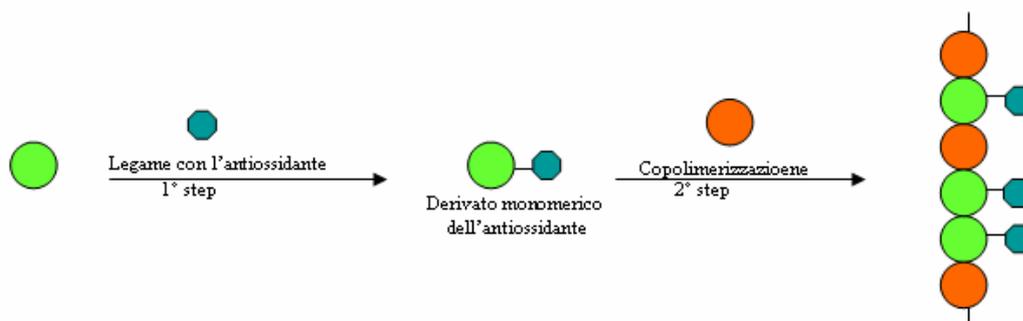
di polimeri ad alto peso molecolare. Inoltre tali monomeri, in vista del materiale che si vuole realizzare, devono presentare delle funzioni chimiche che consentano di legare molecole antiossidanti sia prima che dopo il processo di polimerizzazione radicalica. La tecnica della polimerizzazione radicalica consente, infatti, la realizzazione di matrici polimeriche contenenti residui con potenziale attività antiossidante attraverso due possibili vie di sintesi.

La prima strategia, rappresentata nello schema 4.1, prevede un passaggio iniziale in cui si forma il polimero funzionale. Tale sistema reca i gruppi funzionali capaci di legare nel secondo stadio la molecola antiossidante.



Schema 4.1 – Sintesi generica di un polimero antiossidante – prima strategia di sintesi

La seconda prevede un primo step in cui si forma il legame monomero-antiossidante e un secondo step, in cui il prodotto ottenuto, in seguito a reazione di polimerizzazione, forma il polimero desiderato. Nello schema 4.2 è riportato questo secondo approccio sintetico.



Schema 4.2 – Sintesi generica di un polimero antiossidante – seconda strategia

4.2.1 Prima strategia di sintesi

Il primo stadio della prima strategia prevede la formazione di una matrice polimerica opportunamente funzionalizzata alla quale legare successivamente l'antiossidante.

La scelta dei comonomeri da impiegare per la preparazione dei copolimeri funzionalizzati è stata fatta tenendo conto delle loro caratteristiche funzionali, della idrofilia, della biocompatibilità e infine della loro reperibilità ed economicità. Allo scopo sono stati considerati il 2-ammino-etilmetacrilato (**94**), l'*N*-vinil-2-pirrolidone (VP) (**95**) e l'*N,N*-dimetilacrilammide (DMAA) (**96**) (figura 4.1).

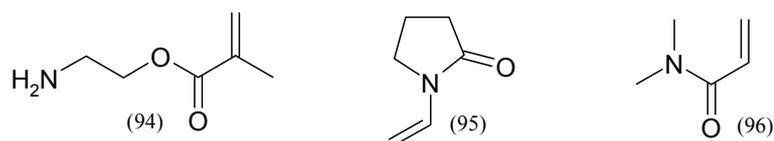


Figura 4.1 – Struttura di monomeri acrilici e metacrilici

I polimeri (**97**) ottenuti dalla copolimerizzazione tra il 2-amminoetilmetacrilato (**94**) e il *N*-vinil-2-pirrolidone (**95**) o l'*NN*-dimetilacrilammide (**96**) contengono in catena laterali gruppi amminici primari capaci di legarsi attraverso la formazione di un legame ammidico con il gruppo carbossilico della molecola antiossidante (figura 4.2).

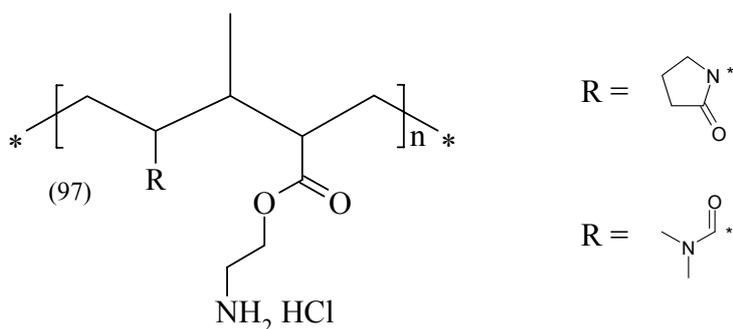


Figura 4.2 – Struttura di un polimero derivato da polimerizzazione di *N*-amminoetilmetacrilato

Infatti, i derivati che si possono preparare mantenendo inalterate le proprietà strutturali dell'agente antiossidante, sono sistemi legati tramite formazione di

legami ammidici o esterei ai gruppi carbossilici dell'acido lipoico e dell'acido ferulico. Studi preliminari confermano che alcuni derivati dell'acido lipoico e ferulico non perdono l'attività antiossidante^[92,93,94].

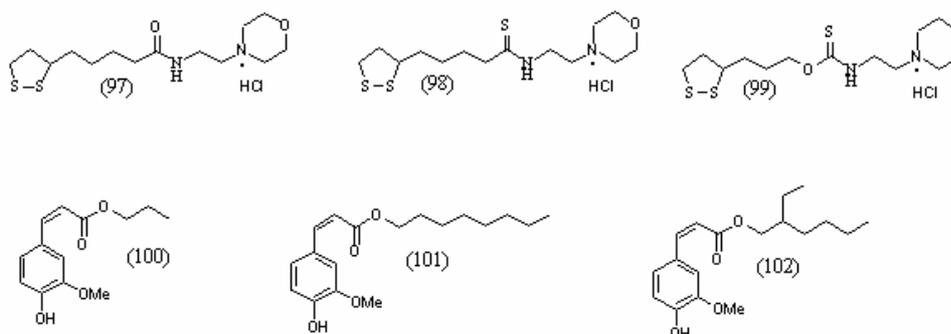


Figura 4.3 Derivati attivi degli acidi lipoico e ferulico

Tutti questi esempi indicano che le proprietà antiossidanti si mantengono solo se rimangono inalterati il ponte disolfuro nell'acido lipoico e il gruppo fenolico nell'acido ferulico. Infatti questi derivati sono stati ottenuti impegnando esclusivamente il loro gruppo carbossilico. La sintesi di tali composti è realizzata attraverso intermedi più reattivi come le anidridi **(103)** **(104)** o i cloruri **(105)** **(106)**^[95,96,97] (figura 4.4).

⁹² C. Guilloneau, Y. Charton, Y-M. Ginot, M.V. Fouquier-d'Henouel, M. Bertrand, B. Lockhart, P. Lestage, S. Goldstein; *Eur. J. Med. Chem.*, (2003) **38**:1-11.

⁹³ C. Anselmi, M. Centin, P. Granata, A. Sega, A. Bonocore, A. Bernini, R. Maffei-Facino; *J. Agric. Food. Chem.*, (2004) **52**:6425-6432.

⁹⁴ H. Kikuzaki, M. Ysamoto, K. Hirose, K. Akyama, H. Taniguchi; *J. Agric. Food. Chem.*, (2002) **50**:2161-2168.

⁹⁵ Y. Nambu, T. Endo, M. Okawara; *J. Polym. Sci.*, (1980) **18**: 2793-2802.

⁹⁶ H. Nakata, Y. Sashida, H. Shomomura; *Chem. Pharm. Bull.*, (1988) **39**: 4554-4556.

⁹⁷ A. Hosoda, E. Nomura, K. Mizuno, H. Taniguchi, *J. Org. Chem.*, (2001) **66**: 7199-7201.

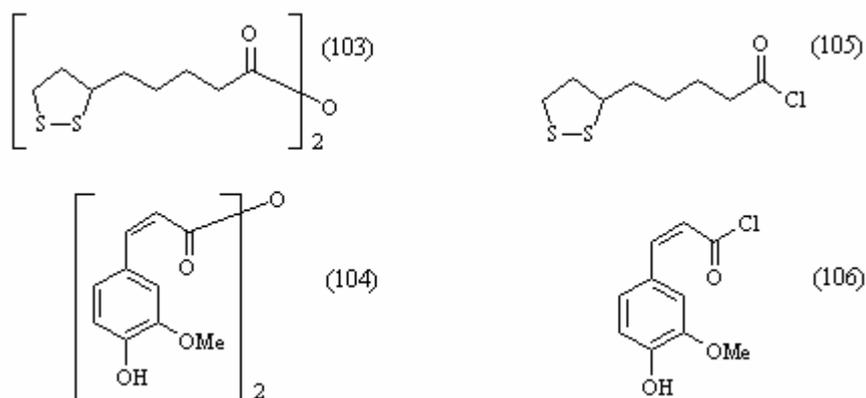


Figura 4.4 – Cloruri e anidridi degli acidi lipoico e ferulico

4.2.2 Seconda strategia di sintesi

La seconda via sintetica prevede la formazione di derivati monomerici dell'acido lipoico e dell'acido ferulico (figura 4.5) capaci di partecipare al processo di polimerizzazione radicalica.

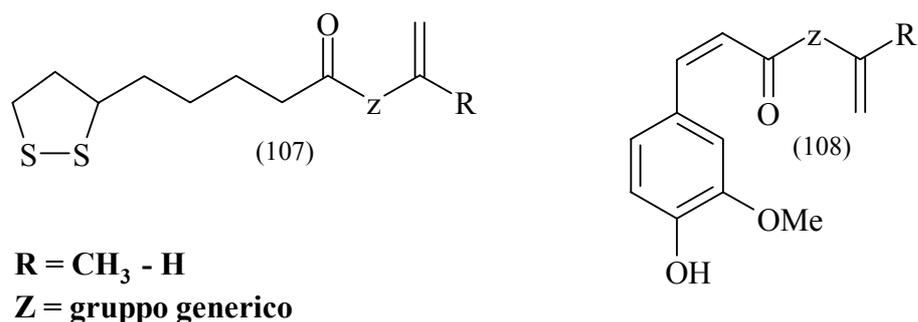


Figura 4.5 – Struttura di derivati lipoilici e feruloilici polimerizzabili

Un'attenta indagine bibliografica ha consentito di conoscere le condizioni sperimentali per la sintesi dei monomeri 2-N-lipoil-amminoetil-metacrilato (L-AEM) (109) e 2-N-feruloil-amminoetilmetacrilato (F-AEM) (110) attraverso la formazione del legame fra il gruppo amminico del 2-amminoetilmetacrilato e il gruppo carbossilico degli antiossidanti (figura 4.6).

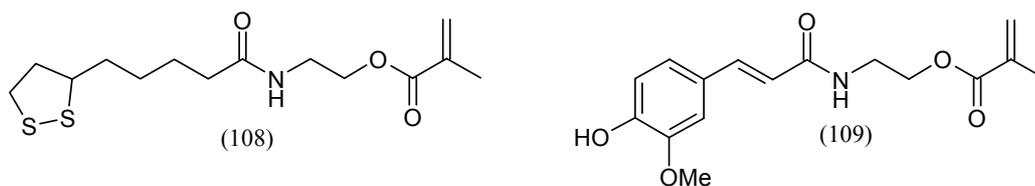


Figura 4.6 – 2-N-lipoilamminoetilmetacrilato e 2-N-feruloilamminoetilmetacrilato

I monomeri **(108)** e **(109)** possono subire polimerizzazione radicalica in presenza di un comonomero per ottenere una matrice polimerica contenente residui di molecole antiossidanti. Prima di affrontare la sintesi dei polimeri partendo dai monomeri **(108)** e **(109)** è necessario fare alcune considerazioni su possibili reazioni collaterali che si possono verificare. In un processo di polimerizzazione radicalica la formazione di specie radicaliche primarie è indotta dalla scissione omolitica di opportuni iniziatori (AIBN, persolfato d'ammonio). Le specie radicaliche, così prodotte, potrebbero interagire con i residui antiossidanti presenti nei composti **(108)** e **(109)** provocandone la perdita delle loro attività. D'altro canto la presenza di funzioni chimiche che catturano i radicali in crescita potrebbe causare la formazione di polimeri con caratteristiche e pesi molecolari diversi da quelli previsti o comprometterne addirittura la sintesi. Una diretta conseguenza potrebbe essere la terminazione anticipata delle catene polimeriche in crescita con formazione di polimeri a basso peso molecolare.

Sicuramente tale strategia ha come obiettivo principale il perfezionamento delle condizioni sperimentali che consentono al meglio di realizzare il legame tra l'unità monomerica e molecola antiossidante.

CAPITOLO V

NUOVI SISTEMI POLIMERICI CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

5.1 Introduzione

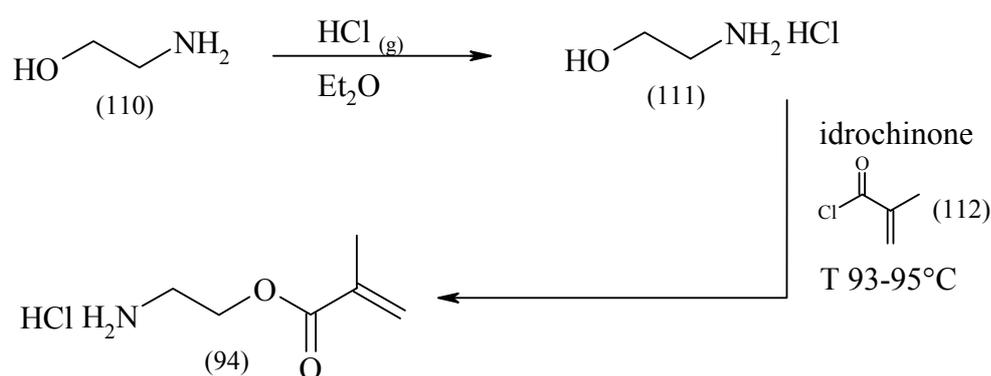
Lo scopo del presente lavoro è la realizzazione di sistemi costituiti da antiossidanti naturali, come l'acido lipoico e ferulico, ancorati a polimeri sintetici biocompatibili e la successiva valutazione della loro efficacia antiossidante. L'acido ferulico e l'acido lipoico sono antiossidanti che agiscono sequestrando e stabilizzando direttamente specie radicaliche e chelando alcuni metalli coinvolti nei processi ossidativi dei sistemi biologici. Poiché alcuni derivati lipoilici e feruloilici sintetizzati risultano ancora attivi o addirittura più attivi degli stessi acidi lipoico e ferulico, il loro inserimento all'interno di matrici polimeriche biocompatibili non dovrebbe annullare la loro efficacia antiossidante, che verrebbe quindi trasferita all'intero sistema macromolecolare. Al fine di ottenere tali polimeri, dopo un'attenta valutazione dei dati di letteratura, sono state adottate due differenti strategie sintetiche: la prima prevede la realizzazione di un sistema macromolecolare a cui vengono successivamente ancorati i due acidi; la seconda prevede la realizzazione di un derivato polimerizzabile dei due antiossidanti da sottoporre successivamente a polimerizzazione radicalica in presenza di un opportuno comonomero. I polimeri antiossidanti risultanti potrebbero essere potenzialmente applicabili sia in campo farmaceutico che cosmetico per i vantaggi, già discussi precedentemente, che offrono rispetto agli antiossidanti convenzionali.

5.2 Sintesi del polimero funzionale P2.1

In linea con la progettazione dei polimeri desiderati, la prima strategia per realizzare polimeri contenenti residui con attività antiossidante prevede la

preventiva formazione di una struttura macromolecolare caratterizzata dalla presenza di gruppi funzionali capaci di formare legami stabili con i gruppi carbossilici dell'acido lipoico (**31**) o ferulico (**51**). Tali macromolecole sono state preparate per copolimerizzazione con un opportuno comonomero del 2-amminoetilmetacrilato (**94**), il monomero funzionale scelto per la presenza di gruppi amminici necessari per la formazione successiva del legame ammidico con l'antiossidante. Il comonomero dapprima impiegato è l'N, vinil-2-pirrolidone (**95**) noto per la sua elevata biocompatibilità; tuttavia successivamente è stato sostituito con la N-N-dimetilacrilammide (**96**), anch'essa nota per la sua biocompatibilità, per l'ottenimento di prodotti più facilmente purificabili e soprattutto per la riproducibilità dei risultati.

5.2.1 Sintesi dell'N-amminoetilmetacrilato cloridrato (**94**)



Schema 5.1 – Sintesi di N-amminoetilmetacrilato

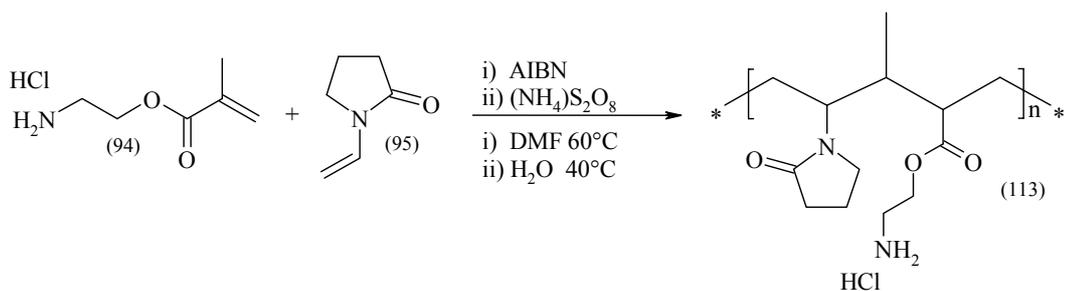
La sintesi del monomero AEM prevede l'iniziale formazione del cloridrato di etanolamina (**110**), per ridurre la reattività nucleofila del gruppo amminico nello step successivo; alternativamente tale sintesi può impiegare l'etanolamina con il gruppo amminico legato al gruppo protettore BOC^[1]. La formazione del cloridrato (**111**) è condotta sotto agitazione a temperatura ambiente in etere etilico, nel quale il cloridrato precipita dopo formazione. La reazione è fortemente esotermica. Dopo filtrazione il composto è purificato per ricristallizzazione in

¹ H.-P. Zobela, A. Zimmera, S. Atmaca-Abdel Azizb, Europea net al., *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **47** (1999) 203–213

etanolo. Nel secondo passaggio il cloridrato di etanolammina (**111**) è fatto reagire, in atmosfera inerte, con il cloruro di metacrilato (**112**) in presenza di un eccesso di inibitore delle polimerizzazioni radicaliche: l'idrochinone. La presenza di tale inibitore consente di effettuare la reazione alla temperatura di 93-95°C. a fine reazione si raffredda lentamente la soluzione fino al formarsi di una miscela omogenea giallo-bruno viscosa. Il prodotto (**94**) è isolato dalla miscela di reazione per precipitazione in pentano dopo addizione di tetraidrofurano (THF). Per filtrazione si ottiene un grezzo di reazione bianco, cremoso e fortemente igroscopico. Il prodotto è rapidamente purificato mediante ricristallizzazione in acetonitrile con aggiunta di inibitore di polimerizzazione radicalica. Dopo filtrazione il prodotto è seccato sotto atmosfera inerte a pressione ridotta. Resa 70%.

5.2.2 Copolimerizzazione di VP (**95**) e AEM (**94**)

Una serie di polimeri PV è stata ottenuta per copolimerizzazione dell'N-vinil-2-pirrolidone (**95**) con l'N-amminoetilmetacrilato cloridrato (**95**). La polimerizzazione è stata condotta sia in N,N-dimetilformammide (DMF) anidra a 60°C per 24 H in presenza di azobisisobutirronitrile (AIBN), come iniziatore radicalico, sia in H₂O bidistillata a 40°C per la presenza di persolfato d'ammonio ((NH₄)₂S₂O₈), come iniziatore radicalico, secondo lo schema 5.2.



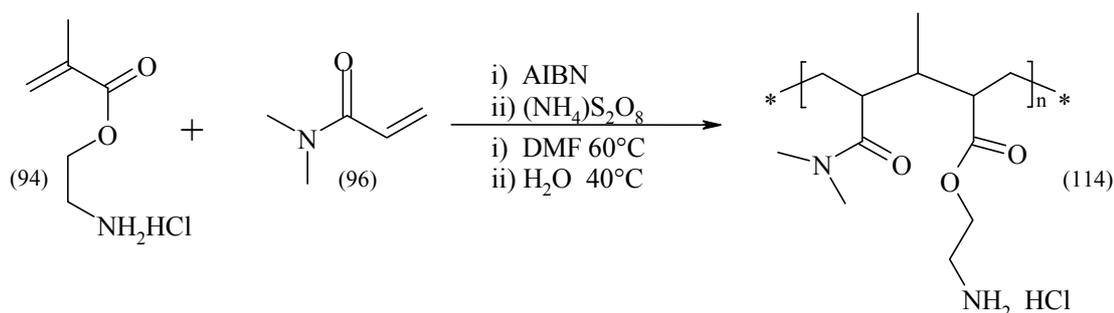
Schema 5.2 – Sintesi dei polimeri PV

In entrambi i casi le reazioni di polimerizzazione sono state ripetute variando la composizione molare dei monomeri reagenti. In tutti i casi i polimeri (**113**) ottenuti sono igroscopici e non solubili nei solventi necessari per le successive trasformazioni, e le stesse reazioni ripetute più volte non portano sempre agli

stessi risultati, perché le cinetiche di polimerizzazione dei due monomeri sono nettamente differenti.

5.2.3 Copolimerizzazione di DMAA e AEM

Visto i risultati poco incoraggianti ottenuti con l'N-vinil-2-pirrolidone è stato preso in considerazione un altro comonomero, l'N,N-dimetilacrilammide (**96**). Anche in questo caso le reazioni di polimerizzazione sono state condotte sia in solvente acquoso che in DMF anidra per 24 ore, alla presenza di un opportuno iniziatore radicalico, e sotto agitazione magnetica, secondo lo schema 5.3



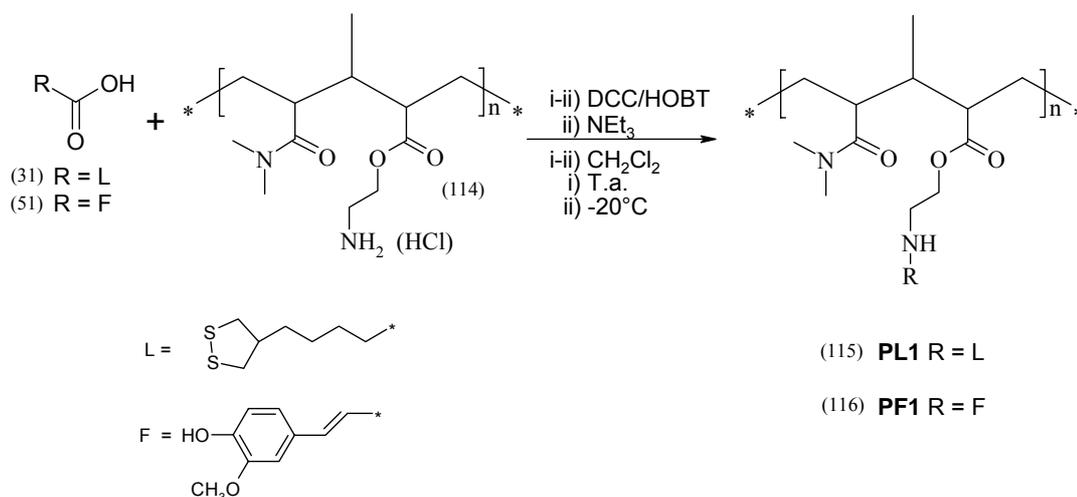
Schema 5.3 – Sintesi dei polimeri PD

Nel caso di polimerizzazioni in acqua, la fine della reazione è indicata dalla formazione di una soluzione limpida, trasparente allo stato di gel, che impedisce l'agitazione magnetica. Nel caso delle polimerizzazioni in DMF la fine della reazione è indicata dalla formazione di un precipitato bianco. Variando la composizione percentuale della miscela di polimerizzazione sono stati ottenuti vari polimeri della serie PD, che presentano simili proprietà di solubilità. Generalmente si ottiene un polimero insolubile in DMF, solubile in H_2O e MeOH. Della serie di polimeri realizzati, si è deciso di utilizzare in seguito, per migliori caratteristiche di purificazione, quello ottenuto per copolimerizzazione in DMF di DMAA (**96**) e AEM (**94**) in rapporto molare 2/1 (PD2.1). Questo polimero (**114**) è purificato mediante lavaggi estensivi in etere etilico, successiva dissoluzione in H_2O e precipitazione in acetone. La sua insolubilità nel solvente aprotico DMF è dovuta sostanzialmente alla presenza di gruppi amminici cloridati, infatti liberando i gruppi amminici per trattamento con una soluzione acquosa alcalinizzata di NaOH (pH 9-10) e successiva dialisi, si ottiene, dopo

liofilizzazione, un polimero (PD2.1_b) solubile in DMF e in CH₂Cl₂. (conversione 91%).

5.3 Introduzione covalente dell'antiossidante al polimero P2.1

Il legame ammidico tra il gruppo carbossilico dell'acido ed un gruppo amminico del polimero base si forma facilmente in CH₂Cl₂ anidro. La reazione è fatta avvenire impiegando un leggero eccesso molare dei gruppi amminici del polimero rispetto alle moli di acido carbossilico. Un eccesso di acido in presenza di agenti condensanti, come dicicloesilcarbodimmide (DCC) e 1-idrossibenzotriazolo (HOBT), porterebbe alla produzione di un prodotto collaterale quale l'anidride corrispondente. La reazione di acilazione del polimero P2.1_b (Schema 5.4 - i) è condotta per 48 ore a temperatura ambiente. Analoghi risultati sono stati ottenuti trattando una sospensione del polimero P2.1 con trietilammina in CH₂Cl₂ anidro (schema 5.4 - ii); questa reazione avviene più velocemente se la temperatura è mantenuta a -20°C, motivabile con la più rapida solubilizzazione del polimero per la precipitazione del cloridrato di trietilammina.



Schema 5.4 – Sintesi dei polimeri PL1 e PF1

Nella reazione di feruloilazione la miscela di reazione assume una colorazione giallo intenso non appena l'acido ferulico inizia a legarsi al polimero. In entrambi i casi si ottengono polimeri contenenti residui di acido lipoico (PL1) o di acido ferulico (PF1) sottoforma di polveri gialle. I polimeri PL1 (115) e PF1

(116) esibiscono differenti caratteristiche di solubilità, PL1 è insolubile nella maggior parte dei solventi protici (H₂O, EtOH, MeOH, ecc.) e aprotici (DMF, THF, DMSO, ecc.), mentre PF1 risulta solubile in H₂O e in alcuni solventi aprotici (DMF, acetone). PL1, insolubile in tutti i solventi organici, è purificato mediante lavaggi successivi con etere etilico, CH₂Cl₂, metanolo, etanolo, acqua, acetone ed ancora etere etilico. PF1, a differenza di PL1, è stato purificato mediante vari cicli di dissoluzione/precipitazione usando la coppia solvente/non-solvente DMF ed etere etilico. I polimeri sintetizzati sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante spettroscopia IR, che ha confermato l'avvenuta reazione per comparsa delle bande caratteristiche dei residui acilici inseriti nelle catene laterali dei polimeri. La determinazione dei gruppi amminici prima e dopo reazione di acilazione, mediante il metodo colorimetrico proposto da Gaur-Gupta^[2], ha confermato l'avvenuta reazione di ammidazione. Per il polimero PL1, a ulteriore conferma della presenza dei gruppi lipoilici, è stata eseguita la determinazione dei gruppi tiolici dopo riduzione dei ponti disolfuro con un agente riducente; mentre per PF1 è stato possibile calcolare il grado di funzionalizzazione, determinando le moli di gruppi fenolici per grammo di polimero, mediante un metodo di determinazione di gruppi fenolici. Tutti e tre i metodi spettrofotometrici saranno discussi in seguito.

5.4 Sintesi del N-2-lipoil-amminoetilmetacrilato (108)

Una prima via sintetica, utilizzata per la realizzazione del derivato monomero dell'acido lipoico, il N-2-lipoilamminoetilmetacrilato (108), è stata condotta facendo reagire l'anidride (103) o il cloruro dell'acido lipoico (105) e il 2-amminoetilmetacrilato (94). Il passaggio attraverso i composti 103 e 105, ottenuti secondo metodiche riportate in letteratura^[3-5], consente di disporre di derivati dell'acido lipoico più reattivi nelle reazioni di sostituzione nucleofila.

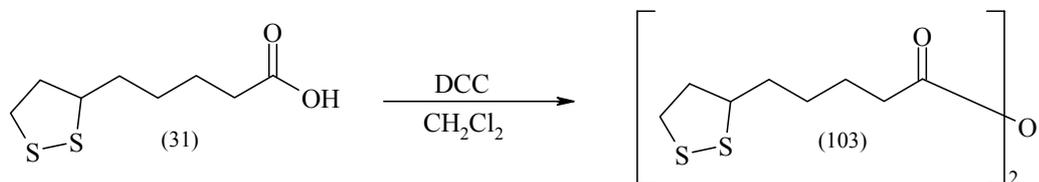
² R.K. Gaur, K.C.Gupta, *Anal. Biochem.*, (1989); **180**: 253.

³ M. H. Chung; M-J. Park; B.C. Chun; Y-C. Chung, *Colloids and Surfaces B.: Biointerfaces*, 2003; **28**: 83-93.

⁴ Nambu; Endo; Okawara, *Journal of Polymer Science Polymer Chemistry Edition.*; 1980; **18**: 2793-2802.

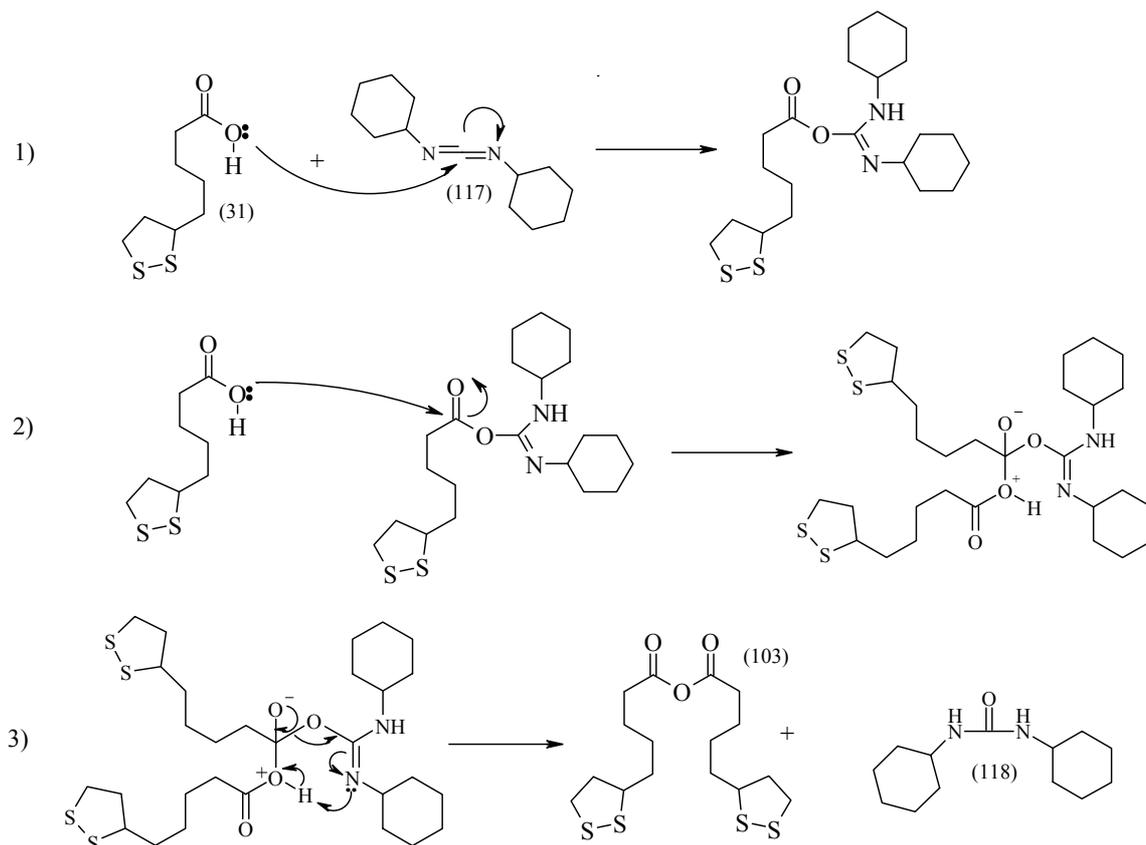
⁵ Asao Hosoda, Eisaku Nomura, Kazumiko Mizuno, Hisaji Taniguchi, *J. Org. Chem.*, 2001; **66**: 7199-7201.

La sintesi dell'anidride lipoica (**103**) è condotta sotto agitazione, atmosfera d'azoto, in CH₂Cl₂ anidro per 24 ore, impiegando la DCC (**117**) come agente condensante secondo lo schema 5.4



Schema 5.4 – Sintesi dell'anidride lipoica

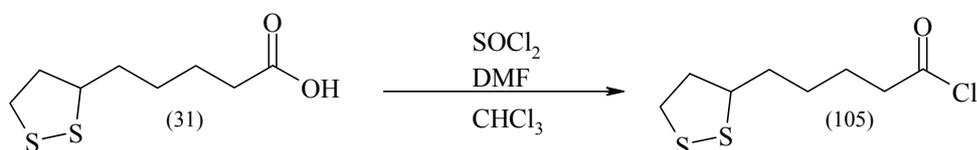
La sintesi dell'anidride in presenza di DCC è favorita dall'eliminazione di un ottimo gruppo uscente: la dicicloesilurea (**118**), che precipita nell'ambiente di reazione (schema 5.5).



Schema 5.5 – Meccanismo di reazione di sintesi dell'anidride lipoica in presenza di DCC

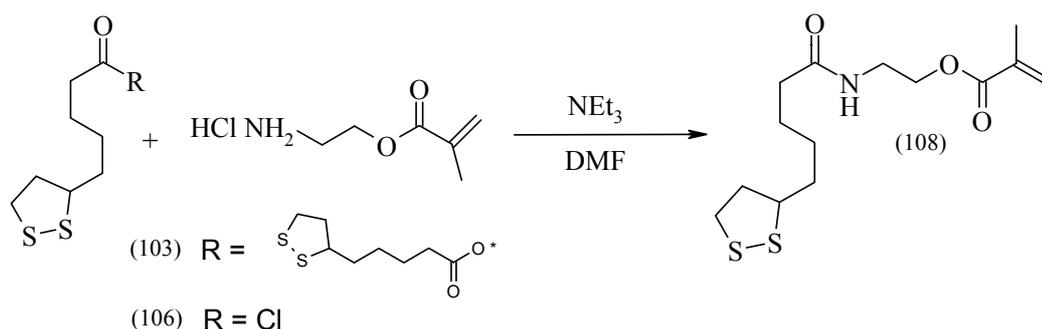
La formazione del prodotto è seguita per analisi cromatografica su TLC. A fine reazione il prodotto è ottenuto, dopo filtrazione, per allontanamento del solvente a pressione ridotta. È un solido giallo.

Il cloruro lipoilico (**105**) è ottenuto per trattamento dell'acido lipoico (**31**) in CHCl_3 con cloruro di tionile (SOCl_2) utilizzando una quantità catalitica di DMF secondo lo schema 5.6. La reazione è condotta per 5 h sotto agitazione magnetica alla temperatura di refluxo. A fine reazione si ottiene una soluzione marrone allo stato gel. Il prodotto è isolato per allontanamento del solvente per evaporazione a pressione ridotta. Si ottiene una polvere di colorazione più chiara da conservare in ambiente anidro perchè si altera facilmente a contatto con l'aria.



Schema 5.6 – Sintesi del cloruro lipoilico

La sintesi del composto L-AEM (**108**) è ottenuta per reazione dei derivati lipoilici prodotti con il monomero N-amminoetilmetacrilato in presenza di un catalizzatore basico (triethylammina) utilizzando la DMF come solvente secondo lo schema di reazione 5.7.

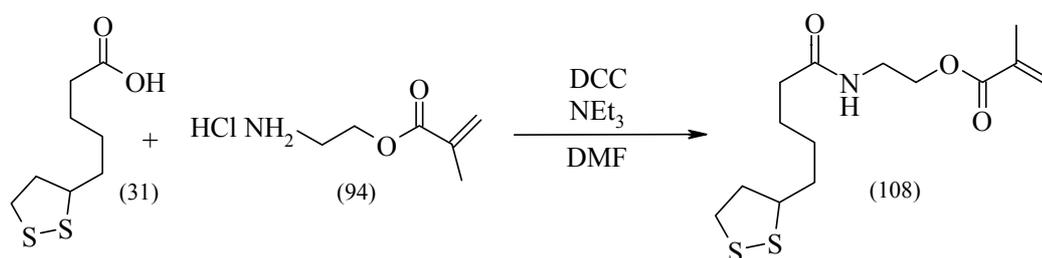


Schema 5.7 – Sintesi (1) del N-lipoil-2-amminoetilmetacrilato

La sintesi riportata nello schema 5.7 è caratterizzata da lunghi tempi di reazione (48-72 ore) e da basse rese sia nella formazione dell'anidride o del

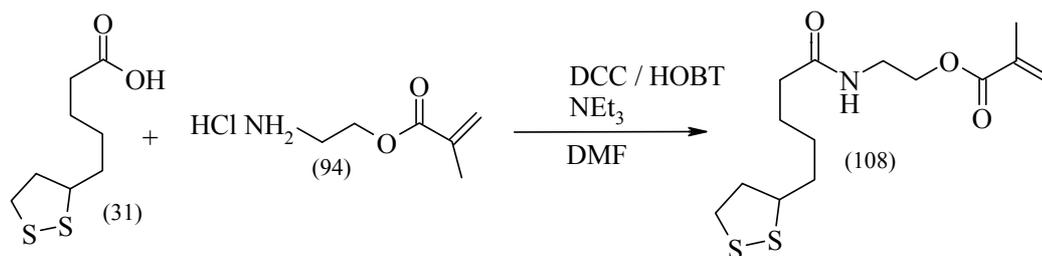
cloruro che nella reazione di formazione del composto **108**. Questo rende il metodo insoddisfacente.

La procedura sintetica alternativa di seguito riportata (schema 5.8), ha consentito di preparare il composto **108** in un unico stadio evitando le operazioni di isolamento e purificazione dell'anidride **103** o del cloruro **105**, di migliorare nettamente le rese e di ridurre tempi di reazione (7-9 ore). Si riduce inoltre notevolmente il verificarsi delle facili reazioni collaterali di polimerizzazione dei composti lipoilici discusse nei capitoli precedenti.



Schema 5.8 – Sintesi (2) dell'N-lipoil-2-amminoetilmetacrilato

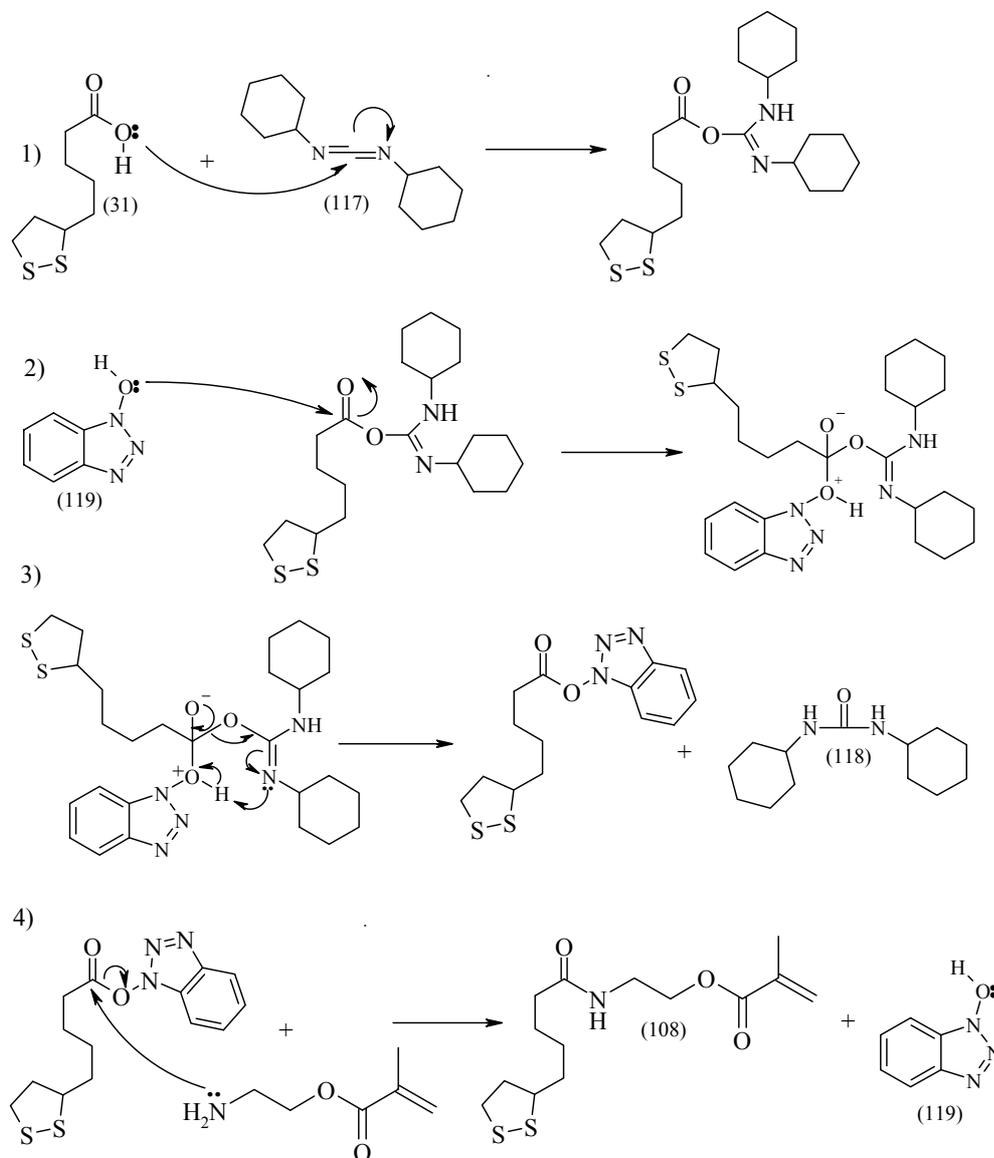
L'aggiunta di un secondo agente condensante, l'1-idrossibenzotriazolo (HOBT) (**119**)^[31], unito alla DCC ha consentito di migliorare ulteriormente sia le rese che i tempi di reazione (schema 5.9).



Schema 5.9 – Sintesi (3) dell'N-lipoil-2-amminoetilmetacrilato

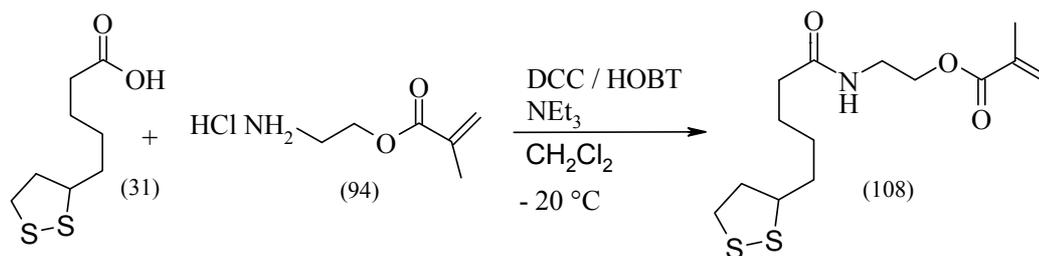
Il meccanismo di reazione (schema 5.10) si basa sull'iniziale attivazione del gruppo carbossilico dell'antiossidante, e la successiva eliminazione di dicicloesilurea per il contemporaneo inserimento dell'N-idrossibenzotriazolo (**119**), che è un ottimo gruppo uscente. In forma di tale intermedio l'acido lipoico

può subire facilmente l'attacco nucleofilo del gruppo amminico del monomero N-amminoetilmetacrilato.



Schema 5.10 – Meccanismo di sintesi dell'*N*-lipoil-2-amminoetilmetacrilato in presenza di HOBT

La reazione analoga eseguita in CH_2Cl_2 anidro ha fornito il composto **108** con una resa superiore (83%) rispetto a quella ottenuta conducendo la reazione in DMF anidro (44%). La temperatura incide invece sulla velocità di reazione che aumenta quando è mantenuta a -20°C , per le stesse ragioni definite per la sintesi dei polimeri PL1 (**115**) e PL2 (**116**).

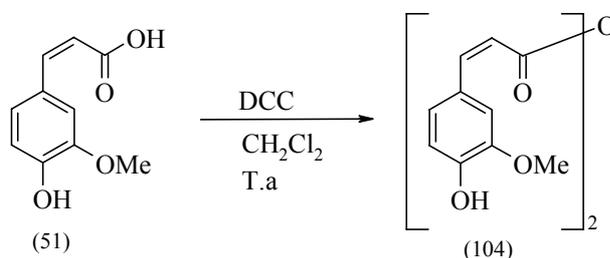


Schema 5.11 – Sintesi (4) dell’N-lipoil-2-amminoetilmetacrilato

Al termine della reazione l’allontanamento del solvente, dopo filtrazione, fornisce un grezzo di reazione di colore giallo scuro sotto forma di olio denso. Il prodotto L-AEM **(108)** viene recuperato dal grezzo dopo estrazioni successive in acetato di etile effettuate rispettivamente con soluzioni acquose acida, basica e neutra per allontanare il sale di trietilammina, l’1-idrossibenzotriazolo **(119)** e l’acido lipoico **(31)** non reagito. Dopo evaporazione a pressione ridotta dell’acetato di etile il prodotto è un liquido giallo e viscoso caratterizzato con analisi GC/MS, IR, $^1\text{H-NMR}$.

5.5 Sintesi del N-2-feruloil-amminoetilmetacrilato (109)

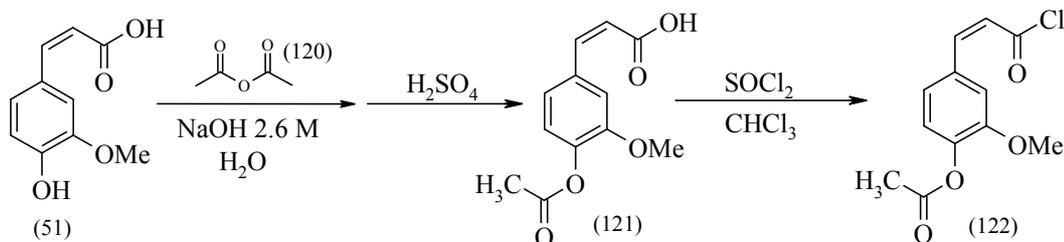
Analogamente alla sintesi del composto **108** la stessa procedura sintetica è utilizzata per la realizzazione del derivato monomerico dell’acido ferulico (N-feruloil-2-amminoetilmetacrilato) (F-AEM) **(109)** a partire inizialmente dai derivati anidride e cloruro feruloilico e successivamente per reazione diretta dell’antiossidante con il monomero AEM **(94)**. La procedura di sintesi della’anidride ferulica **(104)** è di seguito riportata (schema 5.12).



Schema 5.12 – Sintesi dell’anidride ferulica

Il composto è isolato, dopo filtrazione, per allontanamento del solvente a pressione ridotta. È un solido giallo.

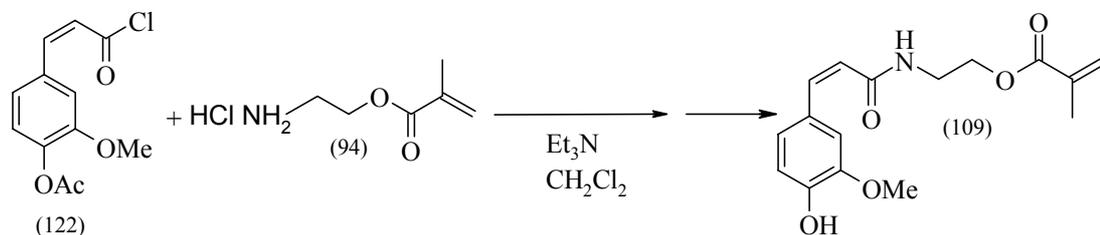
La sintesi del cloruro (**106**) è ottenuta mediante reazione nota in letteratura^[5]. Tale sintesi prevede un'iniziale protezione dell'ossidrilico fenolico per inserimento di un gruppo acetilico (schema 5.13).



Schema 5.13 – Sintesi del cloruro feruloilico

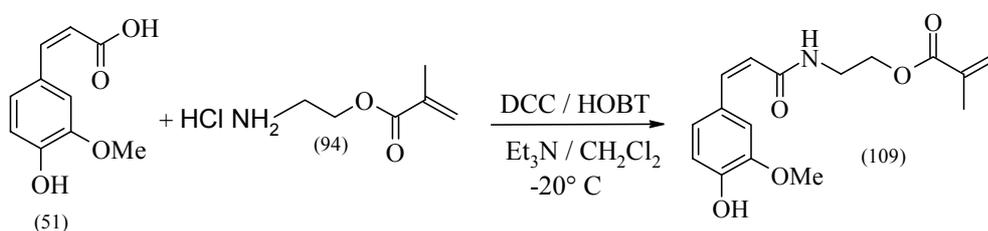
L'aggiunta di anidride acetica (**120**) avviene in acqua basica (NaOH 2.6 M) dopo aver raffreddato la soluzione di acido ferulico ad una temperatura inferiore a 10°C. Dopo aver riportato gradualmente la soluzione ad una temperatura maggiore, prossima ai 20 °C, si aggiungono alcuni ml di una soluzione diluita di acido solforico (< 10%) fino al raggiungimento di pH 4-5; a tale pH si ottiene la precipitazione del prodotto, che è successivamente isolato per filtrazione e lavaggi con acqua distillata. Il prodotto ottenuto è ulteriormente purificato per ricristallizzazione in etanolo. Il prodotto purificato è un solido granulare bianco. (resa 77%). Nella fase successiva di clorurazione, l'acido p-acetilferulico (**121**) è sospeso in un volume di CHCl₃ contenente una quantità catalitica di DMF. A tale sospensione è aggiunto cloruro di tionile. A fine reazione si ottiene una soluzione. Il prodotto **122** sotto forma di cristalli gialli è recuperato per allontanamento del solvente a pressione ridotta (resa 93 %). Tale materiale è utilizzato per la sintesi successiva del derivato polimerizzabile dell'acido ferulico (FAEM) senza ulteriori purificazioni. La reazione di acilazione è fatta avvenire in CH₂Cl₂ alla presenza di un eccesso di trietilammina per 24 ore a temperatura ambiente. A fine reazione il solvente è rimosso per evaporazione a pressione ridotta. Il grezzo di reazione ripreso con acetato di etile è purificato per estrazioni successive con soluzioni acquose acida, basica e neutra costituite rispettivamente con soluzioni sature di KHSO₄, NaHCO₃, e di NaCl. Le fasi organiche sono

successivamente seccate su Na_2SO_4 anidro. Il prodotto è recuperato per allontanamento del solvente a pressione ridotta. (Resa 75%)



Schema 5.14 – Sintesi di *N*-feruloilamminoetilmetacrilato via cloruro

Nonostante le buone rese di reazione, questa sintesi presenta vari passaggi allungando i tempi di reazione. Tempi nettamente inferiori si impiegano facendo reagire direttamente l'antiossidante con il monomero AEM in presenza della coppia di agenti condensanti DCC e HOBT (schema 5.15), in analogia alla sintesi dell'L-AEM.



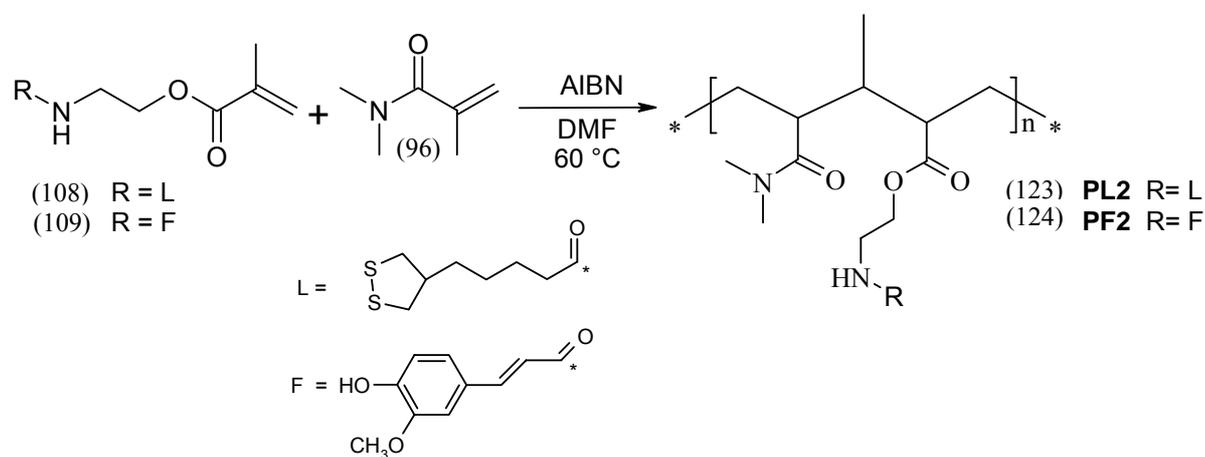
Schema 5.15 – Sintesi di *N*-Feruloilamminoetilmetacrilato direttamente da acido ferulico

Poiché tale sintesi non passa attraverso la protezione dell'ossidrilico fenolico si ottiene una miscela di prodotti secondari in basse percentuali che vengono facilmente allontanati mediante purificazione del grezzo di reazione per cromatografia su gel di silice impiegando come eluente la miscela $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1 vv). Il composto purificato è un liquido viscoso che assume delle colorazioni che vanno dal rosa al marrone chiaro. L' *N*-feruloil-2-amminoetilmetacrilato è ottenuto con rese dell'83% ed è caratterizzato mediante analisi GC/MS, IR e $^1\text{H-NMR}$.

5.6 Copolimerizzazione di L-AEM e F-AEM con DMAA

La polimerizzazione dei monomeri L-AEM e F-AEM con DMAA, nel rapporto molare 1:2, conduce ai polimeri PL2 (**123**) e PF2 (**124**) rispettivamente (schema 5.16). Le reazioni sono state condotte a 60°C per 24 h in DMF anidra e in presenza di azobisisobutirronitrile (AIBN) quale iniziatore radicalico. Come atteso, i prodotti presentano solubilità differenti rispetto a PL1 (**115**) e PF1 (**116**), in quanto L-AEM e F-AEM manifestano comunque attività antiossidanti capaci di bloccare prematuramente la crescita delle catene polimeriche con conseguente formazione di polimeri a basso peso molecolare.

I polimeri ottenuti sono purificati entrambi mediante cicli di dissoluzione/precipitazione dalla coppia solvente/non-solvente DMF-Et₂O. Sebbene siano prodotti diversi, PL2 ed PF2 hanno caratteristiche fisiche analoghe, per esempio si presentano come polveri giallo chiaro facilmente conservabili, solubili in DMF e insolubili in acetone e etere etilico. PL2 è solubile in MeOH e in EtOH, PF2 rigonfia in acqua e in MeOH. Sono caratterizzati mediante analisi spettroscopica IR.

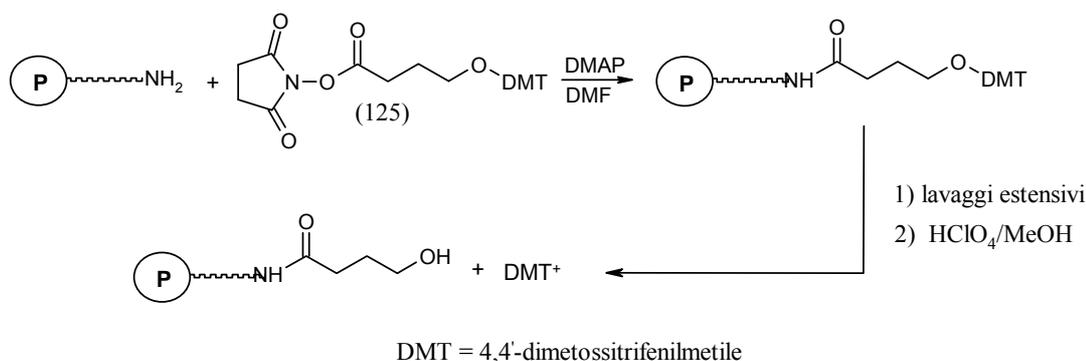


Schema 5.16 – Sintesi dei polimeri PL2 e PF2

5.6 Determinazione del grado di funzionalizzazione dei polimeri PL1 e PF1

Una corretta determinazione del grado di funzionalizzazione prevede il confronto tra il materiale non derivatizzato (P2.1) e quello sottoposto a reazione di acilazione.

Nel corso degli anni sono state sviluppate varie metodologie per la determinazione di gruppi amminici, presenti su materiali polimerici, tutte essenzialmente basate su analisi spettrofotometriche. Gaur e Gupta^[1] hanno presentato un metodo applicabile a diversi tipi di supporto. Questo metodo impiega l'*N*-succinimidil-4-*O*-(4,4'-dimetossitriifenilmetil) butirrato (SDTB) (**125**) o in alternativa il 2,4-dinitrofenil-4-*O*-(4,4'-dimetossitriifenilmetil) butirrato (DDTB) quali agenti acilanti del gruppo amminico libero (schema 5.16). Lo scopo è quello di introdurre, tramite il gruppo amminico libero dei supporti polimerici, un residuo contenente il raggruppamento 4,4'-dimetossitriifenilmetilico (DMT) che viene facilmente liberato per azione di acidi per dare il catione corrispondente. Quest'ultimo viene dosato spettrofotometricamente avendo un coefficiente di estinzione molare di 70000 a 498 nm. Lo schema 5.17 illustra la reazione di funzionalizzazione relativamente all'agente acilante SDTB impiegato nel presente lavoro.



Schema 5.17 – Determinazione dei gruppi amminici secondo Gaur-Gupta

È un metodo facilmente eseguibile ed è stato applicato con successo per determinare il contenuto di gruppi amminici liberi disponibili presenti nel polimero P2.1 e nei polimeri PL1 e PF1 in cui parte di questi gruppi è legata a residui lipoilici o ferluloilici. Le moli di gruppi amminici per grammo di supporto sono calcolate mediante la formula seguente:

$$\text{Moli di gruppi amminici/g di supporto} = \frac{A \cdot V}{P \cdot 70000} \quad (\text{eq. 5.1})$$

A = assorbanza 498 nm

V = volume usato della miscela detritilante (ml)

P = mg del supporto polimerico detritilato

Dall'esame dei risultati ottenuti (tabella 1 in appendice) il grado di funzionalizzazione di PL1 è pari all'85%, ciò significa che la maggior parte dei gruppi amminici è legata a gruppi lipoilici e questo può spiegare la notevole diminuzione della solubilità in solventi polari di PL1 rispetto al polimero base P2.1. Mentre PF1 presenta il 57,5% di gruppi amminici impegnati.

5.8 Determinazione dei gruppi fenolici di PF1 e PF2

Il contenuto di TPC (*total phenolic compounds*) è stato misurato, per tutti i campioni polimerici contenenti residui feruloilici (PF1 e PF2), secondo il metodo Folin-Ciocalteu^[6]. Questo è un metodo colorimetrico basato sul cambiamento di colore che subisce il reagente di Folin-Ciocalteu in presenza di composti fenolici; il reattivo impiegato è una soluzione acquosa di tungstato e molibdato di sodio che reagisce in ambiente basico con specie riducenti come i composti fenolici. Il colore che si sviluppa è dovuto al trasferimento di elettroni dal fenolo al complesso molibdato/tungstato che diventa cromogeno quando i metalli passano ad un più basso stato di ossidazione. L'assorbanza aumenta in modo direttamente proporzionale all'aumentare della concentrazione dei fenoli presenti. Quantità note dei campioni PF1 e PF2 sono fatte reagire con il reattivo in soluzione acquosa di NaCO₃ al 7%. All'aggiunta del reattivo la soluzione diventa immediatamente verde-blu, ciò dà un'immediata conferma della presenza di residui feruloilici sui polimeri analizzati; nella soluzione si forma un precipitato bianco che aumenta all'aumentare della percentuale di carbonato di sodio impiegata. La reazione è condotta al buio per 48 ore. A fine reazione le soluzioni surnatanti sono limpide e di diversa gradazione dall'azzurro al blu in base al contenuto fenolico presente. Per tutti i campioni è valutata l'assorbanza allo

⁶ O. Folin, V. Ciocalteu, *Journal of Biological Chemistry*, (1927) **27**: 627-650.

spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 725 nm. Il calcolo esatto dei gruppi fenolici presenti è effettuato dal confronto dei risultati ottenuti con una retta di taratura costruita facendo reagire quantità molari note di un composto fenolico standard con il reattivo di Folin-Ciocalteu. Il migliore standard per questa analisi è l'acido ferulico libero.

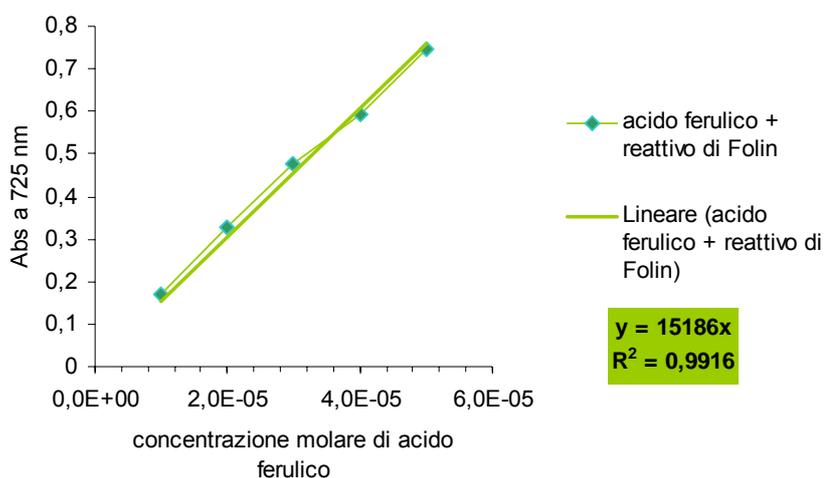


Figura 5.1 : Retta di taratura dello standard Acido Ferulico secondo il metodo di Folin

In base all'assorbanza dei campioni PF1 e PF2 mostrate nelle figure 5.2 e 5.3, si può risalire, dalla equazione lineare determinata con le assorbanze dello standard (Figura 5.1), alle concentrazioni di gruppi ferulici presenti in ciascuna quantità di polimero analizzata (tabella 2 in appendice).

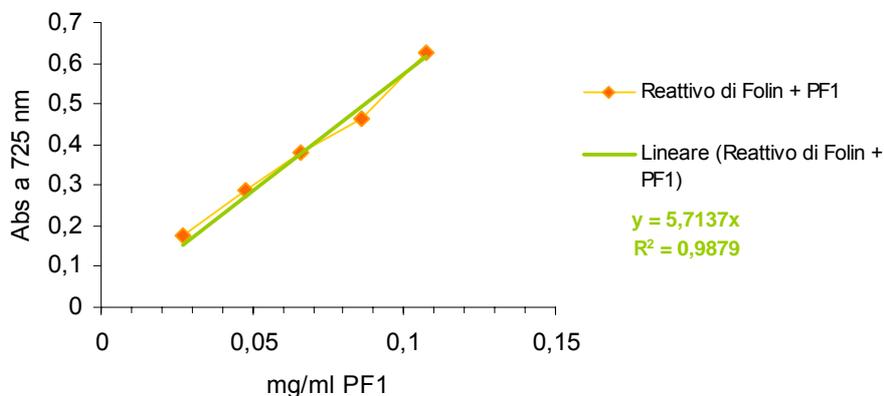


Figura 5.2 : Assorbanza in funzione della concentrazione di PF1 per la determinazione dei gruppi fenolici secondo il metodo di Folin

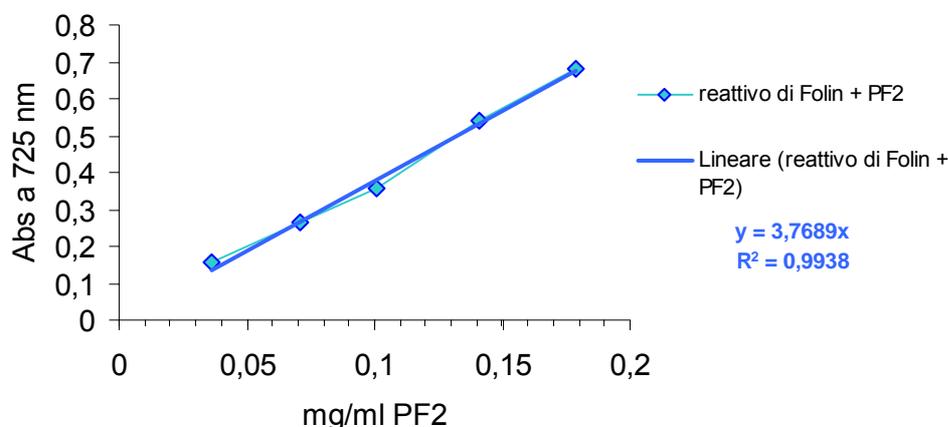


Figura 5.3 : Assorbanza in funzione della concentrazione di PF1 per la determinazione dei gruppi fenolici secondo il metodo di Folin

Il polimero PF1 è costituito da circa il 6,7% in peso dai gruppi feruloilici, cioè $3,78E-4$ moli di gruppi fenolici sono presenti in 1 grammo di polimero, mentre per PF2 si stima una percentuale in peso di gruppi feruloilici di circa 4,8%, cioè $2,71E-4$ moli di gruppi fenolici per grammo di polimero.

5.9 Determinazione dei gruppi tiolici di PL1 e PL2

Per i polimeri PL1 e PL2 è possibile determinare quantitativamente il contenuto di residui di acido lipoico attraverso la determinazione dei gruppi tiolici. Esistono vari metodi spettrofotometrici di determinazione di tioli, come il metodo iodometrico o mediante reattivi cromogeni come il PDS (2,2' o 4,4'-ditiopiridina)^[7-8] o il DTNB^[9] (acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico o reattivo di Ellman) **(128)**). Prima di effettuare l'analisi è necessario ridurre a tioli liberi il ponte disolfuro intermolecolare dei residui lipoilici sui polimeri attraverso un agente riducente. Il NaBH_4 non può essere applicato, perché riduce anche il legame estereo presente nei polimeri, è necessario quindi un agente riducente

⁷ D.R. Grassetto, J.F.Murray, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1967; **119**: 41-49

⁸ Innocent O. C. Egwim and Hermann J. Gruber, *Analytical Biochemistry*, 2001; **288**: 188-194

⁹ Min Le and Gary E.Means, *Analytical Biochemistry*, 1995; **229**: 264-271

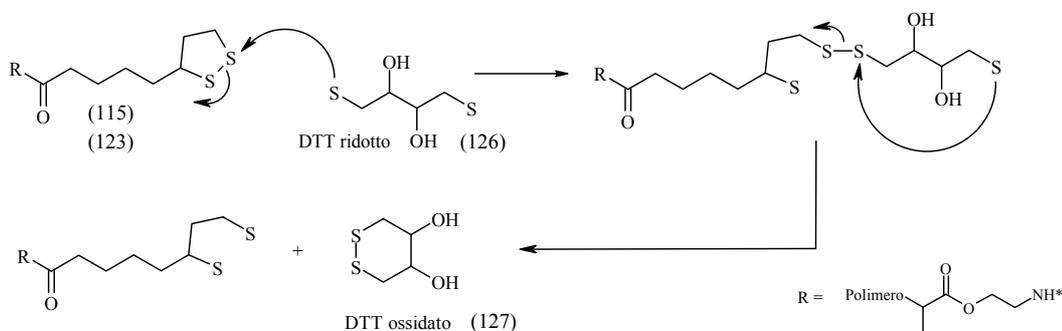
¹⁰ M.Bilieie, J. Filipovici-Griè et al. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; **291**: 211-219

¹¹ W.W. Cleland, *Biochemistry*, 1964; **3(4)**:480-482

selettivo per i ponti disolfuro, come il DTT^[9-11] (1,4-D,L-ditiotreitolo o reattivo di Cleland) (**126**), ampiamente impiegato per la conversione delle cistine in cisteine o per il mantenimento in biologia molecolare di uno stato redox dei gruppi tiolici; un altro agente riducente impiegabile è il TCEP (Tris(2-carbossietil)fosfina cloridrato).

5.9.1 Riduzione dei ponti disolfuro con DTT

Per la fase di formazione di gruppi tiolici liberi, una quantità di polimeri PL1 e PL2 (200 mg) è stata trattata con l'agente riducente DTT in una soluzione di tampone fosfato a pH 7,00 diluita con acqua bidistillata alla temperatura di 40°C per 2 ore.



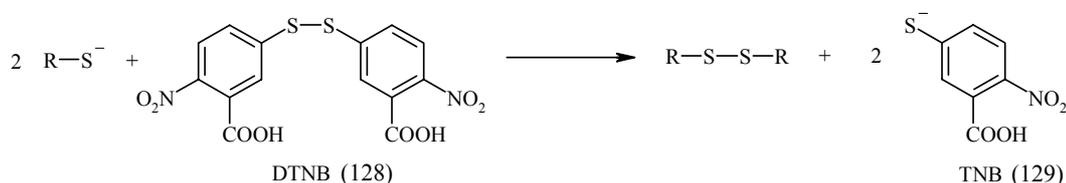
Schema 5.18 – Riduzione dei ponti disolfuro di PL1 e PL2 con DTT

A fine reazione la sospensione del polimero è concentrata per centrifugazione e ricostituita con acqua bidistillata. I cicli di lavaggio sono ripetuti fino alla completa rimozione dell'eccesso di DTT ridotto (**126**) e del DTT ossidato (**127**) (il totale consumo di acqua bidistillata è pari a 200 ml); la presenza di DTT nell'acqua di lavaggio è controllata per reazione con DTNB discussa in seguito. Gli ultimi lavaggi sono stati effettuati con acetone ed etere etilico ed i polimeri sono stati seccati bene per evaporazione dei solventi a pressione ridotta per 5 ore. L'allontanamento dell'agente riducente DTT può essere effettuato anche mediante dialisi.

5.9.2 Determinazione dei tioli liberi con DTNB

Il grado di tioli liberi presenti sui polimeri PL1 (**115**) e PL2 (**123**) è stato determinato facendo reagire i tioli liberi con DTNB (**128**) (reagente di Ellman) e confrontando le assorbanze ottenute per i polimeri con quelle ottenute per concentrazioni note di un composto tiolico standard: L-cisteina.

Una molecola di DTNB in presenza di gruppi tiolici liberi si riduce generando la formazione di un ponte disolfuro nei composti da analizzare e scindendosi in due molecole cromogene di TNB (**129**) (acido 5-tio-2-nitrobenzoico) secondo lo schema 5.19.



Schema 5.19 – Determinazione di tioli con DTNB

Il TNB (**129**) che si forma assorbe alla lunghezza d'onda di 412 nm. La retta di taratura delle assorbanze della cisteina in funzione delle concentrazioni note analizzate (figura 5.4) è stata costruita utilizzando una soluzione acquosa di cisteina 0,01 M a pH 8 per la presenza di tampone fosfato ed una soluzione metanolica di DTNB 0,02 M (tabella 3 in appendice). Volumi crescenti in microlitri della soluzione di cisteina 0,01 M sono stati addizionati separatamente a soluzioni di tampone fosfato a pH 8 contenenti ciascuna 1000 μl della soluzione di DTNB 0,02 M. tali soluzioni analitiche sono successivamente portate al volume finale di 25 ml per aggiunta di soluzione tampone fosfato 1 M a pH 8. La reazione di ossidoriduzione fra la cisteina e il DTNB produce immediatamente un'intensa colorazione gialla, dovuta alla formazione del TNB. Tale colorazione tende all'arancio quanto più alta è la concentrazione dei tioli. Dopo 3 ore dall'inizio della reazione è effettuata l'analisi delle soluzioni descritte allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm utilizzando come bianco una soluzione (25 ml) di tampone fosfato 1 M a pH 8 addizionata di 1000 μl di DTNB 0,02 M in MeOH.

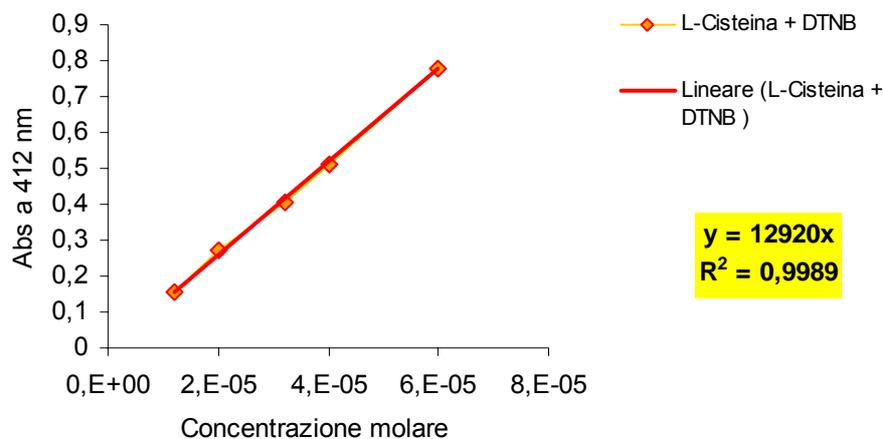


Figura 5.4 – Retta di taratura dello standard L-cisteina

La stessa procedura analitica è stata effettuata per varie quantità dei campioni polimerici trattati precedentemente con l'agente riducente DTT. Quantità precise in mg (tabella 3 in appendice) dei polimeri PL1 e PL2 sono state pesate e sospese in 25 ml di soluzioni di tampone fosfato 1 M a pH 8 contenenti 1000 μ l della soluzione metanolica di DTNB 0,02 M. La presenza di gruppi tiolici liberi è osservabile anche in questo caso dall'origine della caratteristica colorazione gialla del saggio. Dopo tre ore si effettua l'analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 412 nm. Dalle assorbanze misurate, mediante l'equazione lineare ottenuta con la retta di taratura dello standard, è possibile calcolare la quantità molare di gruppi tiolici per grammo di polimero. La quantità molare di gruppi lipoilici corrisponde esattamente alla metà del valore calcolato.

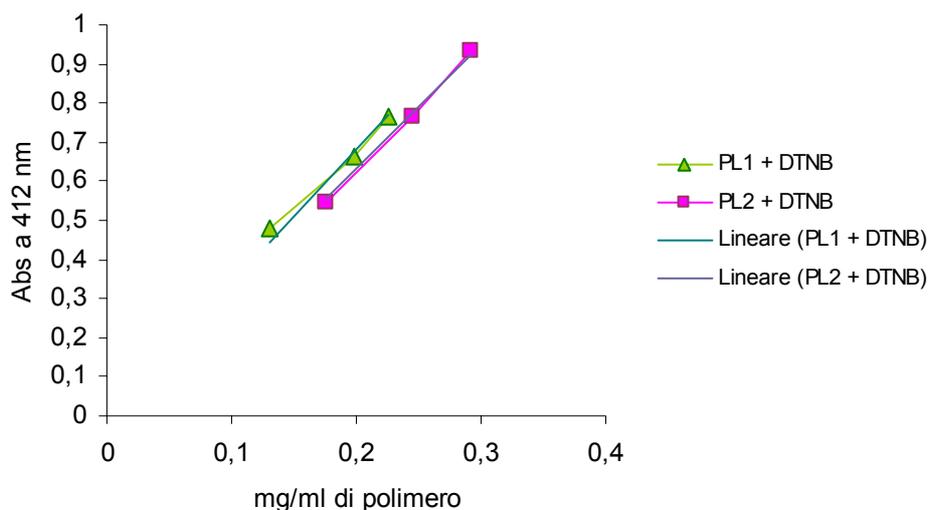


Figura 5.5 - Assorbanza in funzione della concentrazione di PL1 e PL2 per la determinazione dei gruppi tiolici con il reattivo di Ellman

Il numero di moli di gruppi tiolici liberi calcolati per grammo di polimero PL1 è pari a 2.6×10^{-4} (moli di residui lipoilici/ g di PL1 = 1.3×10^{-4}), mentre le moli di gruppi tiolici per grammo di PL2 sono pari a $2,4 \times 10^{-4}$ (moli di residui lipoilici / g di PL2 = 12×10^{-4}).

5.10 Valutazione dell'attività antiossidante

Un obiettivo primario del presente lavoro è la stima dell'attività antiossidante di tutti i prodotti polimerici sintetizzati. Fra i numerosi metodi discussi nel capitolo 3, sono stati attualmente impiegati a tale scopo l'analisi della efficienza protettiva contro la perossidazione lipidica su membrane microsomiali ed il test del DPPH.

5.10.1 Inibizione della perossidazione lipidica

La capacità di inibire la perossidazione lipidica dei polimeri sintetizzati è esaminata su membrane microsomiali di fegato di ratto^[12]. Queste, costituite da fosfolipidi ad elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi, rappresentano il substrato ideale del processo di perossidazione lipidica. Durante tale reazione,

¹² G.M.Batoli, B.Giannattasio, P.Palozza, A.Cittadini, *Biochem. Biophys. Acta*, (1988) **966**: 214-221

infatti, gli acidi grassi vengono trasformati in metaboliti tossici come le aldeidi. In particolare la malondialdeide (MDA) (**85**) è generata in modo relativamente costante e rappresenta, quindi, un buon indicatore della velocità di perossidazione^[13].

Al fine di mimare il processo della perossidazione è stato impiegato un agente proossidante, il terbutilidroperossido (TBOOH), che catalizza la formazione di radicali idrossilici ($\cdot\text{OH}$) responsabili della stessa perossidazione. Le membrane microsomiali sono state incubate in presenza di TBOOH (250 μM) all'aria e al buio. La diversa formazione di MDA in assenza e in presenza dei polimeri è un indice degli effetti protettivi antiossidanti dei composti sintetizzati. In particolare è stata valutata a vari tempi l'attività di campioni di PL1 e PF1 preparati con identiche quantità in peso.

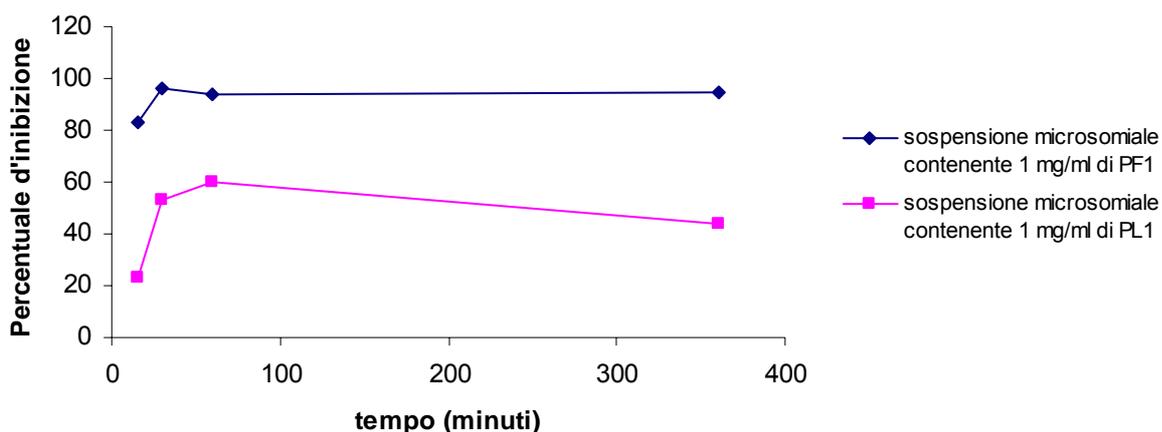


Figura 5.6 - Inibizione della perossidazione lipidica su membrane microsomiali di fegato di ratto di sospensioni 1mg/ml di PF1 e PL1

La figura 5.6 mostra gli effetti di inibizione sulla produzione di MDA dei polimeri testati. I risultati ottenuti mostrano che il polimero con residui feruloilici è molto più attivo del polimero PL1, sebbene presenti a parità di peso un minor numero di moli di gruppi antiossidanti. Tutti e due i polimeri arrivano ad un massimo di potenza antiossidante dopo pochi minuti dal contatto con le specie reattive e poi tale potenza inizia a decrescere con il tempo per PL1, mentre l'attività di PF1 si

¹³ V.L.Tatum, C.Changoit, C.K.Chow, *Lipids*, (1990) **25**: 226-229.

mantiene pressoché costante ed invariata nel tempo. Gli stessi esperimenti condotti sui sistemi PL2 e PF2 (figura 5.7) mostrano dati di inibizione della perossidazione lipidica confrontabili a quelli ottenuti per PL1 e PF1. In figura 5.8 sono riportati i risultati ottenuti per gli antiossidanti acido lipoico e ferulico.

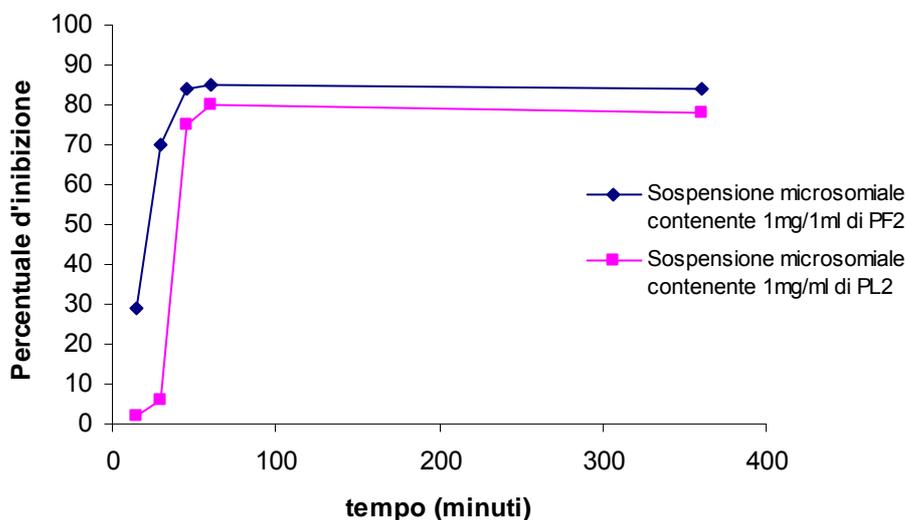


Figura 5.7- Inibizione della perossidazione lipidica su membrane microsomiali di fegato di ratto di sospensioni 1mg/ml di PF2 e PL2

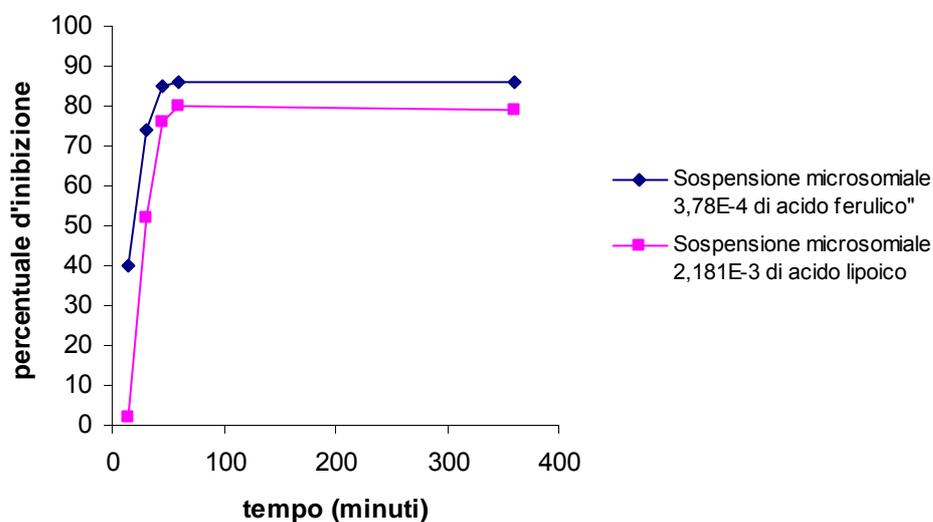


Figura 5.8 - Inibizione della perossidazione lipidica su membrane microsomiali di fegato di ratto di sospensioni 3,78E-4 di acido ferulico e 2,181E-3 di acido lipoico

5.10.2 Inibizione diretta di specie radicaliche

L'attività sequestrante di radicali dei polimeri PL1, PL2, PF1 e PF2 è stata misurata mediante un noto metodo che utilizza un composto radicalico, il radicale

1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH) (**89**). A causa del suo elettrone spaiato, il radicale picrilidrazilico mostra una forte banda di assorbimento a 517 nm, assumendo una colorazione viola. Quando questa specie radicalica viene catturata dall'antiossidante, l'assorbimento diminuisce e la risultante decolorazione è direttamente proporzionale rispetto al numero di radicali catturati. Una soluzione madre di DPPH a concentrazione nota è usata come controllo. L'assorbimento di tale soluzione è valutata spettrofotometricamente in assenza e in presenza di quantità note e crescenti dei polimeri da analizzare (figure 5.9-5.12). Per valutare l'eventuale variazione del potere antiossidante dei polimeri rispetto agli antiossidanti liberi, il test è stato effettuato anche su quantità crescenti di acido lipoico e di acido ferulico (figure 5.13; 5.14).

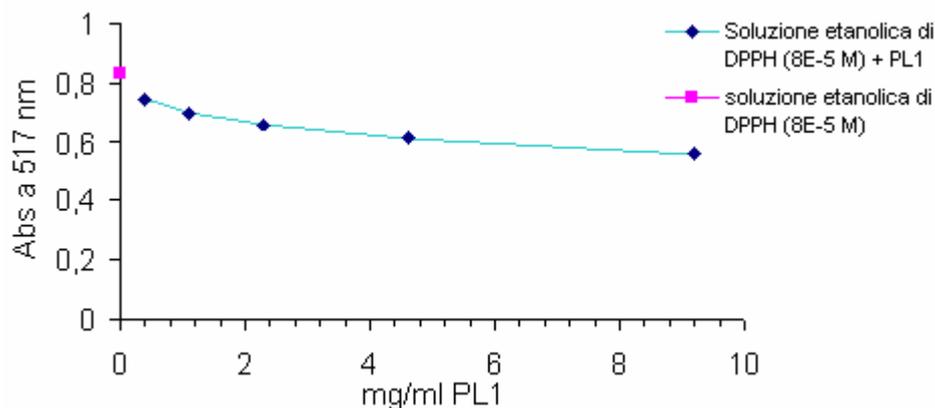


Figura 5.9 - DPPH Test Assorbanza di PL1

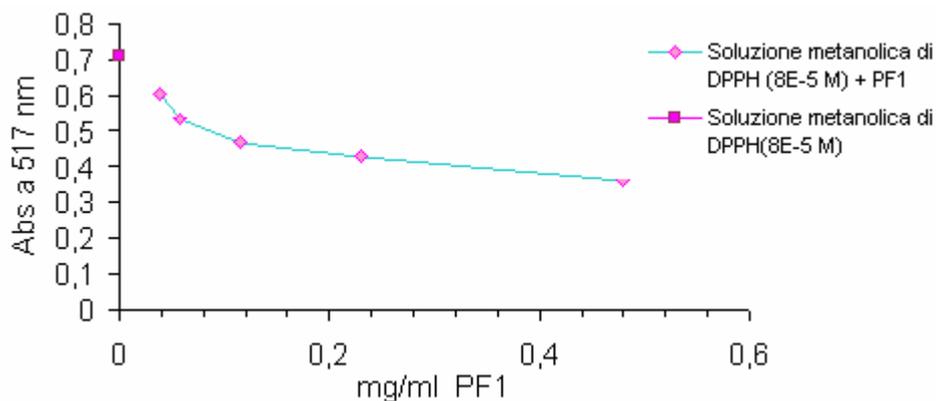


Figura 5.10 - DPPH Test - Assorbanza di PF1

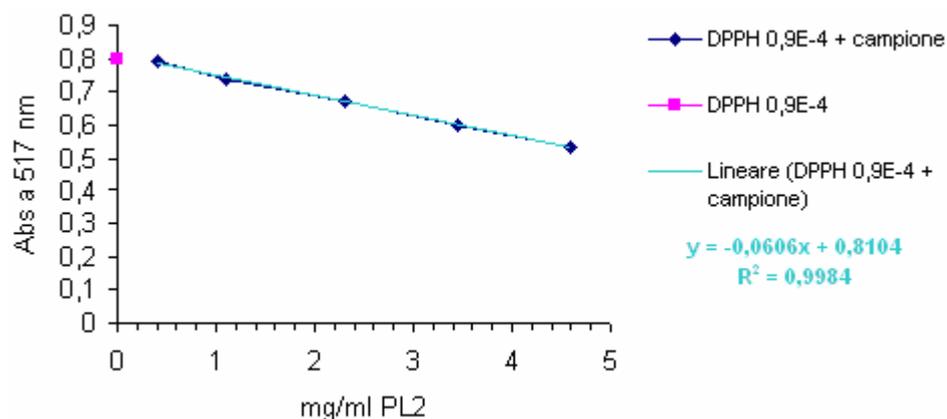


Figura 5.11 - DPPH Test –Assorbanza di PL2

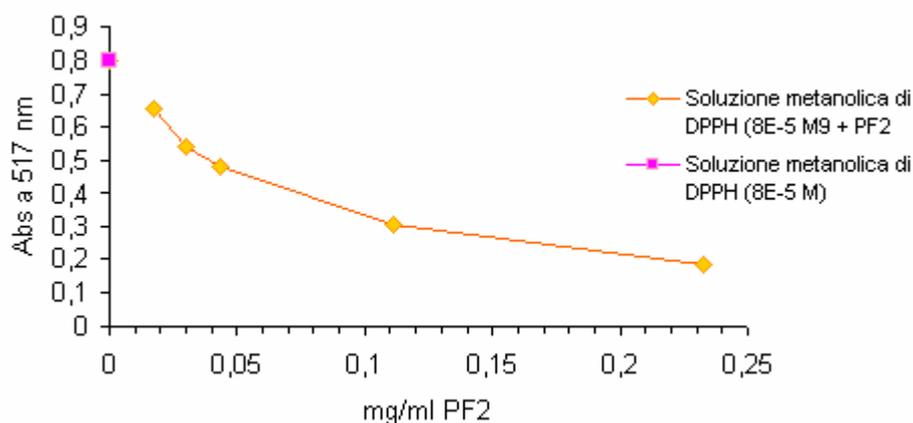


Figura 5.12- : DPPH Test -Assorbanza di PF2

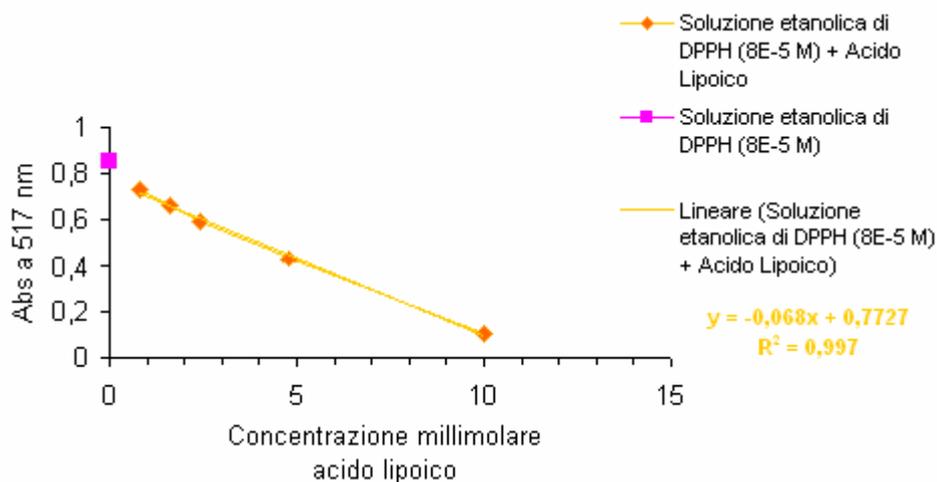


Figura 5.13 - DPPH Test –Assorbanza di acido lipoico

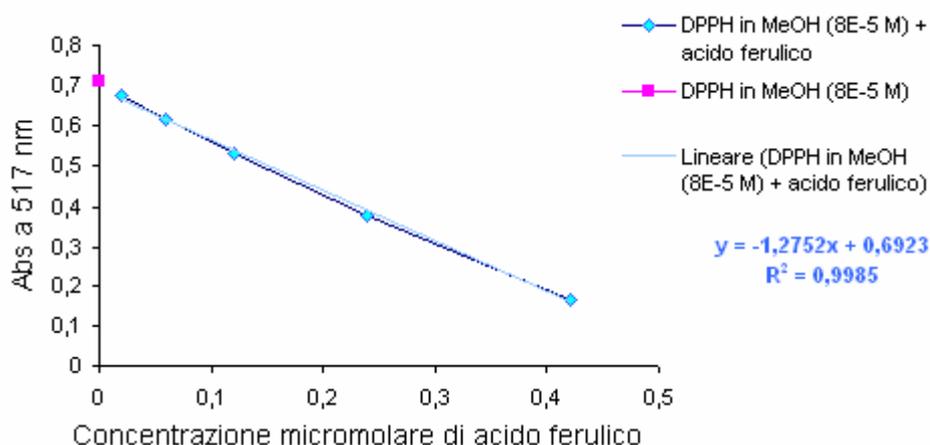


Figura 5.14 - DPPH Test -Assorbanza di acido ferulico

L'attività antiossidante è misurata come percentuale d'inibizione (PI), calcolata secondo la formula:

$$PI = 1 - (\text{Abs Campione}) / \text{Abs DPPH}$$

Sono riportati di seguito le percentuali d'inibizione di ciascun campione analizzato (figure 5.15)

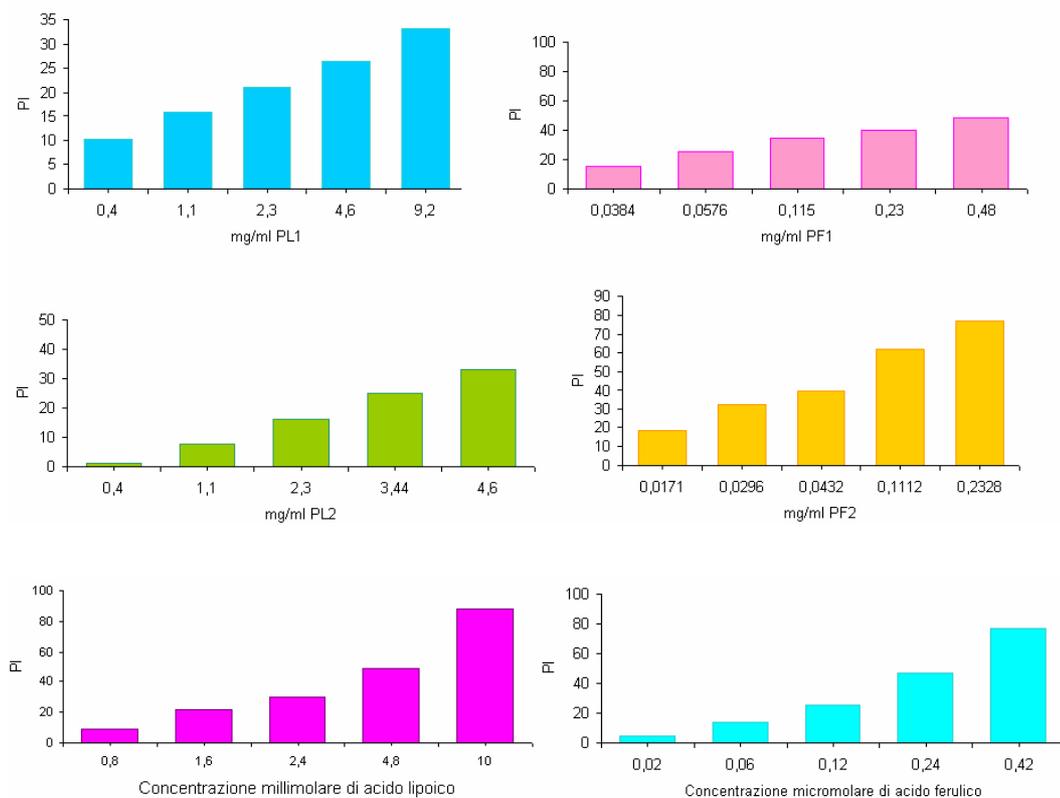


Figura 5.15 - DPPH Test -Percentuali d'inibizione di PL1 - PF1 - PL2 - PF2 - acido lipoico e acido ferulico

I risultati ottenuti confermano la presenza di attività antiossidante in tutti i polimeri sintetizzati. Analogamente a quanto avviene per la perossidazione lipidica anche in questo caso l'acido ferulico ed i polimeri che lo contengono sono più attivi rispetto all'acido lipoico e i polimeri derivati. A parità di residui feruloilici è stata osservata una maggiore attività antiossidante per PF2 rispetto a PF1. Al contrario, per i polimeri PL1 e PL2 l'attività non varia apprezzabilmente.

CAPITOLO VI

SVILUPPO DI POLIMERI CAPACI DI REAGIRE CON GRUPPI FUNZIONALI CHERATINICI

6.1 Introduzione

Durante l'evoluzione l'uomo ha sempre fatto molta attenzione alla sua capigliatura, tanto che nel tempo il modo di acconciare i capelli ha assunto una particolare e diversa importanza nei rapporti sociali e nel costume delle varie civiltà. I prodotti attualmente in commercio per la cura e o per modificare l'aspetto dei capelli sono numerosissimi e di certo pesano enormemente sull'economia generale dell'intero settore cosmetico. L'idea di utilizzare molecole polimeriche in tali prodotti è già stata applicata; polimeri N-vinil imidazolici, polietilenici, polimeri solfonati, poliacetilenici, polisaccaridici, poliacrilici, polimetacrilici e poliamminici fanno già parte di molte preparazioni cosmetiche per capelli con azione modellante, fissante e decolorante, i cui processi di preparazione e le corrispondenti composizioni non sono del tutto note perché coperte da brevetto ^[1-9].

Al settore cosmetico per capelli sono attribuite alcune problematiche legate sostanzialmente alla carenza di alcuni prodotti quali filtri UV e prodotti volumizzanti efficienti, e alla potenziale tossicità dei composti coloranti impiegati nelle tinture permanenti. La fotoprotezione dei capelli attualmente ottenuta con i filtri UV tradizionali si presenta come un problema di non facile soluzione, innanzitutto per l'incapacità del filtro solare di aderire alla cuticola del capello,

¹ D.Pretty paul, ISP INVESTMENTS INC (US), Patent n.:US6566473; 20-05-2003;

² F Giroud., A. Livoreil et al., OREAL (FR), Patent n.: FR2833600; 20-06-2003;

³ S.Midha, P. M. Torgerson et al.; PROCTER & GAMBLE; Patent n.:TW397690; 11-07-2002;

⁴ R.Banfic, B.Deubzer et al; WACKER CHEMIE GMBM; Patent n.:DE10036699; 07-02-2002;

⁵ E.Lheureux, B.Biatry; OREAL; Patent n.:FR2832630; 30-05-2003;

⁶ M.Devie, E.Calmant; OREAL; Patent n.:FR2832062; 16-05-2003;

⁷ K.Nakamura, J-Z. Yang; PROCTER & GAMBLE; Patent n.:WO03020228; 13-03-2003;

⁸ W.Dausch, K.S.Nguyen; BASF AG (DE); Patent n.: DE10129528; 09-01-2003;

⁹ M.Detert, A.Koller, BEIERSDORF AG (DE); Patent n.: DE19943437; 15-03-2001;

secondariamente perché il filtro solare applicato in maniera corretta danneggia l'aspetto del capello rendendolo opaco o grasso; mentre il problema legato agli attuali prodotti volumizzanti, non è tanto relativo alla loro efficienza quanto alla loro incapacità di mantenerla per un prolungato periodo di tempo. Un altro problema del settore cosmetico è relativo alla discussa tossicità dei composti usati nelle tinture permanenti; Negli ultimi cento anni la gamma delle tinture permanenti è stata arricchita da copiosi composti fra cui notevole rilevanza hanno le p-fenilendiammine e i p-amminofenoli come intermedi primari e gli 1-naftoli, m-diammine, resorcinoli, pirazoloni quali copulanti di prima generazione, e combinazione di seconda generazione quali per esempio 4-ammino-3-metilfenolo/5-ammino-2-metilfenolo/2,5-diamminotoluene o N,N-bis(2-idrossietil)-p-fenilendiammina/1-naftolo^[10]. Tuttavia, nonostante gli enormi sforzi nella ricerca di composti coloranti sempre migliori molti di essi e in particolare i costituenti delle tinture permanenti sono risultati fortemente tossici. Studi sempre più numerosi mostrano non solo una loro attività allergenica (dermatite da contatto), ma anche più gravi attività, che si manifestano dopo loro assorbimento, come quella cancerogena e necrotica (tumore al seno, tumore alla vescica nell'uomo, necrosi muscolare nei ratti, ecc.)^[11-19].

A scopo cautelativo degli operatori del settore e dei milioni di persone fruitrici di tinture per capelli il Ministero della salute, con la legge dell'11 ottobre del 1986 numero 713 e successive modifiche, ha imposto delle misure fortemente restrittive sull'uso della maggior parte dei composti per tinture permanenti.

¹⁰ John.F.Corbett, *Dyes and Pigments*, 1999; **41**: 127-136;

¹¹ M.C.Yu, P.L.Skipper et al., *Mutation Research*, 2002; **506**: 21-28;

¹² L.Motz-Schalck, J.Lemaire, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2002; **147**: 225-231;

¹³ F.Chen, S. Oikawa et al., *Cancer Letters*, 1998; **126**: 67-74;

¹⁴ T. Zheng, T.R.Holford et al, *European Journal of Cancer*, 2002; **38**: 1647-1652;

¹⁵ R.Munday and E.Manns, *Food and Chemical Toxicology*, 1999; **37**: 561-564;

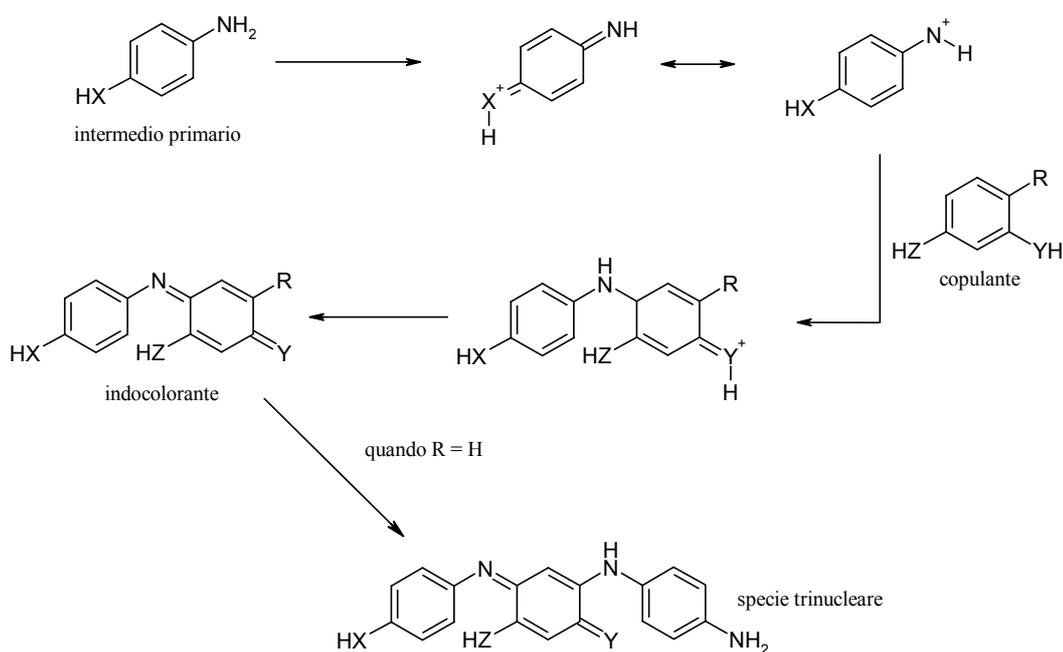
¹⁶ C. Nagata, H.Shimizu et al, *Leukemia Research*, 1999; **23**: 57-62;

¹⁷ S.F. Altekruze, S.J.Henley et al, *Cancer Causes and Control*, 1999; **10**: 617-625;

¹⁸ L.S.Cook, E.Malone, J.R.Daling et al., *Cancer Causes and Control*, 1999; **10**: 551-559;

¹⁹ M.Gago-Dominguez, J.E.Castelao et al., *Int. J. Cancer*, 2001; **91**: 575-579;

Il meccanismo di colorazione delle tinture permanenti ^[20-22] prevede infatti una iniziale applicazione di intermedi primari, molecole che, per piccole dimensioni, penetrano facilmente all'interno della struttura del capello agevolate dalla presenza di ammoniaca e che subiscono successivamente una ossidazione in situ in modo che in forma ossidata sono reattive con altri composti: le molecole copulanti che sono applicate in un secondo tempo secondo lo schema di reazione di seguito riportato.



Schema 6.1 – Meccanismo di colorazione delle tinture permanenti

Il presente studio nasce dalla collaborazione con il consorzio RTC e pertanto si propone la sperimentazione ed eventualmente il miglioramento dell'efficacia di un polimero brevettato da Matteo Zanotti Russo e Nicola Barbini e d'altra parte si propone la progettazione e la realizzazione di sistemi polimerici simili che possano risolvere le problematiche fin qui discusse. La ricerca condurrà alla realizzazione di polimeri caratterizzati da gruppi funzionali capaci di reagire con le fibre cheratiniche, in modo diverso dal polimero brevettato che sarà descritto in

²⁰ J.F. Corbett, *J. Chem.Soc Perkin Trans II*, 1975; 539-548;

²¹ J.F. Corbett, S.Pohl, I.Rodriguez, *J. Chem.Soc Perkin Trans II*, 1975; 728-734;

²² K.C.Brown, J.F. Corbett, *J. Chem.Soc Perkin Trans II*, 1981; 886-889;

seguito, e/o con altri composti importanti nella cosmetologia del capello, come antiossidanti, brillantanti, ecc.

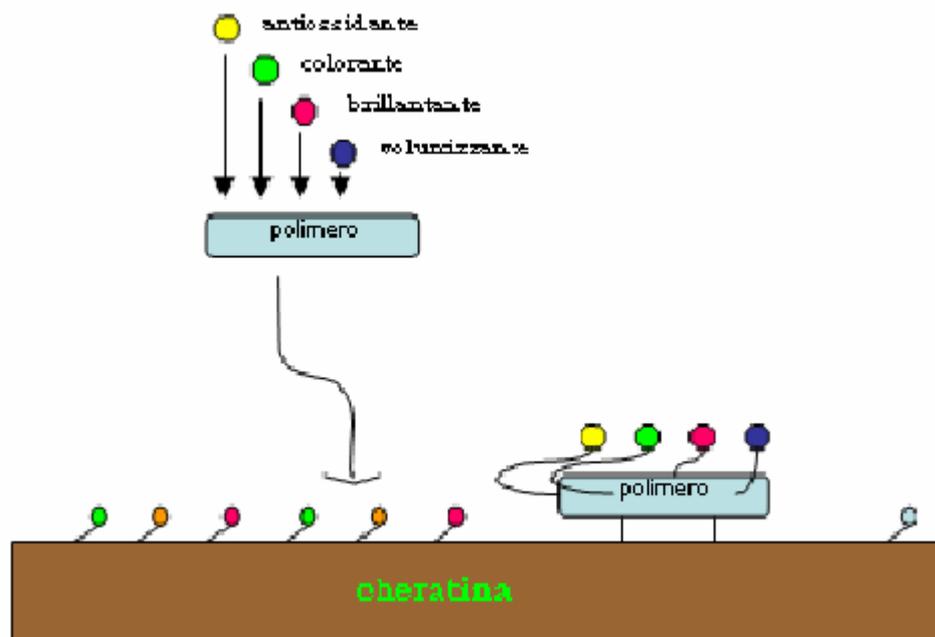


Figura 6.1 – Struttura generica di polimeri veicolanti sostanze funzionali

La loro capacità di veicolare sul capello antiossidanti si colloca nell'importante prospettiva di ottenere la formazione di innovativi e più efficienti filtri UV per capelli; se i composti da veicolare sono coloranti, tali polimeri potrebbero essere impiegati come tinture ad alto peso molecolare, che non essendo capaci di diffondere attraverso la cute, potrebbero essere considerati come un'ottima alternativa alle tinture permanenti attualmente in uso.

Caratteristica peculiare ed innovativa di tali sistemi sarebbe da attribuire alla loro capacità di formare legami covalenti con la cheratina del capello. E' chiaro che nella progettazione di tali sistemi polimerici si deve tener conto delle esigenze relative alla scarsa tossicità sia dei materiali da impiegare che di quelli che si formano durante la reazione, sia delle blande condizioni di reazione che ne permettano una facile applicazione. Poiché la reazione deve avvenire *in vivo* il polimero dovrà manifestare la sua reattività a pressione atmosferica, in un range limitato di temperatura (prossima a quella corporea), in solventi accettabili come

l'acqua o l'etanolo. Considerando tutte queste condizioni la progettazione del polimero è strettamente correlata alla struttura della cheratina con la quale deve legarsi covalentemente. La sua progettazione inizia infatti dall'attenta valutazione dei gruppi funzionali presenti sui residui degli aminoacidi cheratinici. In base al gruppo aminoacidico, individuato per maggiore reattività e/o disponibilità, verrà scelto successivamente il composto polimerizzabile con esso reattivo nel rispetto delle condizioni di reazione poc'anzi citate.

6.2 Valutazione dei gruppi funzionali cheratinici

Dall'analisi dei 18 aminoacidi della cheratina ne sono stati selezionati solo alcuni per la presenza di interessanti gruppi funzionali, quali i gruppi carbossilici dell'acido glutammico (130), ossidrilici della serina (131) e della treonina (132) e guanidinici dell'arginina (133), amminico della lisina (134) e tiolico della cisteina (135), le cui strutture sono di seguito riportate nella figura 6.2

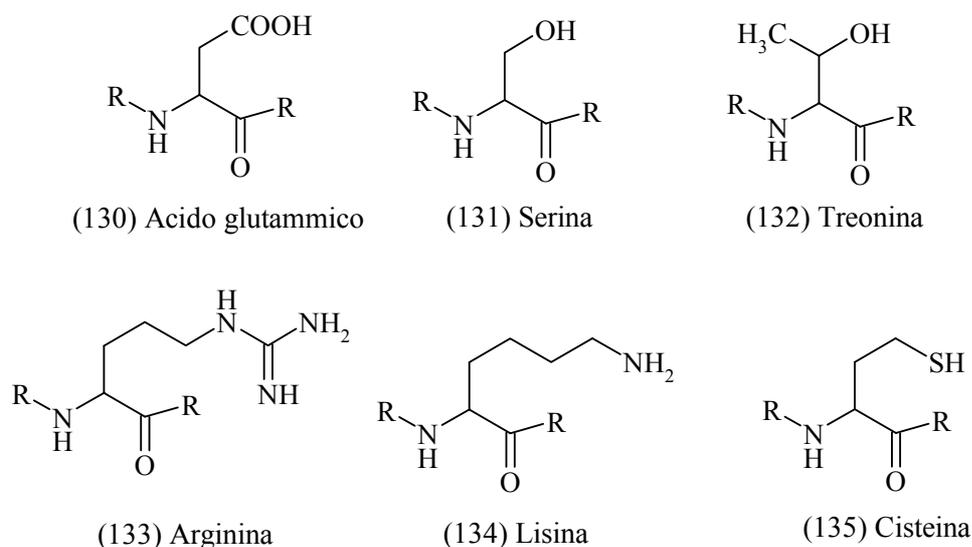
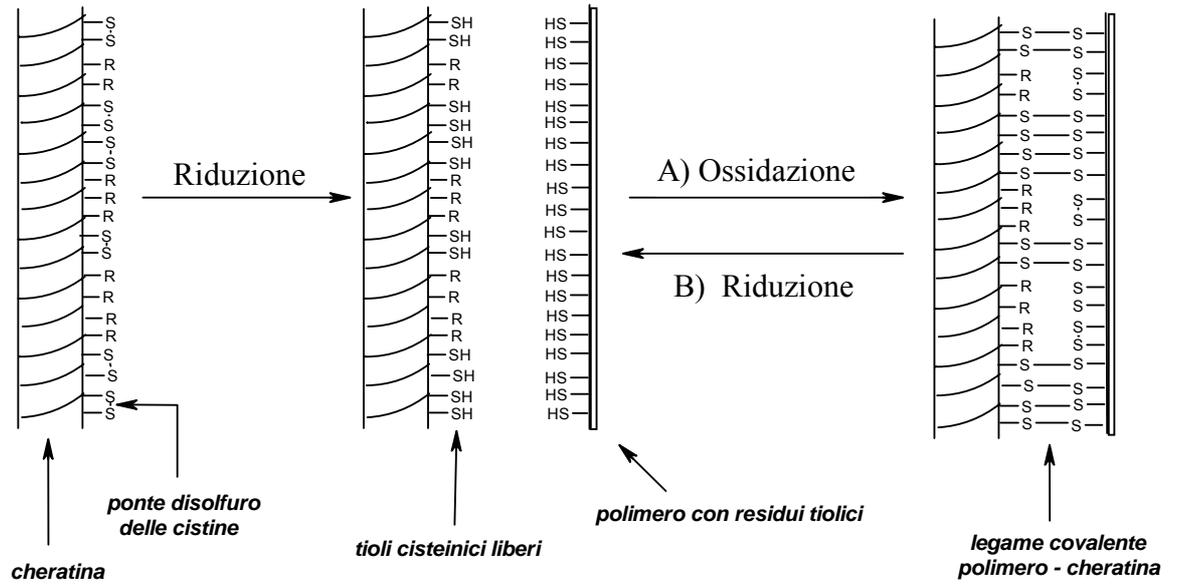


Figura 6.2 – Struttura di alcuni aminoacidi

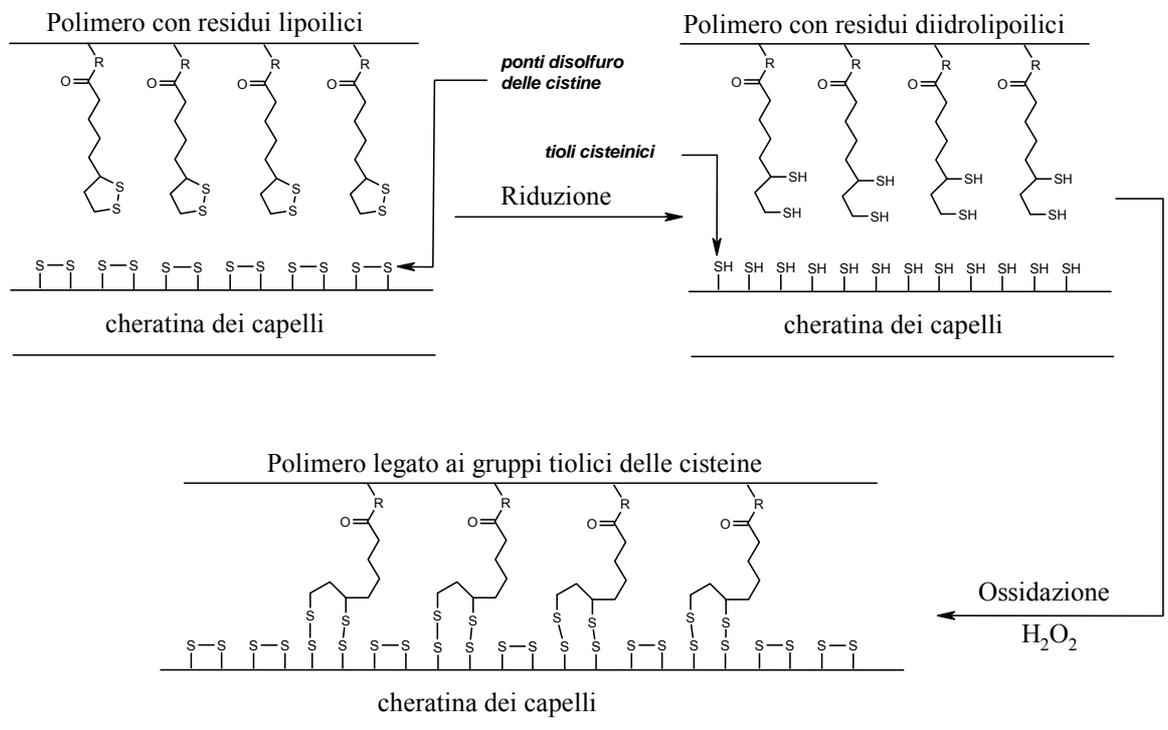
Una attenta ricerca bibliografica suggerisce che, tra tutti questi gruppi funzionali, i gruppi amminici ed i gruppi tiolici dovrebbero offrire una maggiore possibilità di formare legami covalenti a seguito di reazioni in condizioni blande. Il gruppo amminico della guanidina non è però da tenere in considerazione, perché non sono note in letteratura reazioni che lo rendono applicabile per il presente lavoro.

6.2.1 Gruppi tiolici delle cisteine

La cisteina è l'amminoacido più abbondante nella cheratina dei capelli ed è fondamentale per la struttura del capello; tuttavia ciò che si trova in altissima percentuale è la cistina, dovuta all'unione di due cisteine attraverso la formazione di un legame S-S, quindi la maggior parte dei gruppi tiolici è impegnata nella formazione di ponti disolfuro, con conseguente caduta della potenziale reattività di questi gruppi. In ogni caso rompere i ponti disolfuro è possibile, infatti è ciò che avviene quando si rida' forma al capello con le "permanenti" dove gli originari ponti disolfuro sono rotti e dei nuovi ponti disolfuro sono creati. Tuttavia una drastica riduzione delle cistine porterebbe ad una eccessiva modificazione strutturale del capello, per cui bisognerebbe utilizzare degli agenti riducenti blandi che reagiscano preferibilmente solo con le cistine superficiali, come l'acido tioglicolico. La possibilità di proporre un meccanismo di reazione che già avviene in modo naturale o che in ogni caso è chimicamente testato con le permanenti, fa strada all'immagine di un polimero con residui tiolici capaci di generare nuovi legami S-S con i tioli cisteinici. In questo modo molecole polimeriche potrebbero legarsi covalentemente al capello (schema 6.2 -A). Oltre la stabilità chimica, un grande vantaggio attribuibile ad un legame disolfuro è la reversibilità, cioè la possibilità di rimuovere il polimero attraverso una riduzione dei nuovi legami S-S polimero-cheratina generati (schema 6.2 – B). Un composto contenente zolfo è l'acido lipoico che per riduzione del suo ponte disolfuro intramolecolare si converte in acido dididrolipoico con formazione di due gruppi tiolici liberi. Il suo inserimento in matrici polimeriche è stato ampiamente discusso nei capitoli precedenti, ma in questo contesto diventa interessante non tanto per la sua attività antiossidante quanto per i gruppi tiolici disponibili per una reazione polimero-cisteine (schema 6.3).



Schema 6.2 – Formazione di legami covalenti polimero – cheratina per reattività di gruppi tiolici



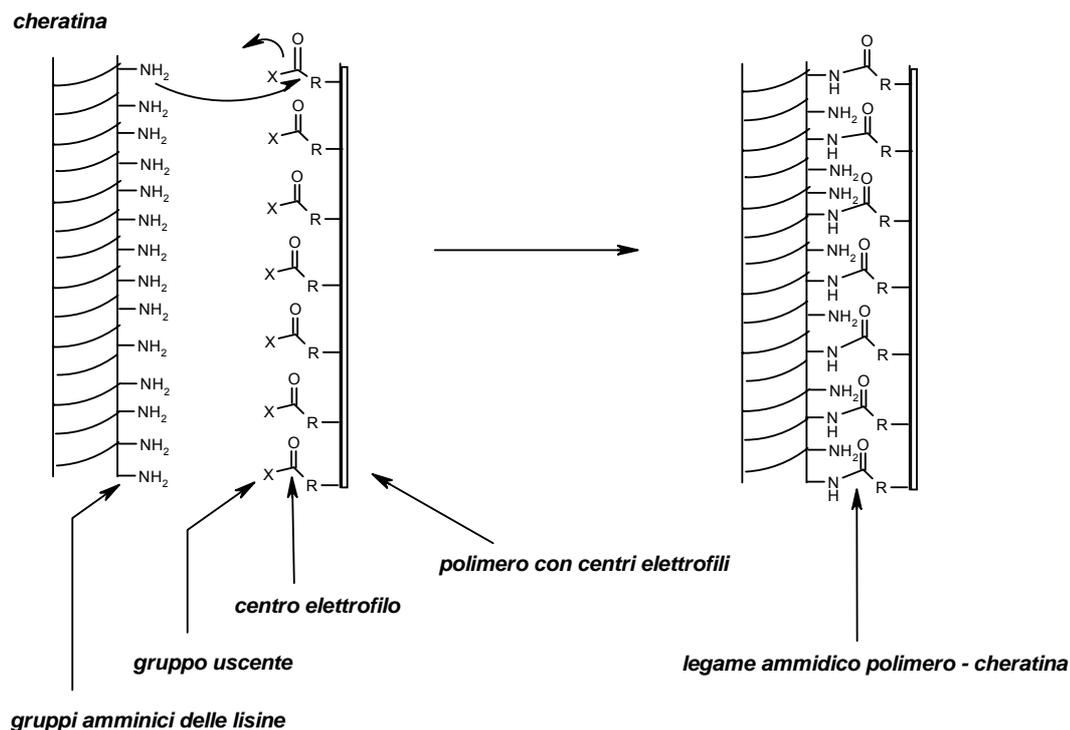
Schema 6.3 – Formazione di ponti disolfuro tra cistine cheratiniche e polimero con residui lipoilici

6.2.2 Gruppi amminici delle lisine

Il gruppo amminico libero presente in catena laterale delle lisine offre la possibilità di interazioni con altri gruppi funzionali come quelli carbonilici o carbossilici con conseguente formazione di legami covalenti molto stabili. I legami ammidici uniscono le unità amminoacidiche delle proteine e sono legami fortemente resistenti per esempio a condizioni estreme di pH o alle alte temperature. La formazione di un legame ammidico mediante i gruppi amminici di una proteina può inoltre avvenire con facilità anche in ambiente acquoso e a bassi valori di temperatura. È infatti a noi nota la reazione di funzionalizzazione in acqua dell'albumina serica bovina (BSA) e dell'esochinasi di Beker's Yeast con anidride metacrilica (**136**) a pH 7 e alla temperatura di 0°C ^[23], discussa nei capitoli seguenti. In virtù di queste caratteristiche è logico pensare di impiegare la natura nucleofila degli amminogruppi liberi delle lisine cheratiniche per la formazione di nuovi legami ammidici con strutture polimeriche; da ciò si ottiene l'immagine di un polimero costituito da unità funzionali presentanti centri elettrofilici carbonilici. La reazione *amminogruppi cheratinici – centri elettrofilici polimerici* è, secondo il presente progetto, la chiave di volta per fissare permanentemente polimeri sui capelli in blande condizioni (schema 6.4).

L'esistenza di affidabili saggi di determinazione quantitativa dei gruppi amminici anche in fase solida è vantaggiosa per la stima della funzionalizzazione della cheratina a seguito della reazione con il polimero.

²³ Iemma F., Spizzirri U.G., Puoci F., Muzzalupo R., Trombino S., Cassano R., Leta S., Picci N., *International Journal of Pharmaceutics*, 2006; **312** : 151–157

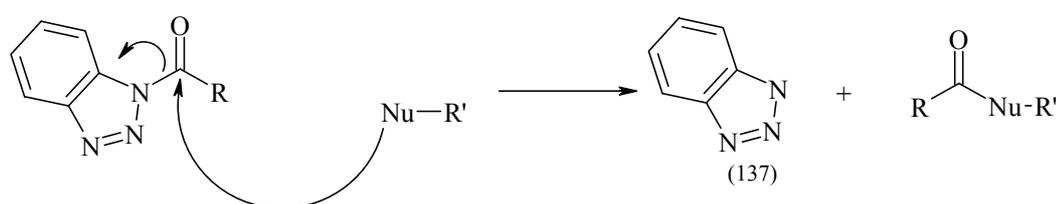


Schema 6.4 – Formazione di legami ammidici polimero - cheratina

6.3 Valutazione dei monomeri funzionali

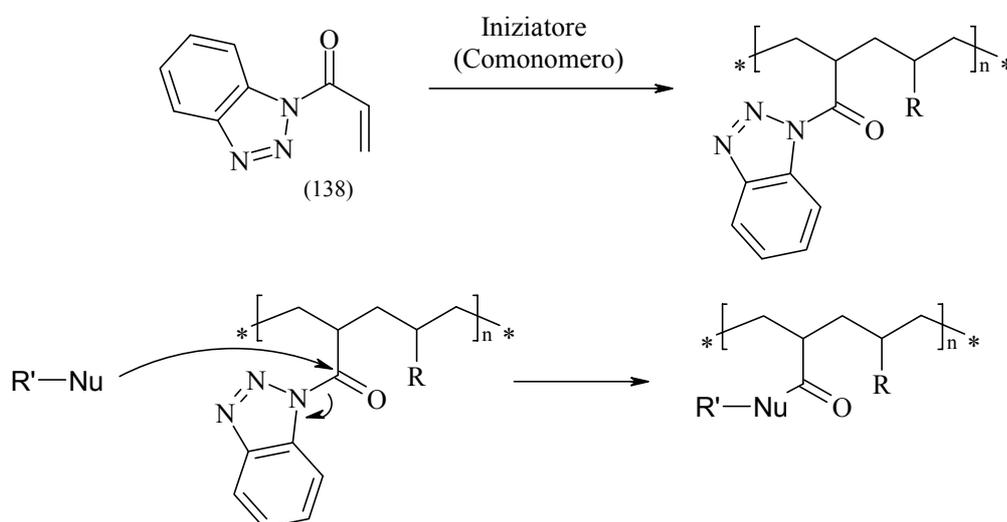
Il tipo di polimerizzazione che si vuole impiegare per la sintesi dei polimeri è quello radicalico. Questo tipo di polimerizzazione offre infatti una serie di vantaggi, per esempio l'assenza di prodotti secondari, la facilità di formazione termica o fotoindotta di radicali primari con l'impiego di un iniziatore radicalico scelto tra numerosi composti come il persolfato d'ammonio, l'azobisisobutirronitrile, il perossido di benzoile, la possibilità di utilizzare più monomeri e in rapporto diverso al fine di ottenere polimeri con le desiderate caratteristiche chimico-fisiche come la solubilità in opportuni solventi. Generalmente i substrati della polimerizzazione radicalica sono composti contenenti nella propria struttura delle insaturazioni, infatti quelli maggiormente impiegati sono composti stirenici, acrilici e metacrilici variamente modificati. Alcuni monomeri d'interesse sono infatti la N,N-Dimetilacrilammide, già impiegata per la sintesi dei polimeri visti in precedenza, l'acrilammide, lo stirene. Il polimero brevettato sul quale lavorare Poiché dalla valutazione dei gruppi funzionali cheratinici per l'ancoraggio del polimero da sintetizzare la scelta per

tale lavoro è ricaduta sui gruppi amminici delle lisine, è necessario che uno dei monomeri scelti per la polimerizzazione presenti un centro elettrofilo che ne consenta l'attacco nucleofilo. Un buon centro elettrofilo è rappresentato da un gruppo carbonilico, in particolar modo se al carbonio carbonilico si trova legato un buon gruppo uscente. Sulla base di queste considerazioni è stato progettato e brevettato un polimero ottenuto per copolimerizzazione dell'1-acrioloil benzotriazolo, poiché è risaputo che il benzotriazolo è un eccellente gruppo uscente (schema 6.5)



Schema 6.5 – Composto carbonilico generico buon elettrofilo per la presenza di Benzotriazolo

L'1-acrioloil benzotriazolo (**138**) può essere polimerizzato per la presenza del gruppo acrilico in presenza o assenza di un eventuale comonomero, mantenendo le sue caratteristiche di elettrofilia.



Schema 6.6 – Meccanismo generico di polimerizzazione dell'1-acrioloil benzotriazolo e sua reattività con composti nucleofili.

Anche in una struttura polimerica il benzotriazolo può uscire facilmente per attacco nucleofilo di un secondo composto come i gruppi amminici delle lisine. Il benzotriazolo che si libera dalla reazione di sostituzione presenta alcune

caratteristiche d'interesse come l'assenza di tossicità^[23] a suo carico; alcuni studi dimostrano un'attività contro alcuni protozoi del benzotriazolo e suoi derivati^[24]; inoltre è capace di assorbire le radiazioni ultraviolette e viene per questo impiegato nella sintesi di filtri UV, e reagisce contro i radicali liberi^[25-27].

Per i vantaggi già citati conviene maggiormente sintetizzare copolimeri rispetto ad omopolimeri perché variando i rapporti molari dei monomeri reagenti è più facilmente raggiungibile il polimero con le caratteristiche desiderate. Nella polimerizzazione, accanto all'1-acriloil benzotriazolo che sarà quindi il monomero determinante per l'ancoraggio alla cheratina, è stato impiegato un altro monomero: il para-clorometilstirene, (monomero molto noto perché costituente fondamentale delle resine Merrieffield), perché è risaputo che offre buone cinetiche di polimerizzazione e generalmente i polimeri da esso ottenuti sono facilmente sintetizzabili e purificabili; inoltre tale monomero presenta nella sua struttura un ulteriore gruppo funzionale: il clorometile legato in para all'anello aromatico. Questo gruppo funzionale potrebbe essere utile per l'inserimento di altri composti funzionali (coloranti, brillantanti, condizionanti, ecc.) trasferendo così al polimero risultante la natura di veicolo polimerico.

²³ T.Maurer and F.Mhier, *Contact Dermatitis*, 1984;**10**:163-165;

²⁴ K. Kopazska, A. Najda et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004; **12**:2617-2624;

²⁵ J.L. Gerlock, W.Tanmg, *Polymer Degradation and Stability*, 1995; **48**: 121-130;

²⁶ M.Dearth, T.J.Korniski & J.L.Gerlock, *Polymer Degardation and Stability*, 1995; **48**: 111-120;

²⁷ G.Caliendo, R.Di Carlo et al. *Eu. J.Med Chem*, 1995; **30**: 77-84;

CAPITOLO VII

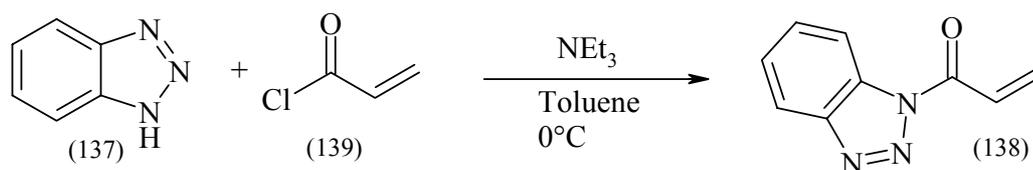
POLIMERI CAPACI DI REAGIRE CON GRUPPI FUNZIONALI CHERATINICI

7.1 Introduzione

Nel presente lavoro un copolimero dell'N-acriloilbenzotriazolo, brevettato per applicazioni cosmetiche, è stato sintetizzato per valutarne l'effettiva capacità di interagire con le fibre cheratiniche del capello formando legami stabili, ed eventualmente migliorarne alcune caratteristiche. Un problema di tale sistema polimerico è rappresentato dalla sua insolubilità in acqua, pertanto si è cercato di realizzare sistemi polimerici idrosolubili presentanti analoghe proprietà di interazione con gruppi amminici lisinici.

7.2 Sintesi dell'1-acriloil benzotriazolo

Il primo passaggio della sintesi del polimero è la sintesi del monomero contenente la struttura benzotriazolica (**138**). Tale sintesi è effettuata facendo reagire il benzotriazolo libero (**137**) con il cloruro di acrilile (**139**) in presenza di una base e alla temperatura di 0°C mantenuta con un bagno d'acqua/ghiaccio.



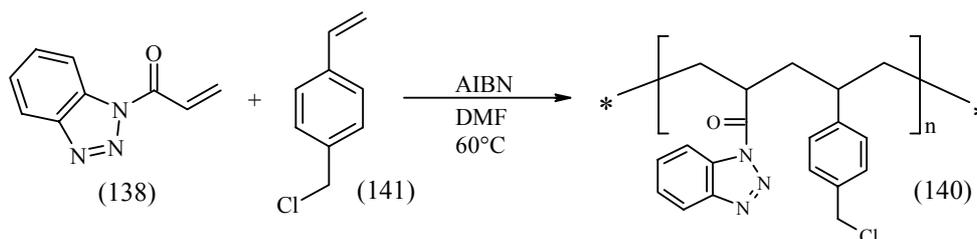
Schema 7.1 – Sintesi dell'1-acriloil benzotriazolo

La reazione è condotta sotto agitazione per 20 ore. A fine reazione si osserva la formazione di un precipitato bianco composto dal cloridrato di trietilammina. Per allontanare il sale prodotto dalla reazione la miscela di reazione viene filtrata. Una prima procedura di purificazione prevede delle estrazioni della fase toluenica rispettivamente con acqua, soluzione acquosa satura di cloruro sodico e di nuovo

acqua. La fase organica è infine seccata su solfato di sodio anidro. Il grezzo di reazione è ottenuto per allontanamento del solvente a pressione ridotta dopo aggiunta di quantità catalitiche di un inibitore di polimerizzazioni radicaliche. L'1-acriloilbenzotriazolo è purificato per cromatografia su gel di silice con miscela eluente CHCl_3 /Esano in rapporto 7/3 (vv). Il prodotto è un solido sottoforma di cristalli bianchi. (resa 82%).

7.3 Sintesi del polimero BZ1

Il polimero BZ1 (**140**) è sintetizzato facendo reagire alla presenza di un iniziatore radicalico, quale l'azobisisobutirronitrile (AIBN), quantità molari uguali di 1-acriloil benzotriazolo (**138**) e p-clorometilstirene (**141**) precedentemente purificato per cromatografia su gel di silice in esano come eluente. La reazione è condotta alla temperatura di 60°C in DMF e sotto agitazione per 24 ore (schema 8.3).

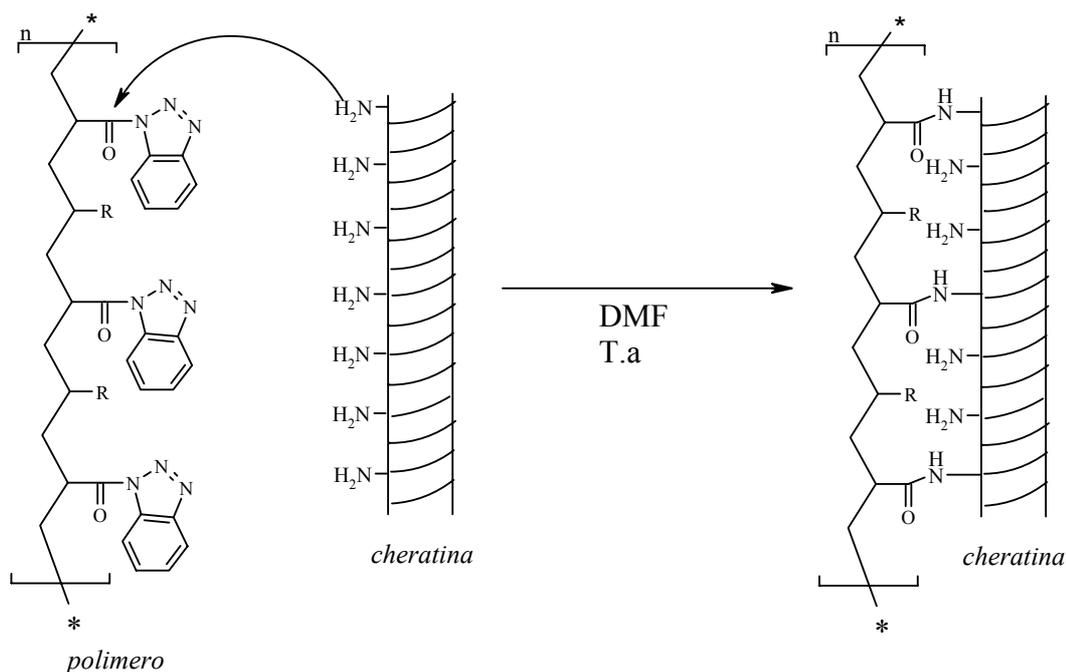


Schema 8.3 – Sintesi del polimero BZP1

A fine reazione la soluzione ha una colorazione giallo scuro e una viscosità differente rispetto allo stato iniziale. Il polimero formatosi e disciolto nel solvente aprotico di reazione, è purificato per precipitazione in etere etilico e purificato ulteriormente mediante altri cicli di dissoluzione/precipitazione usando come coppia solvente/non solvente rispettivamente DMF/etere etilico. Alla fine del processo di purificazione il polimero è seccato a pressione ridotta. Si presenta come sottoforma di polvere gialla solubile in alcuni solventi aprotici come DMF, toluene e in solventi alogenati come CH_2Cl_2 e CHCl_3 , ma non è solubile in acqua ed in altri solventi organici (EtOH, cicloesano, esano, THF, etere etilico, acetato di etile). (conversione 83%)

7.4 Formazione del legame polimero BZP1-cheratina

Per legare covalentemente il polimero BZP1 alla cheratina dei capelli si immerge una ciocca di capelli in una soluzione concentrata di DMF del polimero BZP1. Le condizioni di reazione devono essere più blande possibili, per tale motivo la reazione è condotta senza agitazione, alla luce e all'aria per 3 ore e a temperatura ambiente secondo lo schema 7.4.



Schema 7.4 – Reazione cheratina-polimero

A fine reazione la ciocca di capelli impiegata per la reazione descritta è stata lavata con ulteriore DMF, per allontanare il benzotriazolo e il polimero non reagito, e acqua. È stata poi asciugata con aria calda.

7.5 Analisi SEM

Sul campione di capelli trattati con il polimero BZP1 è effettuata l'analisi SEM (scansione di microscopia elettronica) per analizzare la superficie del capello (Figura 7.1, A-B). Da tale analisi è possibile determinare una eventuale variazione dell'aspetto della superficie rispetto ad uno stato iniziale. Una ciocca di capelli non trattati con la soluzione di polimero è analizzata per effettuare il confronto (figura 7.1, C-D). È analizzata ulteriormente una ciocca di capelli

trattata solo con una soluzione di DMF per verificare l'assenza di alterazioni causate da tale solvente impiegato nella reazione descritta. Dalle SEM dei campioni si nota, come il polimero sintetizzato sia in grado di rivestire il capello nascondendo le scaglie di cheratina che invece sono nettamente visibili nel capello non trattato (figura 7.1 A-B). I capelli posti a contatto solo con DMF hanno aspetto identico ai capelli non trattati, pertanto il solvente non influisce sull'aspetto finale dopo reazione con il polimero.

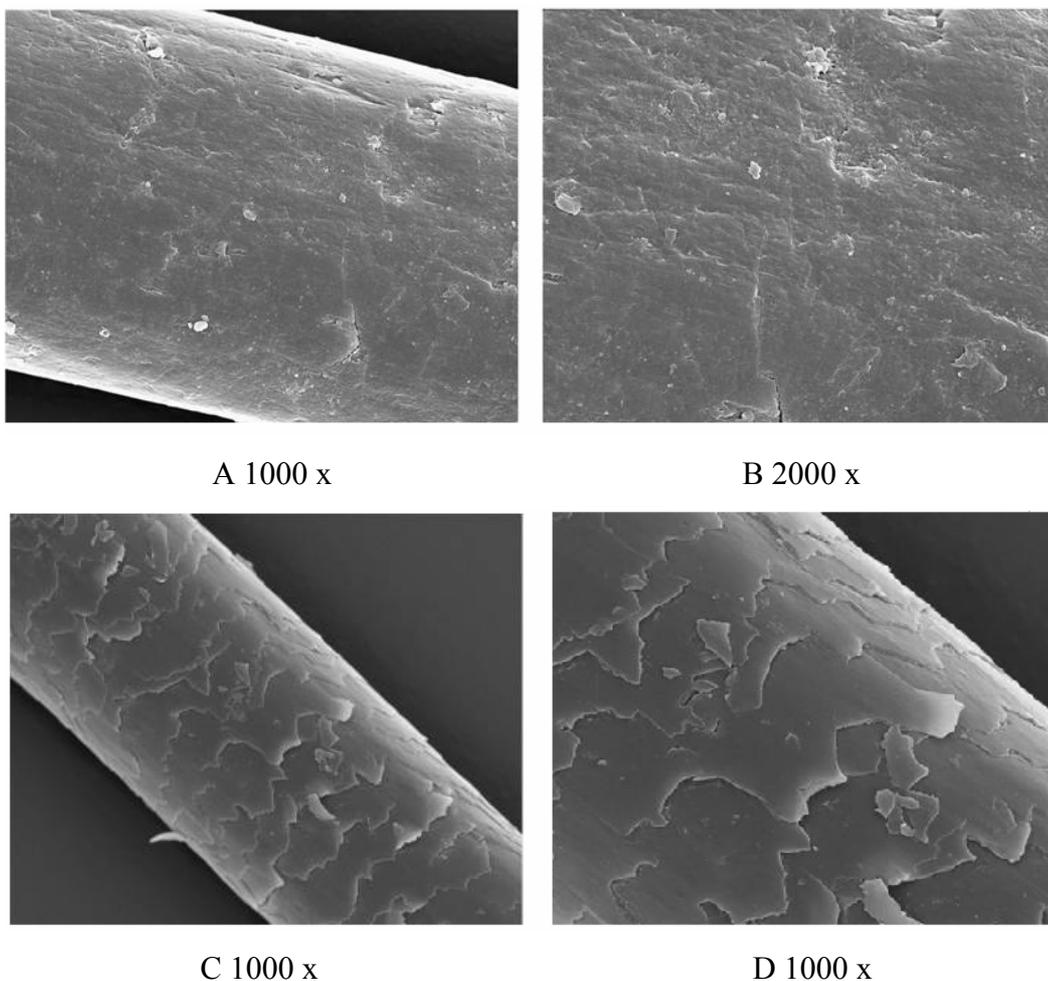
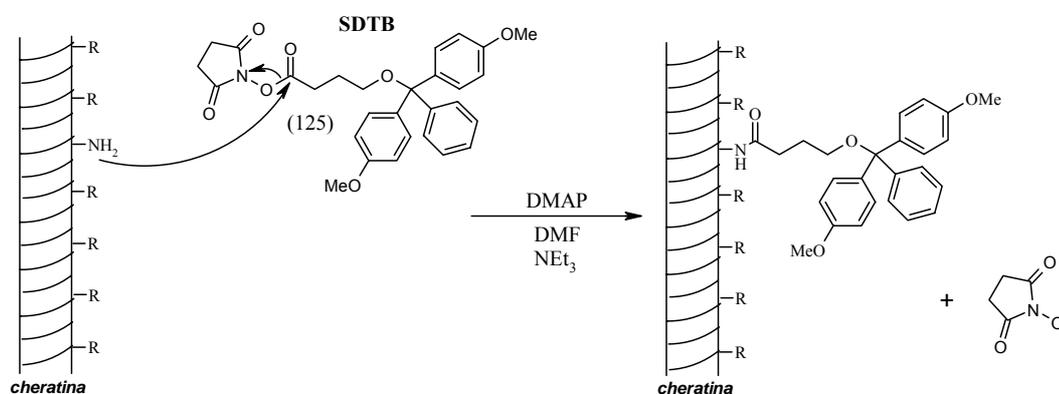


Figura 7.1 – SEM (A – B : capello non trattato; C-D : capello trattato con BZP1)

7.6 Determinazione del grado di funzionalizzazione secondo Gaur-Gupta

Per determinare il grado di funzionalizzazione della cheratina superficiale dei capelli trattati è stato impiegato lo stesso metodo di determinazione dei gruppi amminici liberi descritto nei capitoli precedenti. La stessa determinazione deve essere effettuata sia un campione di capelli trattati sia su un campione di capelli

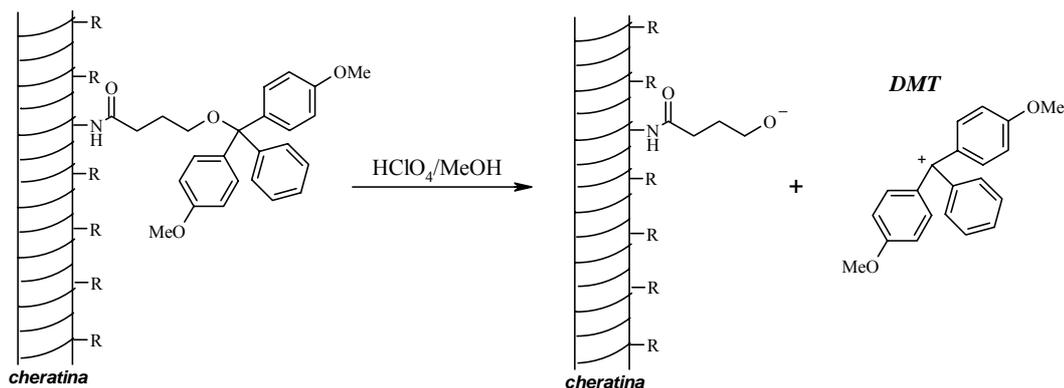
non trattati. La prima fase del metodo prevede una reazione di acilazione fra i gruppi amminici della cheratina e il reattivo di Gaur-Gupta, costituito da una soluzione di SDTB (**125**) in DMF, alla presenza di quantità catalitiche di DMAP e in ambiente alcalinizzato con NEt_3 , a temperatura ambiente per due ore secondo lo schema 7.5. A fine reazione la soluzione è allontanata, mentre i capelli acilati sono esaustivamente lavati con ulteriore DMF, MeOH, THF ed infine etere etilico fino al completo allontanamento del reattivo in eccesso e seccati a pressione ridotta per 5 ore.



Schema 7.5 – Determinazione dei gruppi amminici fase di acilazione

La seconda fase è la detritilazione con liberazione del catione cromoforo dimetossitritile mediante trattamento di una quantità esattamente pesata del campione acilato con un volume noto di soluzione detritilante costituita da $\text{HClO}_4/\text{MeOH}$ (schema 7.6).

La presenza di gruppi amminici è proporzionale alla quantità di DMT formatosi dalla reazione che conferisce alla soluzione una colorazione arancio ed è misurabile mediante analisi spettrofotometrica UV alla lunghezza d'onda di 498 nm. La quantità di moli di gruppi amminici per grammo di campione è calcolata mediante la formula descritta nell'equazione 6.1. Per il campione di capelli non trattati le moli di gruppi amminici liberi per grammo di capelli è pari a $3.816\text{E}-7$, per il campione di capelli trattati con il polimero BZP1 tale valore è pari a $1,65\text{E}-7$. Il grado di funzionalizzazione della cheratina è pertanto di poco superiore a 40%.

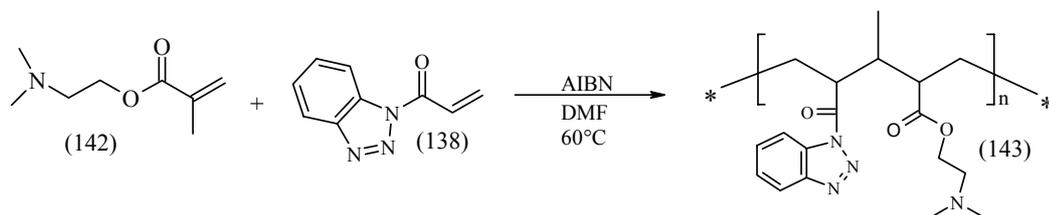


Schema 7.6 – Determinazione dei gruppi amminici fase di detritilazione

7.7 Sintesi di polimeri idrosolubili BZP2 e BZP3

Il polimero BZP1 (**140**) ha dato buoni risultati osservabili soprattutto dalle analisi SEM, tuttavia presenta un grande svantaggio relativo alle sue caratteristiche di solubilità; è infatti molto solubile in DMF ma non in acqua. Poiché a carico della DMF ci sono vari effetti tossici dimostrati da numerosi studi^[1-3], si è cercato di aggirare il problema mediante la sintesi di polimeri idrosolubili presentanti ugualmente il centro elettrofilo carbonil benzotriazolico. Per ottenere questi nuovi polimeri è stato necessario sostituire il comonomero p-clorometilstirene con un comonomero molto più idrofilo come l'N,N-dimetilamminoetilmetacrilato (**142**) e la N,N dimetilacrilammide (**96**), ambedue biocompatibili.

Il polimero BZP2 (**143**) è stato sintetizzato per polimerizzazione radicalica in DMF anidra impiegando come iniziatore radicalico l'azobisisobutirronitrile alla temperatura di 60°C (schema 7.6).



Schema 7.6 – Sintesi del polimero BZP2

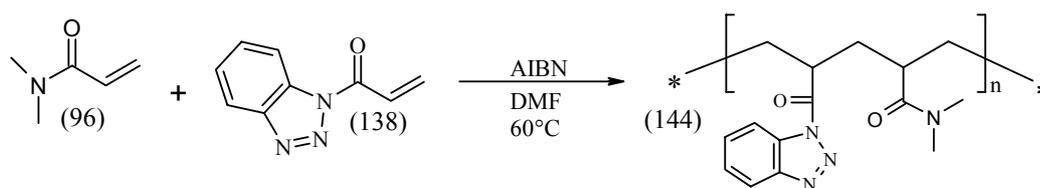
¹ H.A.Kim, K.Kim, Y.Heo, SH. Lee, H.C.Choi, *Int. Arch Occup. Environ. Health*, 2004; **77**:108-12;

² H.Seon, T.Katagiri, H.Arito et al, *J.Occup.Health.*, 2003; **45**: 365-375;

³ MB.Roure, AM.Lambert et al., *J.Appl.Toxicol.*, 1996; **16**: 265-7;

Il polimero **143** ottenuto è recuperato a fine reazione per precipitazione in etere etilico (conversione 77 %).

In analoghe condizioni è stato ottenuto il polimero BZP3 (**144**) facendo reagire in rapporto molare unitario i monomeri N-acrilil benzotriazolo (**138**) e la N,N-DMAA (**96**) (schema 7.7). A fine reazione il polimero **144** è separato dalla soluzione per precipitazione in etere etilico. (conversione 72 %).



Schema 7.7 – Sintesi del polimero BZP3

In entrambi i casi si ottengono polimeri sottoforma di polveri bianche idrosolubili.

7.8 Reazione cheratina – polimeri BZP2 e BZP3

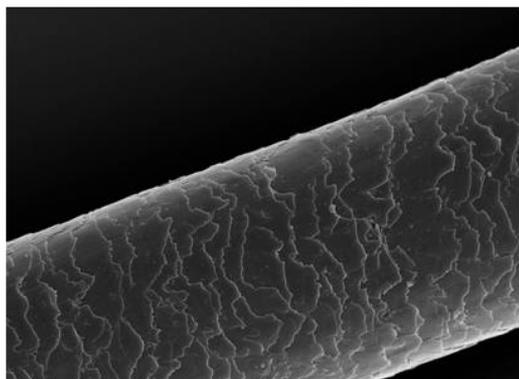
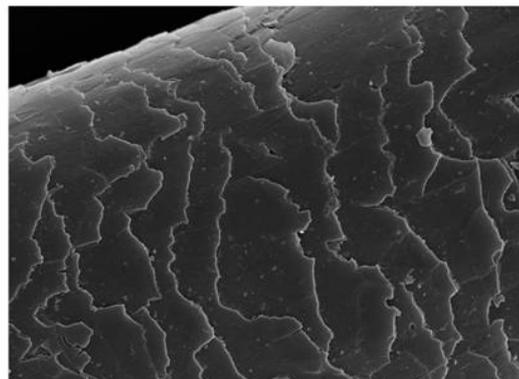
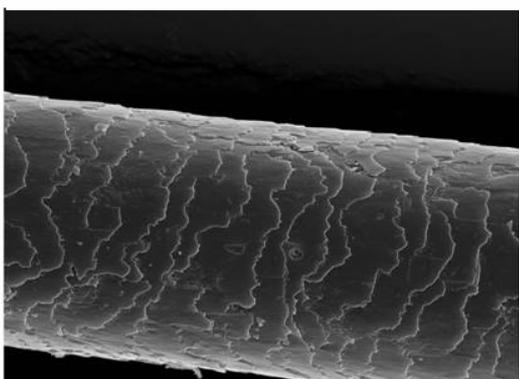
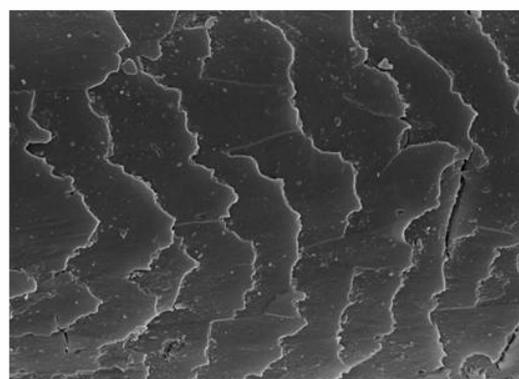
La sintesi di polimeri idrosolubili consente di utilizzare il solvente biocompatibile per eccellenza: l'acqua. Per l'acilazione della cheratina con il polimero BZP2, infatti, una ciocca di capelli è stata immersa in una soluzione acquosa del polimero per 24 ore a temperatura ambiente e all'aria. A fine reazione la ciocca di capelli è stata lavata abbondantemente con acqua e successivamente asciugata.

Allo stesso modo un'altra ciocca di capelli è stata immersa in una soluzione acquosa del polimero BZP3 per 24 ore a temperatura ambiente e all'aria, ed infine lavata ed asciugata.

7.9 Analisi mediante SEM

Dalle analisi SEM non si nota la variazione desiderata dello status del capello, infatti sia nel campione di capelli trattato con il polimero BZP2 (figura 7.2 : E-F) sia nel campione trattato con il polimero BZP3 (figura 7.2 : G-H) sono evidenti le scaglie di cheratina esattamente in modo analogo al capello non trattato (Figura 7.1 : A-B). Effettivamente le reazioni di attacco nucleofilo sono molto sfavorite in ambiente acquoso; in tale solvente infatti la reazione procede con

un'efficienza oltre 500 volte inferiore rispetto ad un solvente aprotico come la DMF. Ulteriori sviluppi in tale settore necessitano della ricerca di un solvente apolare non tossico nel quale fare avvenire la stessa reazione che ha prodotto buoni risultati descritta in precedenza. Buone caratteristiche in tal senso sembra presentarle il DMSO.

*E -1000 x**F - 2000 x**G -1000 x**H - 2000 x*

CAPITOLO VIII

ALBUMINA SERICA BOVINA NELLA PREPARAZIONE DI SISTEMI DI RILASCIO MODIFICATO DI FARMACI

8.1 Introduzione

Negli ultimi anni, accanto alla costante ricerca di nuove molecole a potenziale azione terapeutica, è cresciuto nel settore farmaceutico l'interesse per la realizzazione di sistemi, che rendano più efficace l'uso di principi attivi già in commercio. La validità terapeutica e clinica, nonché la tossicità dei principi attivi sono strettamente correlate alla forma farmaceutica con cui essi vengono introdotti nell'organismo. Un farmaco, somministrato con le convenzionali formulazioni, si distribuisce rapidamente nell'organismo attraverso il circolo ematico. Un aumento del dosaggio non sempre garantisce il raggiungimento dei siti recettoriali specifici nelle quantità e per il tempo necessari alla sua azione. Al fine di assicurare concentrazioni adeguate di farmaco nell'organo prescelto si ricorre a somministrazioni ripetute. In questo caso la concentrazione ematica del principio attivo segue un andamento pulsato con indesiderate punte di massimo, che superano la concentrazione minima tossica (CMT) e gole di minimo, inferiori alla concentrazione minima efficace (CME) (figura 8.1).

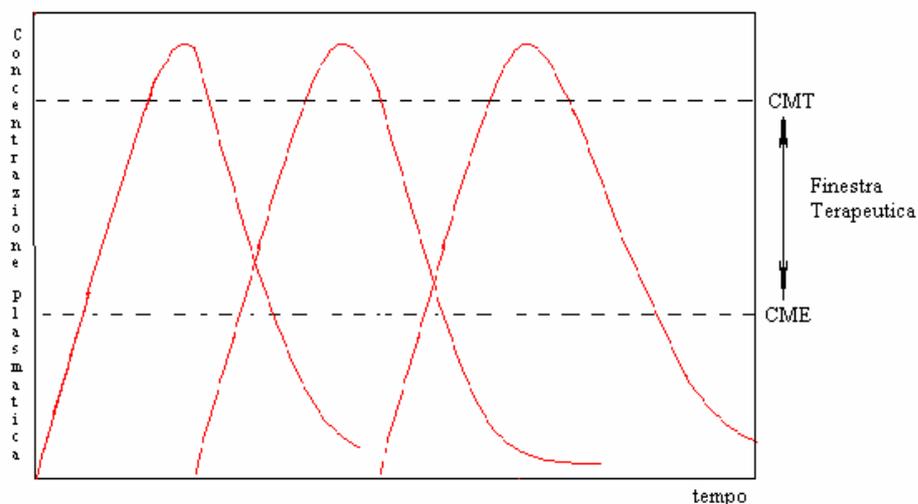


Figura 8.1 – Finestra terapeutica di un farmaco somministrato ripetutamente

Forme farmaceutiche in grado di veicolare il principio attivo esclusivamente verso il sito d'azione e di rilasciarlo in quantità e velocità controllate ne migliorano notevolmente le proprietà farmacologiche. Un controllo sulla velocità di rilascio, produce concentrazioni ematiche di farmaco costanti nel tempo (figura 8.2), con riduzione degli effetti collaterali, diminuzione della quantità di principio attivo da somministrare e del numero delle somministrazioni giornaliere.

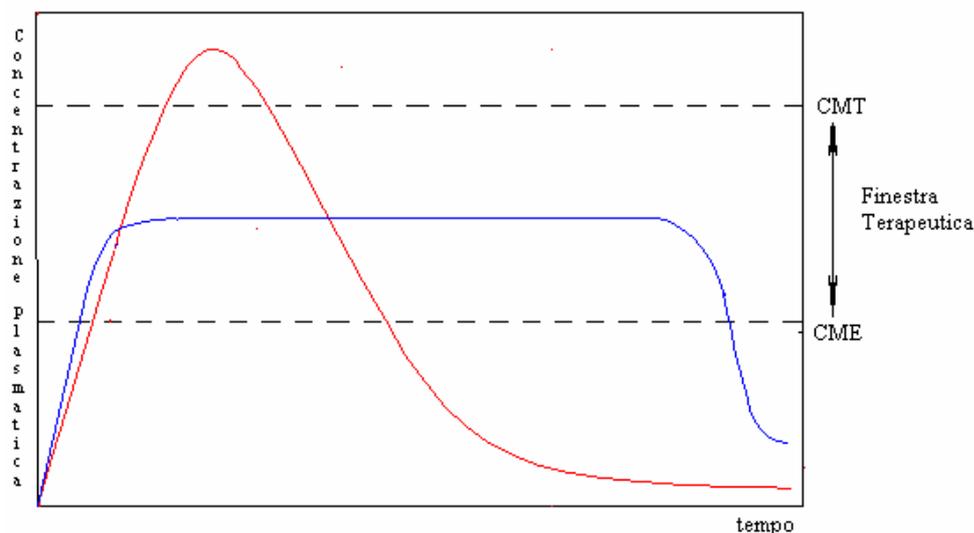


Figura 8.2 – Confronto delle finestre terapeutiche di un farmaco somministrato mediante formulazioni convenzionali (rossa) e sistemi di rilascio modificato (blu)

I polimeri rappresentano la classe di molecole che meglio si presta alla realizzazione di sistemi a rilascio controllato. I polimeri, noti in

letteratura, applicabili in tale campo possono essere sia di origine naturale come proteine (albumina, gelatina, caseina), polisaccaridi (agarosio, destrano, acido ialuronico, chitosano) sia sintetica come poliaminoacidi, poliesteri, polianidridi, poliammidi o semisintetica come derivati della cellulosa. In base alle loro caratteristiche chimico-fisiche in base al tipo di organizzazione strutturale scelta per tali macromolecole, le modalità di rilascio dei farmaci possono essere di vario genere. Possono essere infatti realizzati sistemi terapeutici in cui il rilascio del farmaco è controllato da processi di diffusione (sistemi a riserva , a matrice e ibridi), sistemi terapeutici in cui il farmaco è rilasciato a seguito di reazioni chimiche (sistemi erodibili, profarmaci) e sistemi “attivati dal solvente” (idrogel, pompe osmotiche, resine scambiatrici).

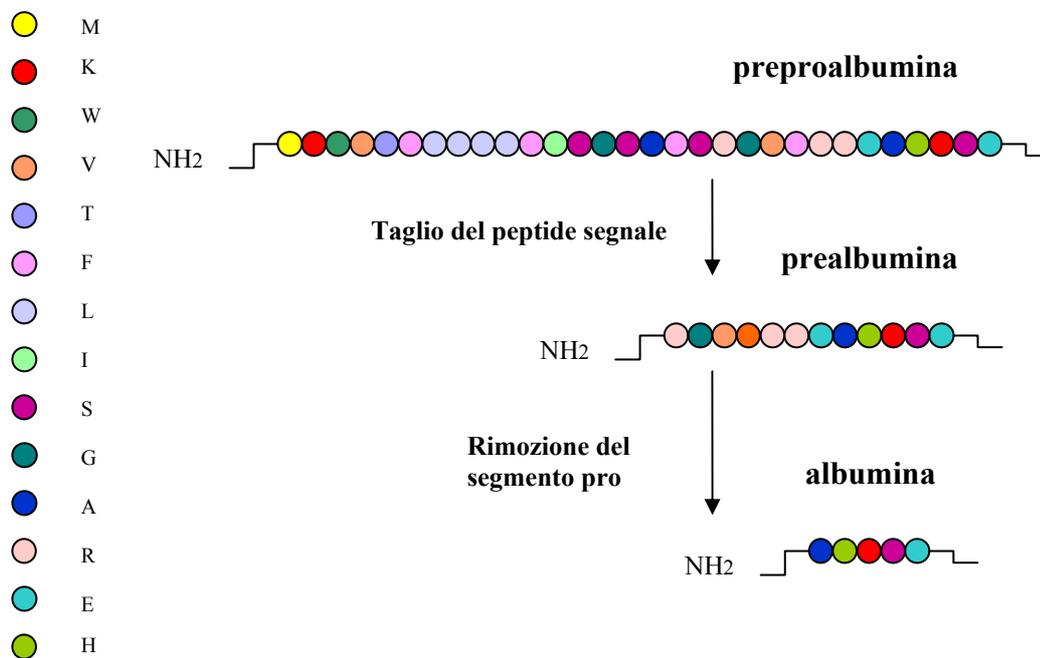
Tra tutti i polimeri naturali l’albumina si presta bene alla realizzazione di idrogel con buone cinetiche di rilascio di farmaci, che possono essere ottenuti mediante tecniche diverse.

8.2 Albumina Serica Bovina: produzione e caratteristiche

L’albumina serica bovina è una proteina che possiede la maggior parte delle qualità richieste a un carrier ideale di farmaci. E’ solubile in acqua, biodegradabile, biocompatibile, non immunogenica, non tossica.

I numerosi gruppi funzionali sui residui amminoacidici consentono la reticolazione fra più catene proteiche a formare una rete tridimensionale macromolecolare insolubile in acqua. La larghezza delle maglie del reticolo dipende dal pH del mezzo, perché il sistema poliproteico che si genera per reticolazione ha le caratteristiche di un idrogel. Tale sistema può essere caricato di farmaco, che verrà rilasciato a seguito del rigonfiamento e/o dei processi biodegradativi del sistema stesso. Un idrogel può essere realizzato in varie forme e dimensioni, spesso si preferiscono le microparticelle di forma sferica per diversi vantaggi. Il farmaco può essere rilasciato uniformemente in tutte le direzioni da sistemi microsferici, e a seconda delle dimensioni microparticelle possono essere indirizzate verso un organo specifico. I metodi utilizzati per la produzione di microsfele di albumina sono numerosi. Le microsfele di albumina sono

considerate un ottimo materiale utilizzabile come carrier di numerosi farmaci solubili e insolubili in acqua e per varie applicazioni diagnostiche. Nei mammiferi l'albumina serica è sintetizzata a partire da un precursore prodotto nel fegato e chiamato *preproalbumina* (schema 8.1)^[1]. Dopo la rimozione del peptide segnale, la proalbumina risultante è processata con un nuovo taglio alla nuova estremità N-terminale con la generazione di un esapeptide e dell'albumina, che può essere rilasciata in circolo con un'emivita di 19 giorni. L'albumina serica, con una concentrazione tipica di 5g/100ml, è la proteina più abbondante nel plasma, dove contribuisce per l'80% alla pressione colloidale ed è responsabile del mantenimento del pH ematico in un range di 7.2-7.4. Assieme all' α -glicoproteina acida e alle lipoproteine, l'albumina è responsabile del trasporto di farmaci nel torrente circolatorio. Presenta nella sua struttura due siti indipendenti di legami: un sito meno specifico lega una varietà di farmaci strutturalmente diversi, il secondo più specifico lega la maggior parte di farmaci che presentano dei gruppi carbossilici, come alcuni antinfiammatori (naprossene, e ibuprofene).



Schema 8.1 – Biosintesi dell'albumina

¹ Casella T., Taglietti V., "Principi di Fisiologia", 1993; Vol I: 140;

8.3 Struttura della BSA

In base agli studi NMR protonica e di cristallografia ai raggi X è stata proposta per l'albumina una struttura a forma di cuore arrangiata in una struttura secondaria costituita per circa il 55% di α elica e per il restante 45% di conformazioni casuali. Gli studi ai raggi infrarossi hanno confermato che la denaturazione con alcali e con alte temperature causa una perdita parziale delle α eliche senza formazione di foglietti β , che sembrano comparire alla temperatura di 72°C^[2]. Per ciò che riguarda la composizione aminoacidica, l'albumina è caratterizzata da un basso contenuto di triptofano e metionina e da un alto contenuto di cisteina e di aminoacidi carichi, aspartato e glutammato, e di lisina e arginina (tabella 8.1).

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 40	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Trh 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

Tabella 8.1 – Aminoacidi presenti nell'albumina

La sequenza amminoacidica dell'albumina serica bovina è costituita da tre domini omologhi (I,II,III), che sono divisi in nove loops (L1-L9) da 17 ponti disolfuro (figura 8.3); ogni dominio è il prodotto di due sottodomini (IA, IB, ecc.) e può essere diviso in dieci segmenti elicoidali.

² C.Branden, J.Tooze, "Introduzione alla struttura delle proteine", Zanichelli Ed., 1991, p. 49

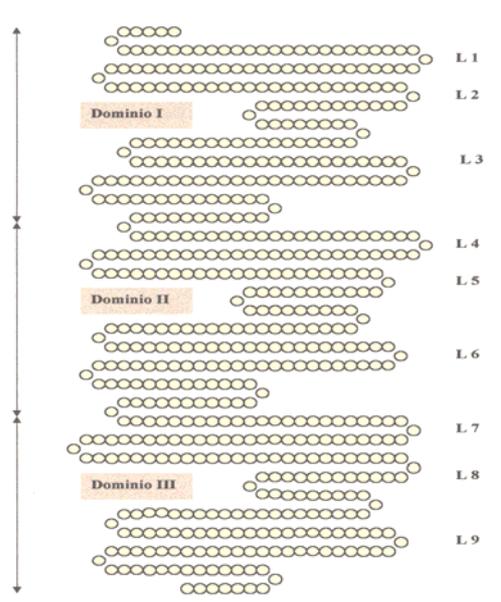


Figura 8.3 – Domini e loop dell'albumina

La struttura primaria dell'albumina è inusuale fra le proteine extracellulari poiché possiede un unico gruppo sulfidrilico libero in posizione 34 (figura 8.4).

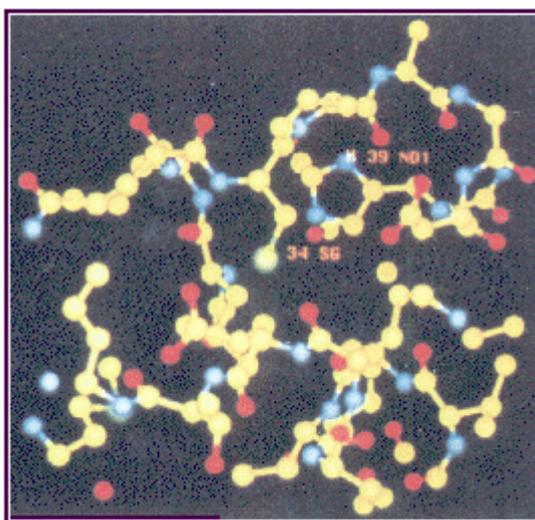


Figura 8.4 – Gruppo tiolico libero nell'albumina in posizione 34

Nel contesto della struttura terziaria, i ponti disolfuro sono localizzati prevalentemente tra i segmenti elicoidali (figura 8.5) e nessuno di essi è

accessibile all'azione degli agenti riducenti in un range di pH compreso tra 5-7, ma divengono progressivamente disponibili quando il pH aumenta o diminuisce^[3].

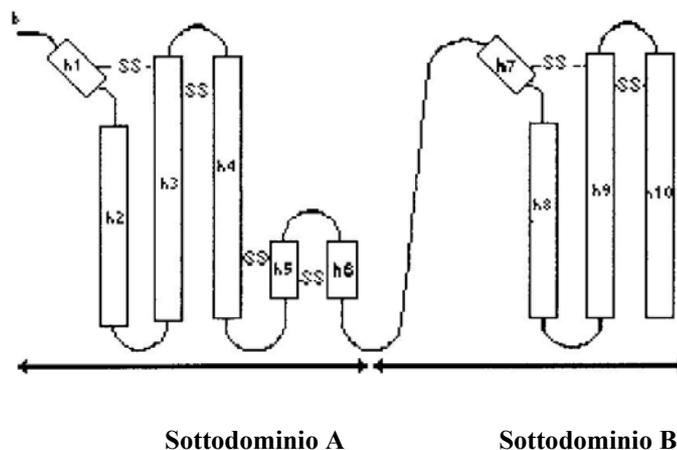


Figura 8.5 – Disposizione dei ponti disolfuro nella BSA

8.4 Proprietà chimico-fisiche della BSA

La molecola di albumina non è uniformemente carica a livello della struttura primaria e a pH neutro è stata calcolata una carica netta di -10, -8, e 0 per i domini I, II, III. Mentre la distribuzione di carica è asimmetrica a livello della struttura primaria, sulla struttura terziaria sembra più uniforme. L'albumina serica può esistere sotto forma di varie conformazioni (figura 8.6) a seconda dei valori di pH: conformazione Espansa (E) per un $\text{pH} \leq 2.7$; conformazione Fast (F) per un pH compreso fra 2.7 e 4.3; conformazione Normal (N) per un pH compreso fra 4.3 e 10; conformazione Basic (B) per un pH compreso fra 8 e 10; conformazione Aged per un $\text{pH} \geq 10$ ^[4].

³ C.Branden, J.Tooze, "Introduzione alla struttura delle proteine", Zanichelli Ed., 1991, p. 38

⁴ C.Branden, J.Tooze, "Introduzione alla struttura delle proteine", Zanichelli Ed., 1991, p. 315

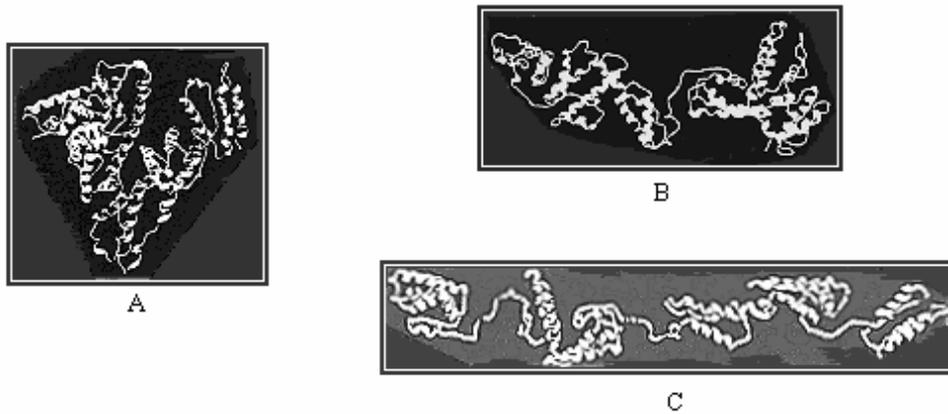


Figura 8.6 – A: Conformazione N della BSA; B: Conformazione F; C: Conformazione E

La forma F è caratterizzata da un'elevata viscosità, una solubilità più bassa ed una significativa perdita del contenuto di α -eliche, che sono ulteriormente accentuati nella forma E.

La BSA trattata con calore passa attraverso due fasi strutturali: la prima è reversibile, mentre la seconda è irreversibile, ma non necessariamente risulta in una completa distruzione della struttura ordinata. La temperatura di denaturazione corrisponde a 62°C e l'analisi di spettroscopia infrarossa indica la formazione di foglietti β intermolecolari, quando la BSA è riscaldata intorno ai 65°C. In ogni caso, nella fase strutturale reversibile, qualche α -elica si trasforma in un avvolgimento casuale e si formano degli aggregati attraverso l'instaurarsi di legami a idrogeno e di interazioni a foglietto- β paralleli ed antiparalleli fra i monomeri. I foglietti antiparalleli sono più numerosi di quelli paralleli e possono resistere maggiormente alle distorsioni e all'esposizione ai solventi organici. Non appena la temperatura è aumentata oltre la fase reversibile, lo spiegamento della struttura espone il residuo di cisteina-34, consentendo la formazione di ponti disolfuro intermolecolari; poiché si tratta di legami covalenti questa fase è irreversibile.

8.5 Idrogel di albumina

Gli idrogel di albumina sono ottenuti dalla reticolazione di più molecole della proteina attraverso la formazione di nuovi legami inter e intracatena. Tali

materiali trovano largo utilizzo in campo farmaceutico in particolar modo come sistemi a rilascio modificato.

Il rilascio del principio attivo da parte degli idrogel è dipendente da una serie di fattori tra cui il pH del mezzo, la biodegradazione, le dimensioni e la forma del sistema.

Un idrogel di albumina a contatto con una soluzione acquosa assorbe molta acqua rigonfiandosi, ma il grado di rigonfiamento è strettamente correlato al pH del mezzo. All'aumentare delle forze repulsive che si generano fra le cariche opposte sui gruppi ionizzabili proteici, aumenta il rigonfiamento (swelling) del sistema. Lo swelling di un idrogel proteico è minimo al punto isoelettrico (p.i.) della proteina e ha un andamento crescente per valori più alti e più bassi di pH rispetto al p.i (figura 8.7).

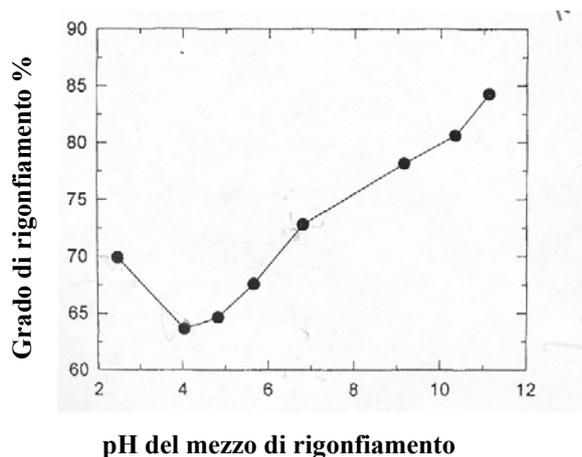


Figura 8.7 – Grado di rigonfiamento di un idrogel di albumina in funzione del pH

I gruppi ionizzabili che contribuiscono maggiormente al rigonfiamento sono quelli carbossilici, mentre è trascurabile il contributo dato dai gruppi amminici perché sono generalmente quasi tutti impegnati nei legami di reticolazione^[5].

Il rilascio del farmaco dipende notevolmente dallo swelling dell'idrogel, perché l'allargamento delle maglie del reticolo consente il passaggio delle molecole di farmaco intrappolate nel sistema verso l'esterno.

⁵ H.Y.Park, I.H.Song, *Int.J.Pharm.*, 1998; **175**: 231

Una matrice di albumina è caratterizzata da un'elevata biodegradabilità in quanto suscettibile all'azione di specifiche proteasi come pepsina e tripsina. In genere, l'utilizzo di tali sistemi per un rilascio controllato, necessita di uno studio accurato della cinetica di cessione del farmaco che dipende non solo dallo swelling del sistema, ma anche dalla sua degradazione enzimatica. Negli idrogel con un più alto grado di reticolazione il processo di degradazione enzimatica è ridotto, perché le maggiori variazioni strutturali della proteina fanno perdere la necessaria complementarità enzima-substrato.

L'aggregazione delle molecole proteiche a formare un reticolo tridimensionale è ottenuta per reazione diretta fra i gruppi funzionali amminoacidici liberi (generalmente gruppi amminici e carbossilici) a seguito della denaturazione termica della proteina, chimicamente per reazione con un agente reticolante, o con tecniche come la coacervazione e spray drying.

Gli idrogel possono essere realizzati in varie forme e dimensioni, ma generalmente si preferiscono sistemi microparticellari perché più facilmente applicabili e di forma sferica perché il rilascio è uniforme in tutte le direzioni.

8.6 Microsfere di albumina mediante denaturazione termica

Una soluzione acquosa di albumina viene sospesa in olio vegetale sotto agitazione e alla temperatura di 30-50°C^[6]. Si generano delle microsfere di albumina idratate e non stabili. La loro stabilizzazione si ottiene aumentando la temperatura fino a 100°C e oltre per la formazione di legami di reticolazione che seguono la denaturazione proteica. Le microsfere ottenute dopo filtrazione, lavaggio ed essiccamento sono non agglomerate, insolubili, ma rigonfiabili in acqua. La biodegradabilità delle microsfere dipende strettamente dal grado di reticolazione, che è determinato dalla temperatura e dalla durata del processo. Generalmente questa procedura di reticolazione può essere usata per preparare microsfere degradabili in vivo in un range che va da pochi minuti a diversi mesi. L'esposizione a 100°C per 40 minuti produce microsfere che si degradano in 15 minuti dalla loro iniezione nell'organismo. D'altro canto microsfere realizzate a 180°C per 18 ore degradano in sei mesi dalla loro iniezione. Esposizioni a

⁶ K.Shimura, K.I.Kasai, "Method of Enzimology", Academic Press, 1996, Vol 271, p.4

temperature e per tempi intermedi producono microsfele che si degradano con velocità intermedie.

Il caricamento del farmaco può avvenire dopo la formazione delle microsfele o precedentemente alla formazione delle microsfele apportando una piccola variazione al metodo descritto. Nel secondo caso si addiziona il farmaco nella soluzione iniziale di albumina, con formazione di una miscela farmaco-albumina che viene fatta equilibrare per 15-60 minuti; una certa quantità di farmaco può legarsi su alcuni siti delle molecole di albumina nativa, in dipendenza al grado e alla polarità delle cariche elettrostatiche, alla concentrazione del farmaco e del carrier proteico, al pH e alla temperatura. Durante il processo di reticolazione la quota di farmaco non legata o anche la quota eventualmente non solubile viene intrappolata all'interno della matrice proteica delle microsfele che si formano.

Il rigonfiamento del sistema microparticellare dipende strettamente dal grado di reticolazione, e dal pH del mezzo, mentre le dimensioni delle particelle dipendono dalla velocità di agitazione, dalla velocità di aggiunta della soluzione di albumina o farmaco-albumina nell'olio e dall'eventuale uso di tensioattivo.

Con tale tecnica sono state per esempio ottenute microsfele di albumina applicabili come drug delivery sistem per inalazione^[7]. Tali sistemi caricati di Tetradrina, sono in grado di rilasciare il farmaco con buoni risultati a livello polmonare.

8.7 Microsfele di albumina mediante reticolazione chimica

La reticolazione chimica consente di ottenere microsfele di albumina a temperature più basse rispetto al metodo precedente, evitando così la denaturazione proteica. La formazione di nuovi legami fra le catene polipeptidiche avviene attraverso agenti chimici come la glutaraldeide e la formaldeide e cationi tri e tetravalenti^[8]. Le microsfele sono prodotte disperdendo una soluzione una soluzione di albumina in olio vegetale sotto agitazione, in maniera simile al metodo descritto precedentemente, mentre la loro stabilizzazione è dovuta all'agente reticolante. Quest'ultimo se insolubile in acqua può essere introdotto

⁷ X.M.Zeng, G.P. Martin, C.Marriott, *Eur. J.Pharm.Sci.*, 1995; **3**:87

⁸ K.Shimura, K.I.Kasai, "*Method of Enzimology*", Academic Press, 1996, **Vol 271**, p.9

direttamente nella fase oleosa, se è idrosolubile può essere aggiunto direttamente nella soluzione di albumina immediatamente prima alla sua immissione nell'olio o alternativamente può essere aggiunto in un alcol lipofilo anidro.

La reazione di reticolazione avviene pochi minuti dopo il contatto con il mezzo reticolante e le microsfele prodotte sono quindi filtrate. Le dimensioni delle particelle dipendono dalla velocità di agitazione, dalla concentrazione della soluzione iniziale di albumina, mentre il grado di reticolazione dipende dal tempo di contatto delle microsfele con l'agente reticolante e dalla sua concentrazione nell'olio e dal rapporto tra la fase dispersa e la fase disperdente. Il metodo di reticolazione chimica è particolarmente vantaggioso per intrappolare nelle microsfele farmaci solubili e insolubili sensibili alla temperatura. Microsfele prodotte con tale tecnica sono state caricate con farmaci diversi come nifedipina^[9], terbutalina^[10].

Un esempio particolare di reticolazione chimica è la sintesi di microsfele idrofile^[11]. Tale sintesi è caratterizzata dall'uso di un polimero ad alto peso molecolare, come il polimetilmetacrilato (PMMA), in grado di stabilizzare stericamente le microsfele di albumina formate prima dell'aggiunta dell'agente reticolante. La stabilità delle microparticelle è dovuta all'assorbimento in superficie di macromolecole che rendono impossibile l'aggregazione delle particelle stesse, perché esse non sono più in grado di interagire da vicino l'una con l'altra (figura 8.8). Le collisioni anelastiche fra le particelle, che ne causano l'aggregazione e la destabilizzazione, sono minimizzate.

⁹ W.Chuo, T.Tsai et al, *Int.J.Pharm*, 1996; **144**: 241;

¹⁰ S.Sahin, H.Selek et al. *J.Control Release*, 2002; **82**: 345;

¹¹ K.Shimura, K.I.Kasai, "*Method of Enzimology*", Academic Press, 1996, **Vol 271**, p.18

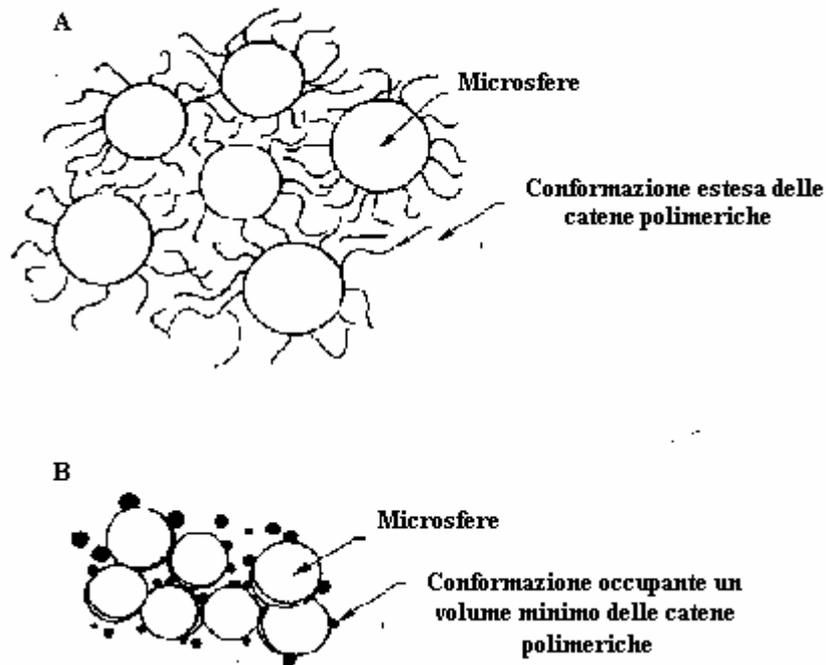


Figura 8.8

Nella procedura di reticolazione chimica spesso si aggiunge l'agente reticolante nella soluzione acquosa iniziale di albumina e ciò richiede un raffreddamento per evitare una rapida reticolazione. Al contrario questa tecnica richiede l'aggiunta di glutaraldeide nella fase organica, che successivamente viene a contatto con la dispersione di albumina. La presentazione dell'agente reticolante nella fase organica ha come risultato una maggiore concentrazione di glutaraldeide sulla superficie delle microsfe e una sua più bassa concentrazione all'interno, questo consente un maggior grado di reticolazione a livello superficiale delle microsfe. Una più alta presenza di gruppi aldeidici in superficie, conferisce alle microsfe una maggiore idrofilicità per la polarità dei gruppi aldeidici e dei gruppi carbossilici che possono in seguito generarsi per ossidazione. Questi gruppi superficiali possono essere inoltre utilizzati per formare dei nuovi legami e per apportare alle microsfe delle modifiche. Tali gruppi sono molto reattivi verso composti contenenti amminogruppi come amminoalcoli, amminoacidi. Legando

la glicina^[12] al gruppo aldeidico per esempio, si generano dei gruppi carbossilici che esaltano l'anionicità e l'idrofilicità delle microsfele. I gruppi aldeidici liberi dopo la reticolazione possono anche essere usati per legare enzimi, anticorpi, proteine, farmaci con amino gruppi in struttura.

8.8 Microsfere di albumina mediante coacervazione

Con questa tecnica la sostanza da microincapsulare viene emulsionata o sospesa in un sol colloidale del materiale di rivestimento (per es. gelatina). Nel liquido, mantenuto in agitazione, avviene la coacervazione, cioè la separazione della dispersione colloidale in due fasi liquide, una più ricca di solvente, l'altra più ricca di particelle colloidali (coacervato). Quest'ultime vengono adsorbite intorno ai nuclei da microincapsulare perché si ha una riduzione dell'energia interfacciale del sistema.

Le microcapsule formatesi vengono solidificate (per esempio per trattamento chimico) e recuperate (figura 8.9). La coacervazione permette l'ottenimento di microcapsule che mascherano eventuali caratteristiche organolettiche sgradevoli dei principi attivi.

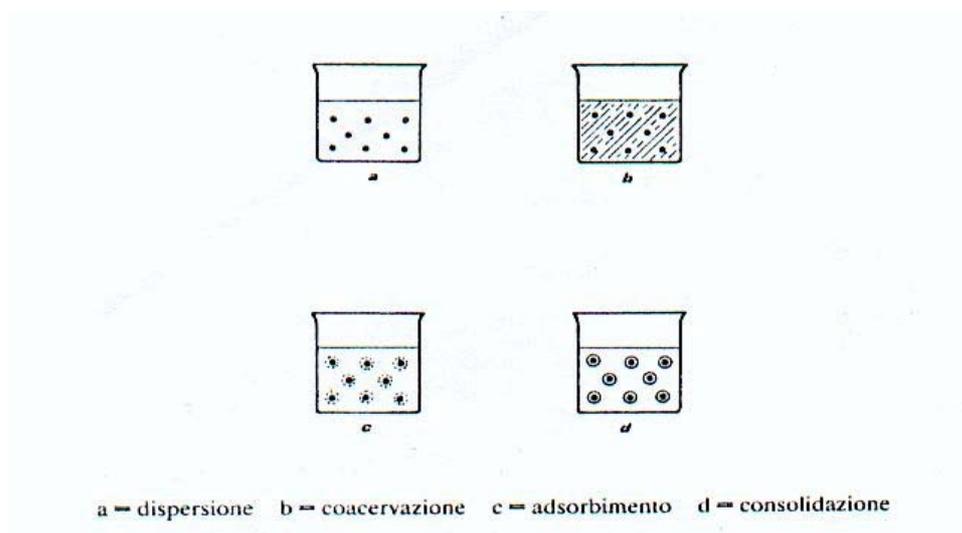


Figura 8.9

La coacervazione può essere distinta in semplice e complessa. Quella semplice è quella in cui si adopera un solo polimero e se ne determina la

¹² A.B.MacAdam, Z.B.Shafi et al., *Int. J.Pharm.* 1997; **151**:47;

separazione con l'aggiunta di un elettrolita o di un non solvente. Per esempio si può avere la formazione di un coacervato aggiungendo etanolo o solfato di sodio ad un sol di gelatina. Nella coacervazione complessa, al contrario, si adoperano uno o più polimeri e se ne determina la separazione mediante una variazione di pH. Per esempio un sol composto da gelatina e gomma arabica si mantiene stabile fino a quando i polimeri hanno carica negativa; nel momento in cui si porta il pH a valori inferiori rispetto al punto isoelettrico della gelatina, questa si carica positivamente e tende ad unirsi con la gomma arabica dando luogo al coacervato. Questa tecnica ha permesso di realizzare nanoparticelle di albumina, che caricate di oligonucleotidi antisenso^[13] o di ganciclovir^[14] possono essere usate nella terapia antivirale.

8.9 Spray Drying e Spray Congealing

Tramite l'ugello di un atomizzatore si spruzza una soluzione del polimero (*spray drying*) o il polimero fuso (*spray congealing*), contenente il farmaco, in una camera di essiccamento (o congelamento per lo *spray congealing*) in cui si ha la solidificazione di particelle porose, di forma quasi sferica e di dimensioni uniformi (figura 8.10).

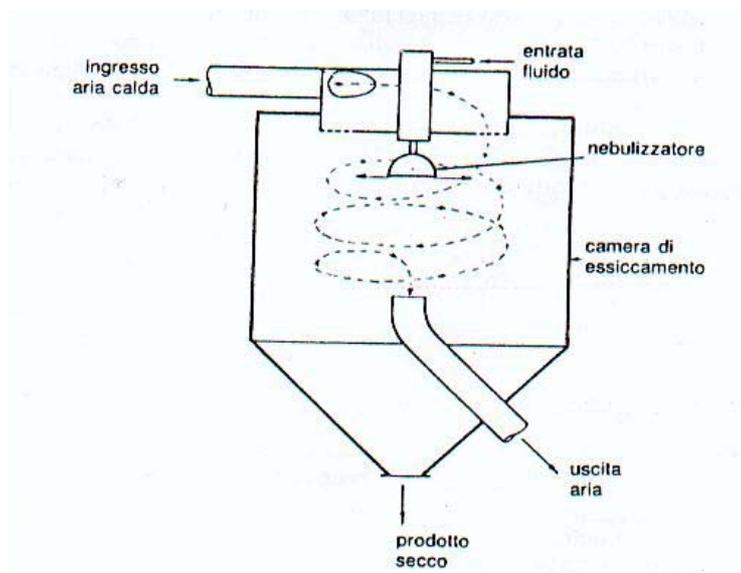


Figura 8.10

¹³ A.Arredo, S.Espuela, J.M.Irache, *Int.J.Pharm*, 2002; **244**:59;

¹⁴ M.Merodio, A.Arredo, M.J. Renedo, J.M.Irache, *Int.J.Pharm*, 2001; **12**:251;

Per la preparazione di microparticelle di idrogel si nebulizzano soluzioni acquose in cui sono presenti il polimero ed un agente reticolante. L'uso di questa tecnica presenta dei vantaggi tra cui: produzione di particelle con buona solubilità in acqua, ottime rese, bassi costi. Tra gli inconvenienti ricordiamo la scelta limitata dei polimeri, in quanto sono necessari materiali che danno soluzioni a bassa viscosità; inoltre il processo necessita di agenti emulsionanti che danno goccioline di olio del diametro di 1-3 μm ; il materiale deve formare goccioline sufficientemente piccole per favorire un'evaporazione istantanea del solvente.

Microsfere di albumina realizzate con questa tecnica possono essere utilizzate come formulazioni inalatorie per indirizzare farmaci quali ciprofloxacina^[15] e tetrandrina^[16] a livello polmonare.

8.10 Applicazioni delle microsfere nel rilascio del principio attivo

Il maggiore utilizzo delle microsfere di albumina è nella veicolazione di farmaci. Una caratteristica importante di tali sistemi microparticellari è che a seconda delle loro dimensioni possono localizzarsi maggiormente, dopo somministrazione, in alcuni organi specifici. Ciò consente un rilascio di farmaco molto selettivo con una notevole diminuzione della sua distribuzione in altri organi che nulla hanno a che fare con l'effetto terapeutico del farmaco. Dopo iniezione e.v. microsfere di 15-30 μm di diametro o anche più grandi, passano attraverso il cuore e poi nel letto capillare dei polmoni, dove si depositano per il 99%. Microsfere più piccole, per esempio, dell'ordine di 3 μm , passano invece attraverso il sistema reticolo endoteliale del fegato, nel quale si depositano per il 90%. Mentre microsfere di 1 μm si distribuiscono per l'80-90% nel fegato, 5-8% nella milza e 1-3% nel midollo osseo. I polmoni, il fegato e la milza sono gli unici organi che possono essere raggiunti con una certa facilità per semplici iniezioni endovena, mentre altri organi, o siti specifici di organi, o tumori solidi possono essere raggiunti dalle microsfere con metodi angiografici specifici. Le microsfere di albumina possono essere caricate anche con radioisotopi (¹³¹I, ¹²⁵I, ⁵⁹Fe, ⁹⁹Tc) ed essere utilizzate come agenti diagnostici iniettabili endovena per valutare l'integrità di alcuni organi e vasale, per determinare la presenza di trombi o di

¹⁵ F.Q. Li, J.H. Hu et al., *J.Microencapsul.*, 2001; **18**: 825;

¹⁶ F.Q. Li, B. Lu et al, *Yao Xue Xue Bao*; **36**: 220 (PMID:12580092)

tumori solidi nell'organismo, per valutare l'efficienza polmonare; sono usate anche come indicatori per la fagocitosi delle cellule di Kupffer. In alcuni casi le radiomicrosfere possono essere usate in terapie importanti come nella terapia antitumorale^[17-18]. L'efficienza delle microsfere di albumina come carriers di farmaci dipende dalla quantità di farmaco che sono in grado di intrappolare e dalle modalità con cui esse lo rilasciano nell'organismo. Generalmente qualunque sia il metodo di preparazione delle microsfere di albumina è stato valutato che farmaci poco solubili in acqua, come gli steroidi, diffondono molto lentamente dalla matrice proteica, mentre la maggior parte dei farmaci idrosolubili sono rilasciati dalle microparticelle di albumina con un andamento bifasico (figura 8.11). Si distinguono una fase iniziale in cui il farmaco viene rilasciato molto rapidamente e una successiva in cui il farmaco è rilasciato più lentamente. Queste due fasi seguono una equazione cinetica del primo ordine, in cui la velocità di rilascio è proporzionale alla quantità di farmaco rimasto nelle microsfere.

$$-dC/dt = KC \quad (\text{eq.8.1})$$

In questa equazione C è la concentrazione di farmaco rimasto nelle microsfere; C_0 è la concentrazione di farmaco al tempo $t = 0$; k è la costante di velocità di rilascio di farmaco.; e t è il tempo. L'equazione 8.1 può essere integrata e riarrangiata per dare l'equazione 8.2, in cui C/C_0 è la frazione di farmaco rimasto nelle microsfere al tempo t .

$$\ln (C/C_0) = -Kt \quad (\text{eq.8.2})$$

Se si pone la concentrazione al tempo t uguale alla metà della concentrazione iniziale di farmaco nelle microsfere, il tempo t è l'emivita del farmaco nelle microsfere ed è calcolabile con l'equazione 8.3.

$$t_{1/2} = 0.693/K \quad (\text{eq.8.3})$$

¹⁷ Y.Nishiota, S.Kyotani et al, *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokio), 1989; **37**: 1399; (PMID: 2630107);

¹⁸ E.J. Truter, A.S. Santos, W.J. Ells, *Cell.Biol.Int.*, 2001; **25**:51;

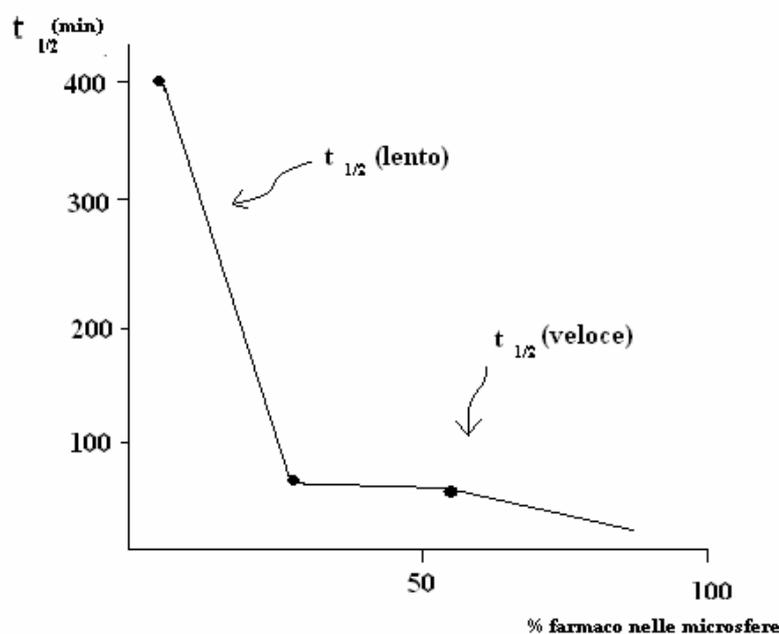


Figura 8.11

Questo andamento può essere molto utile in terapia, perché una prima fase, in cui la velocità di rilascio è molto alta, consente di portare velocemente la concentrazione ematica di farmaco a livelli ottimali, mentre una seconda fase di rilascio più lenta permette di mantenere questi livelli nel tempo.

La quantità di farmaco intrappolato nelle microsfere può essere valutata in diversi modi. Si può per esempio analizzare la quantità di farmaco rimasto nel sistema dopo la preparazione delle microsfere. La differenza fra la quantità introdotta inizialmente e quella rimasta nell'emulsione e nei lavaggi corrisponde alla quantità di farmaco inglobato nelle microsfere. Un secondo metodo è caratterizzato dall'uso di farmaco radioattivo, che consente una valutazione diretta. L'efficienza di tale metodo dipende soltanto dalla validità del composto e dall'eventuale contaminazione del sistema. Un terzo metodo consiste nel degradare le microsfere preparate con una miscela di HCl al 5% in etanolo. In questo caso un limite della valutazione è correlato alla possibile degradazione del farmaco e/o all'interferenza dei prodotti risultanti dalla demolizione delle microsfere. L'ultimo metodo, il più attendibile, è caratterizzato dalla misura della quantità di farmaco incorporato in microsfere *non stabilizzate*. In genere la fase di stabilizzazione delle microsfere, qualunque sia la tecnica adoperata per la loro

preparazione, ha un effetto insignificante sull'incorporazione del farmaco. Disciogliendo le microsfele non stabilizzate (freeze-dried) in una soluzione tampone (una fase che è quasi istantanea) si può valutare facilmente la quantità di farmaco in soluzione.

CAPITOLO IX

SISTEMI MICROPARTICELLARI DI BSA: PROGETTAZIONE, REALIZZAZIONE E VALUTAZIONE IN VITRO

9.1 Introduzione

La ricerca farmaceutica è sempre più indirizzata verso la produzione di sistemi capaci di veicolare il principio attivo, modulandone la velocità di rilascio. Tali sistemi devono essere necessariamente costituiti da materiali con opportune caratteristiche e l'albumina è molto interessante da questo punto di vista perché è facilmente reperibile, non tossica, non immunogenica, biodegradabile e biocompatibile. Un notevole limite dei sistemi microparticellari di albumina finora prodotti è rappresentato da una scarsa modulabilità delle loro proprietà che ne riduce drasticamente le applicazioni. La produzione di matrici di albumina tramite polimerizzazione di tipo radicalico consente di ottenere materiali molto versatili con proprietà modulabili. Variando le caratteristiche e la quantità del comonomero è possibile la realizzazione di sistemi microparticellari che possono trovare le più svariate applicazioni. Nei sistemi formati con tale metodologia, inoltre, le catene di albumina sono solidamente strutturate per mezzo di legami covalenti C-C; questo conferisce loro una maggiore stabilità rispetto ai sistemi in cui le stesse catene sono connesse tramite interazioni deboli e/o legami facilmente idrolizzabili. La polimerizzazione radicalica ha un meccanismo di crescita a catena che ha inizio con la formazione di radicali primari prodotti dalla scissione di un opportuno iniziatore. Affinché la reazione si propaghi sulle catene polipeptidiche, consentendone la reticolazione, è necessario che siano presenti, su tali catene, dei gruppi capaci di interagire con specie radicaliche, rendendosi essi stessi dei centri attivi di propagazione. Questi gruppi reattivi, come quelli vinilici, non sono presenti sulle proteine native, pertanto è necessario introdurli facendo reagire la

proteina, prima della sua reticolazione, con un opportuno agente derivatizzante, quale ad esempio l'anidride metacrilica. Studi preliminari ci hanno permesso di trovare le condizioni ottimali di polimerizzazione, e la realizzazione di varie microsfeere di albumina funzionalizzata e dimetilacrilammide (DMAA)^[1] Abbiamo dimostrato come le caratteristiche di tali microsfeere siano strettamente dipendenti dal loro grado di reticolazione, che a sua volta è influenzato dalla percentuale di funzionalizzazione della proteina e dalla quantità di comonomero utilizzato nella copolimerizzazione. Tutti i materiali ottenuti manifestando una forte capacità di assorbire e trattenere acqua risultano ideali per la veicolazione dei principi attivi. I materiali preparati sono stati testati utilizzando farmaci modello e i profili di rilascio registrati risultano dipendere sia dalla reticolazione della matrice polimerica, sia dalle interazioni matrice-farmaco-ambiente esterno^[2]. Al fine di accentuare le caratteristiche pH-sensibili di tali materiali la DMAA è stata sostituita con metacrilato di sodio (NaM) in modo da ottenere un materiale che, rigonfiando esclusivamente a valori di pH superiori a 5-6, risulta ideale per la veicolazione orale di principi attivi^[3]. I materiali preparati sono stati testati analizzando il profilo di rilascio, in fluidi simulanti quelli gastrointestinali, di farmaci modello.

9.2 Funzionalizzazione con anidride metacrilica della BSA

Da un'attenta analisi si è dedotto che le modifiche più facilmente applicabili all'albumina sono quelle che coinvolgono i gruppi amminici delle lisine, che tra i gruppi disponibili sono i più reattivi e non richiedono drastiche condizioni di reazione. Il nostro intento è funzionalizzare il polipeptide con gruppi suscettibili di polimerizzazione radicalica. La reazione con glicidil acrilato^[4], potenzialmente utile per i nostri fini, prevede l'apertura dell'anello epossidico della molecola con formazione di un ossidrile libero. L'introduzione di funzioni ossidriliche sulla

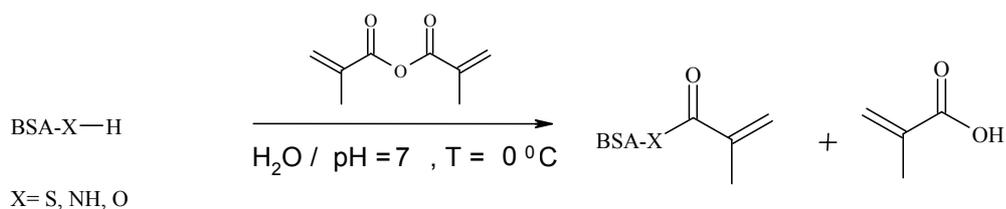
¹ F.Iemma, U.G.Spizzirri, R.Muzzalupo, F.Puoci, S.Trombino, N.Picci, *Coll. Polym. Sci.*, 2004; **283**:250;

² F.Iemma, U.G.Spizzirri, R.Muzzalupo, F.Puoci, S.Trombino, N.Picci, *Drug Delivery.*, 2005; **12** :279;

³ F.Iemma, U.G.Spizzirri, F.Puoci, R.Muzzalupo, S.Trombino, R.Cassano, S.Leta, N.Picci, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006; **312**: 151-157;

⁴ K.Park, *Biomaterials*, 1998; **9**: 435;

molecola di albumina provoca un'alterazione della sua struttura terziaria, in seguito all'instaurarsi di legami a idrogeno intra-molecolari. La funzionalizzazione della proteina con anidride metacrilica, riportata in schema 9.1, producendo un sistema complessivamente meno idrofilo, consente di evitare tali perturbazioni.



Schema 9.1 – Funzionalizzazione della BSA con anidride metacrilica

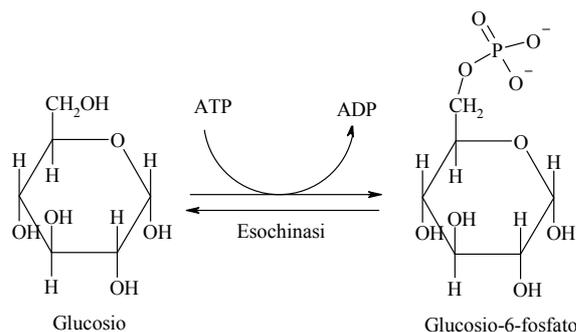
L'ambiente di reazione in cui è condotta la funzionalizzazione della BSA deve tenere in considerazione le caratteristiche chimico-fisiche e strutturali della proteina serica, che si denatura facilmente a temperature superiori ai 50 °C ed a pH diversi da quello ematico (7.2-7.4). La BSA viene solubilizzata in H₂O distillata ad una temperatura inferiore a 0°C e trattata con anidride metacrilica, monitorando costantemente il pH e riportandolo a valori ottimali, se necessario, con una soluzione di bicarbonato di sodio. In realtà, proprio l'abbassamento del pH è indice dell'avvenuta reazione poiché l'anidride reagendo con la proteina sviluppa acido metacrilico, con conseguente aumento dell'acidità della soluzione. Nello schema di reazione l'albumina è rappresentata come BSA-X-H, dove X= S, NH, O ad indicare i gruppi nucleofili degli amminoacidi cisteina, lisina, serina e tirosina che possono essere funzionalizzati. Nell'albumina, i residui di cisteina, nonostante l'elevata nucleofilicità del gruppo tiolico, non sono disponibili per la reazione di acilazione, perché partecipano tutti, tranne il gruppo in posizione 34, alla formazione dei ponti disolfuro. La quantità totale di residui potenzialmente derivatizzabili su una molecola di BSA, in base alla composizione amminoacidica riportata in tabella 8.1, risulta pari a 114 (Lis 60, Tir 21, Ser 32, Cis 1), ma in pratica è nettamente inferiore perché la struttura terziaria impedisce l'interazione tra i gruppi in catena laterale e l'agente acilante. In ordine di reattività, ai gruppi tiolici delle cisteine seguono i gruppi amminici delle lisine e successivamente i gruppi ossidrilici delle tirosine e delle serine. I gruppi ossidrilici, la cui

nucleofilicità risulta comunque limitata dalle condizioni in cui viene condotta la reazione (pH neutro e bassa temperatura), potrebbero intervenire nella reazione con anidride metacrilica, solo quando tutti i gruppi amminici stericamente disponibili hanno reagito. La reazione di acilazione della proteina con anidride metacrilica è molto rapida e va a completezza entro un'ora dall'inizio. Il grado di funzionalizzazione della proteina è indipendente dal tempo di reazione mentre risulta strettamente correlato alla quantità di agente derivatizzante utilizzato. Questo ci ha consentito di ottenere materiali con diversi gradi di funzionalizzazione (DD%), come mostrato nella seguente tabella 9.1.

BSA (mg)	MA (mmoli/mg)	H₂O (ml)	pH	T°(C)	Campione	DD%
500	0,081/12,5	3	6,5-7,5	0	A	4%
500	0,162/25,0	3	6,5-7,5	0	B	22%
500	0,268/41,3	3	6,5-7,5	0	C	33%
500	0,536/82,6	3	6,5-7,5	0	D	63%
500	1,343/207,0	3	6,57,5	0	E	100%

Tabella 9.1 – Funzionalizzazione della BSA con MA

La prova che tale reazione non altera notevolmente la struttura della proteina e la sua funzionalità quando è usata una ridotta quantità di agente acilante è data dalla conservazione dell'attività enzimatica dell'esochinasi di Beker's Yeast funzionalizzata con modalità analoghe a quanto descritte per la BSA. L'esochinasi è un enzima importante nel processo glicolitico e trasferisce un gruppo fosfato da una molecola di ATP su una molecola di glucosio secondo lo schema seguente:



Schema 9.2 – Meccanismo d'azione dell'esocinasi

La funzionalizzazione con anidride metacrilica dell'esocinasi ne permette l'ancoraggio in gel poliacrilammide per elettroforesi, ma non ne altera le proprietà enzimatiche^[5].

9.2.1 Purificazione della BSA funzionalizzata

La soluzione ottenuta dopo la reazione di funzionalizzazione deve essere purificata per eliminare i sali presenti, per lo più a causa dell'aggiunta di bicarbonato di sodio o di anidride metacrilica non reagita. La purificazione viene realizzata mediante dialisi per ultrafiltrazione, che consente di eliminare tutte le scorie senza danneggiare in alcun modo la proteina. Il principio della dialisi è molto semplice e si basa sulla diffusione dei sali attraverso una membrana semipermeabile in funzione del loro gradiente di concentrazione e delle loro dimensioni^[6]. I tubi da dialisi, riempiti della soluzione in questione, sono immersi in una vasca contenente H₂O distillata a 20°C. In tal modo i sali passano, attraverso i pori della membrana, dall'interno del tubo verso l'esterno, dove la loro concentrazione è nulla, mentre la proteina viene trattenuta in virtù delle sue dimensioni, che sono maggiori rispetto a quelle dei pori del tubo. Naturalmente l'H₂O della vasca deve essere sostituita più volte affinché sia sempre favorita la fuoriuscita dei sali dal tubo, per differenza di concentrazione. La durata della dialisi è di 24h in modo tale da ottenere una soluzione di albumina

⁵ L.Luberto, Tesi di laurea in Scienze Biologiche, Università della Calabria, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, A.A 2001-2002.

⁶ M.Bollag, M.D.Rozycki, *Protein Method wiley-Liss*, 1997; 100;

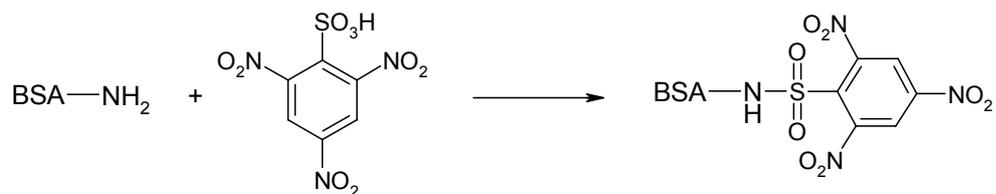
⁷ D.Failla, D.V.Santi. *Anal.Biochem.* 1973; **52**: 363;

funzionalizzata ad elevata purezza. La soluzione dializzata della proteina deve essere in seguito liofilizzata per l'eliminazione del solvente acquoso.

9.2.2 Caratterizzazione dei campioni di BSA funzionalizzata

L'efficienza della reazione è stata valutata qualitativamente dal confronto degli spettri all'infrarosso di un campione di albumina nativa e dei campioni di albumina derivatizzata. Lo spettro mostra l'aumento della banda a 1454 cm^{-1} attribuibile ai gruppi metilici della funzione metacrilica.

Poichè la reazione di acilazione interessa esclusivamente le funzioni amminiche della lisina, il grado di derivatizzazione può essere determinato spettrofotometricamente valutando il numero di gruppi amminici disponibili usando come cromoforo l'acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS)^[7] (schema 9.3).



Schema 9.3 - Reazione tra la Bsa funzionalizzata e il TNBS

Questo, tra tutti i metodi che consentono di definire il numero di gruppi amminici terminali è applicabile ai sistemi idrosolubili.

Per reazione della BSA nativa con TNBS è stata determinata la quantità totale di gruppi amminici disponibili sulla proteina. La stessa reazione ripetuta su campioni variamente funzionalizzati ha permesso di stabilire la quantità di gruppi amminici disponibili che hanno subito reazione di acilazione. La percentuale di derivatizzazione è stata calcolata come segue:

$$\%DD = \frac{A_n - A_f}{A_n} \cdot 100 \quad (\text{eq. 9.1})$$

A_n = Assorbanza per grammo di BSA nativa

A_f = Assorbanza per grammo di BSA funzionalizzata

Gli spettri UV-visibile effettuati su tutti i campioni di albumina derivatizzata preparati (figura 9.1) rivelano un'assorbanza a 420 nm (ABS), tipica del cromoforo, che risulta direttamente proporzionale alla quantità di gruppi amminici presenti sul polipeptide ed è nulla quando si analizzano campioni in cui tutti i gruppi amminici disponibili sono stati saturati.

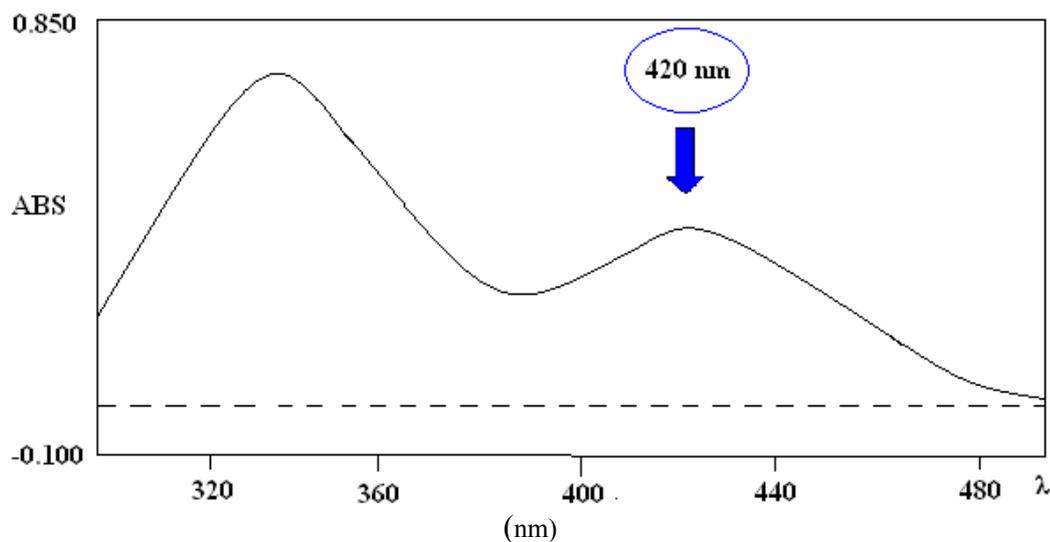


Figura 9.1 – Spettro d'assorbimento UV di soluzioni di TNBS

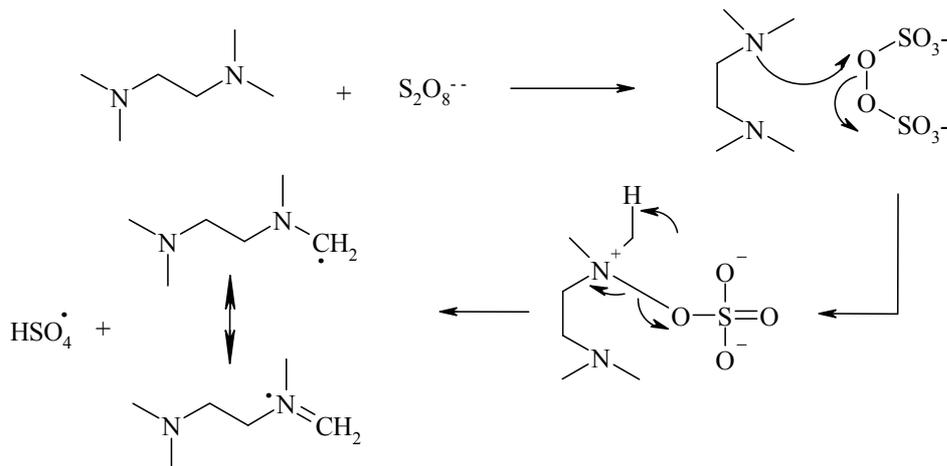
I valori di assorbanza normalizzati a 1 g di campione risultano direttamente proporzionali alla quantità di gruppi amminici disponibili presenti. Se si assume come coefficiente di estinzione molare quello corrispondente alla lisina legata al TNBS si può andare a determinare il numero dei gruppi amminici realmente disponibili su una molecola del polipeptide. Da calcoli effettuati, nel limite dell'errore che tale approssimazione può comportare, risulta che dei 60 gruppi amminici complessivamente presenti in una molecola di albumina, circa 20 sono effettivamente disponibili.

9.3 Preparazioni di sistemi microparticellari

La tecnica utilizzata per la preparazione delle microparticelle di BSA è la polimerizzazione in emulsione in fase inversa. Questa tecnica consiste nell'aggiunta di una soluzione acquosa di un monomero ed eventualmente di un comonomero in un eccesso di solventi organici non miscibili, sotto agitazione, per

ottenere piccole gocce di fase dispersa che per diminuire la loro energia libera interfacciale assumono una forma sferica.

La reazione è stata eseguita sospendendo la soluzione acquosa contenente l'albumina funzionalizzata, la N,N-dimetilacrilammide (DMAA) come comonomero e l'iniziatore (fase dispersa) in una miscela di solventi organici formata da tetracloruro di carbonio ed esano (fase disperdente). Al fine di garantire una migliore frammentazione della fase contenente i monomeri, la densità della fase organica viene regolata per aggiunta di uno dei due solventi fino ad ottenere una fase acquosa in equilibrio indifferente con la fase organica. La tendenza delle gocce ad aggregarsi può essere mitigata diminuendo le loro collisioni sottoponendo la sospensione a vigorosa agitazione (900-1000 giri/minuto), inoltre, tali gocce possono essere maggiormente stabilizzate nella fase organica dall'aggiunta di una miscela di tensioattivi: il sorbitan trioleato (Span85) e poliossietilenglicole sorbitan trioleato (Tween85). La polimerizzazione viene avviata dall'aggiunta sotto agitazione dell'iniziatore radicalico, il persolfato d'ammonio ((NH₄)₂S₂O₈), che si decompone per formare dei radicali primari alla temperatura di 35-40°C. Successivamente si aggiunge l'N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TMEDA) che agisce da acceleratore della decomposizione del persolfato d'ammonio (schema 9.4). Dopo circa due ore la reazione va a completezza.



Schema 9.4 – Dissociazione del persolfato d'ammonio

La messa a punto del metodo di polimerizzazione ha previsto una serie di tentativi volti a trovare le condizioni ideali. È stato osservato come l'HLB (bilancio idrofilo-lipofilo) del tensioattivo e il sistema iniziatore giocano un ruolo fondamentale nell'ottenimento di sistemi microparticellari sferici. Il ruolo degli additivi, in particolare, è molto importante nello stabilizzare l'emulsione e consiste nel ridurre la tensione superficiale tra gocce di monomero e il mezzo disperdente con conseguente riduzione della tendenza a coagulare. In genere, in emulsioni acqua in olio (w/o) i tensioattivi vengono usati alla concentrazione di 0.5-1.5% in peso rispetto all'acqua, perché valori superiori causano un eccessivo schiumeggiamento. In letteratura^[8] è riportato che una migliore stabilizzazione dell'emulsione si raggiunge utilizzando una miscela di due tensioattivi aventi valori molto distanti di HLB. Il rapporto in volume tra i due surfattanti deve essere tale che il sistema risultante deve possedere un determinato valore di HLB dipendente dalla fase dispersa. Le numerose prove effettuate hanno consentito di determinare il giusto rapporto tra lo Span 85 (HLB = 1.8) e il Tween 85 (HLB = 11) che ha permesso di ottenere un sistema con un HLB di 3.0.

Si è osservata la polimerizzazione, anche se non sempre si è avuta la formazione di materiali autoconsistenti, utilizzando come sistema iniziatore $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{TMEDA}$. Sono stati provati altri sistemi iniziatori tra cui l'azobis(isobutirronitrile) (AIBN), riportato in letteratura come iniziatore di polimerizzazione radicaliche in emulsione^[9], e perossido di benzoile/ioni ferroso. In particolare l'AIBN non è idrosolubile, ma è solubile nella fase organica, ma la sua applicazione come iniziatore mediante la tecnica di polimerizzazione radicalica in emulsione inversa dovrebbe consentire l'ottenimento di microsfeere con diametro minore, rispetto a quelle che si ottengono nelle stesse condizioni usando come iniziatore persolfato d'ammonio. Tuttavia l'uso di tali sistemi per i nostri substrati non ha condotto a risultati significativi. Le dimensioni, intese come diametro medio delle particelle, che si ottengono generalmente con questa tecnica di polimerizzazione sono comprese nell'ampio range di 1mm-50 μm anche se 100-300 μm costituisce l'intervallo più comune. Le dimensioni delle particelle sono determinate da molti parametri riconducibili alla natura e ai

⁸ B.Kriwet, E.Warter, T.Kissel, *J.Contr.Real.*, 1998; **56**: 149;

⁹ D.B.Scully, *J.Appl.Pol.Sci.*, 1976, **20**, 7299

rapporti delle sostanze usate nonché alle caratteristiche del reattore, dove con questo termine si riassumono la velocità e il tipo di agitazione nonché la forma e le dimensioni del reattore. Alcune generalizzazioni sono state fatte e si può dire che il diametro medio delle particelle è direttamente proporzionale alla tensione interfacciale tra le due fasi liquide e alla frazione del volume della fase dispersa, mentre è inversamente proporzionale alla velocità di agitazione, alla densità delle gocce di monomero e alla grandezza delle pale di agitazione. La reticolazione della BSA acilata con DMAA, ha portato alla formazione di materiali microparticellari di forma e consistenza variabili. Le polimerizzazioni effettuate sono riassunte in tabella 9.2, mentre la forma del materiale rispettivamente prodotto da ciascuna polimerizzazione è riportato in tabella 9.3. Dai risultati ottenuti si evince che la omo-polimerizzazione di tutti i campioni di BSA realizzati, così come la co-polimerizzazione con un forte eccesso di DMAA, producono materiali scarsamente reticolati. Nel primo caso la proteina, che probabilmente continua a mantenere almeno in parte la sua struttura terziaria, reticola a maglie talmente larghe da non riuscire a formare una struttura sferica autoconsistente. Aumentando il grado di acrililazione della BSA si osserva la formazione di particelle aventi forma sferica in un materiale che continua comunque a mantenere una forma prevalentemente irregolare. Nel secondo caso si osserva la formazione di polimeri di DMAA in cui le unità di agente reticolante (BSA) non sono sufficienti a creare un sistema abbastanza reticolato.

Tabella 9.2 – Sintesi dei sistemi polimerici BSA_f-DMAA

FASE DISPERSA		FASE DISPERDENTE		RESINE	
Reagenti		H ₂ O	CCl ₄ /Esano	mg	Sigla
BSA _f (mg) _{DD}	DMAA (mg)	(ml)	(ml/ml)	(conv.%)	
(45) ₄	451	3	16/25	/	A1
(270) ₄	269	3	15/23	/	A2
(350) ₄	221	3	15/23	/	A3
(450) ₄	45,1	3	15/23	450 (91%)	A4
(500) ₄	0	3	16/24	475 (95%)	A5
(45) ₂₂	451	3	15/23	/	B1
(270) ₂₂	269	3	15/23	387 (22%)	B2
(350) ₂₂	221	3	15/23	445 (78%)	B3
(450) ₂₂	45,1	3	15/23	436 (88%)	B4
(500) ₂₂	0	3	15/23	475 (95%)	B5
(45) ₃₃	451	3	16/23	/	C1
(270) ₃₃	269	3	16/23	527 (98%)	C2
(350) ₃₃	221	3	15/23	553 (97%)	C3
(450) ₃₃	45,1	3	15/23	480 (97%)	C4
(500) ₃₃	0	3	16/23	465 (93%)	C5
(45) ₆₃	451	3	15/23	/	D1
(270) ₆₃	269	3	15/23	432 (80%)	D2
(350) ₆₃	221	3	16/23	513 (90%)	D3
(450) ₆₃	45,1	3	15/23	376 (76%)	D4
(500) ₆₃	0	3	16/23	315 (63%)	D5
(45) ₁₀₀	451	3	16/23	/	E1
(270) ₁₀₀	269	3	16/23	511 (95%)	E2
(350) ₁₀₀	221	3	16/23	560 (98%)	E3
(450) ₁₀₀	45,1	3	15/23	416 (84%)	E4
(500) ₁₀₀	0	3	16/23	400 (80%)	E5

Sistema iniziatore: Persolfato d'ammonio (100 mg), TMEDA (150 µl)

BSA_f = Albumina funzionalizzata

DD = percentuale di funzionalizzazione

DMAA = *N,N*-Dimetilacrilammide

Ratio (mol/mol) BSA _f -DMAA	A _f DD%				
	4%	22%	32%	63%	100%
10	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel
	A1	B1	C1	D1	E1
1	Gel	MI	MI	MS	MS
	A2	B2	C2	D2	E2
0,6	Gel	MS	MS	MS	MS
	A3	B3	C3	D3	E3
0,1	MI	MS	MS	MS	MS
	A4	B4	C4	D4	E4
0	MIS	MIS	MIS	MIS	MIS
	A5	B5	C5	D5	E5

Tabella 9.3 – Caratteristiche morfologiche dei sistemi polimerici realizzati (MS: Microparticelle sferiche, MI: Microparticelle irregolari, MIS Microparticelle sferiche e irregolari).

La struttura sferica è da preferire ad altre geometrie nell'ottica di un utilizzo di tali materiali come trasportatori di principi attivi; questa, infatti, elimina lo swelling anisotropico intrinsecamente associato ad altre forme come la cilindrica e la planare. Per ottenere microsfele il rapporto p/p tra BSA funzionalizzata e DMAA ha un ruolo fondamentale. Utilizzando, BSA derivatizzata al 4, 22 e 33% e un leggero eccesso in peso di comonomero si osserva la formazione di materiale scarsamente reticolato. Aumentando la percentuale di acilazione (63%, 100%) della proteina e facendo uso di un lieve eccesso di DMAA si ottengono sistemi microparticellari sferici. Le polimerizzazioni condotte con BSA derivatizzata al 22, 33, 63 e 100%, in eccesso rispetto al comonomero portano alla formazione di microsfele. In definitiva, la tecnica della polimerizzazione radicalica in emulsione inversa messa a punto nel nostro laboratorio ha permesso di ottenere sistemi con caratteristiche diverse rispetto a quelli noti in letteratura e riportati nel capitolo II. La tecnica appena descritta consente di preparare materiali in cui le catene di albumina sono strutturate per mezzo di legami covalenti C-C in un reticolo polimerico molto stabile. Inoltre, i materiali ottenuti risultano molto versatili con proprietà modulabili. E' possibile realizzare sistemi, che consentono il rilascio di farmaci in risposta a stimoli esterni (pH, temperatura, campi elettrici e magnetici) variando, la natura e la quantità del comonomero nelle microparticelle.

9.4 Caratterizzazione delle microsfele BSA_f-DMAA

I campioni ottenuti sono stati caratterizzati mediante misure di rigonfiamento in mezzi che simulano alcuni fluidi biologici, spettrofotometria FT-IR, analisi dimensionale e microscopia elettronica a scansione.

9.4.1 Determinazione del grado di rigonfiamento

Per valutare l'affinità delle microparticelle con mezzi acquosi è stato determinato il loro grado di rigonfiamento (WR%) ponendo in contatto delle aliquote di matrice, esattamente pesate con HCl 0,1 N e tampone fosfato (Na₂HPO₄, KH₂PO₄) a pH 6,8 fino al raggiungimento dell'equilibrio di rigonfiamento, quindi ciascun campione rigonfio è stato filtrato, recuperato e pesato. Il contenuto di acqua inglobato è stato determinato secondo la seguente equazione:

$$WR(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100 \quad (\text{eq. 9.2})$$

dove con W_s e W_d sono stati indicati i pesi dei campioni di resina rigonfi d'acqua e secchi rispettivamente. In tabella 9.4 sono riassunti i dati di WR dei sistemi microparticellari sferici prodotti.

Resina	Contenuto di H ₂ O (%)		R _s
	pH =1	pH =6.8	
B3	478	480	1
B4	184	238	1,3
C3	384	405	1,1
C4	165	200	1,2
D2	567	565	1
D3	376	464	1,2
D4	110	140	1,3
E2	292	442	1,5
E3	261	325	1,2
E4	120	287	2,4

Tabella 9.4: Contenuto di H₂O assorbito dai sistemi microsferici BSA_f-DMAA

Valori crescenti di water-regain sono stati registrati al diminuire della funzionalizzazione della BSA, in accordo con l'aumento del grado di reticolazione, e all'aumentare della percentuale di DMAA, in accordo con la variazione di idrofilia del sistema. Per tutti i materiali si denota un maggiore rigonfiamento a pH=6.8

9.4.2 Spettri FT-IR

La presenza della DMAA all'interno dei materiali è confermata dagli spettri FT-IR (fig. 4.3) che mostrano una banda a 2924 cm^{-1} , caratteristica dei gruppi metilici della DMAA, direttamente proporzionale alla quantità di comonomero presente. Contemporaneamente si osserva la diminuzione della banda a 617 cm^{-1} , molto pronunciata nello spettro IR dei materiali provenienti dalla omopolimerizzazione della BSA funzionalizzata, con l'aumentare della percentuale di DMAA nelle microparticelle.

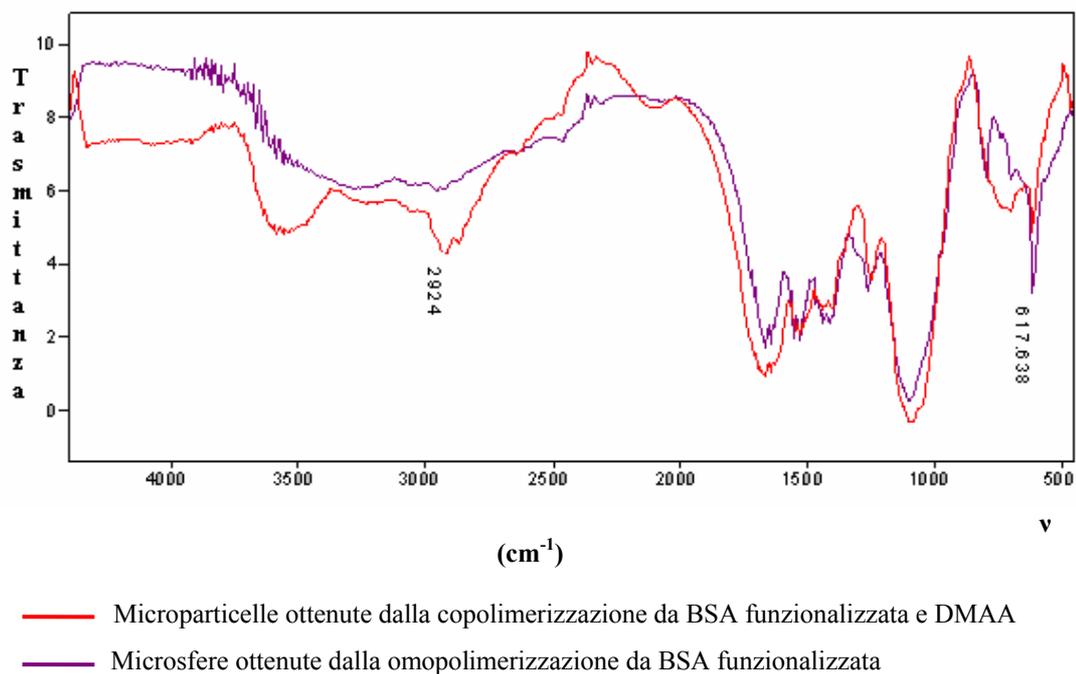
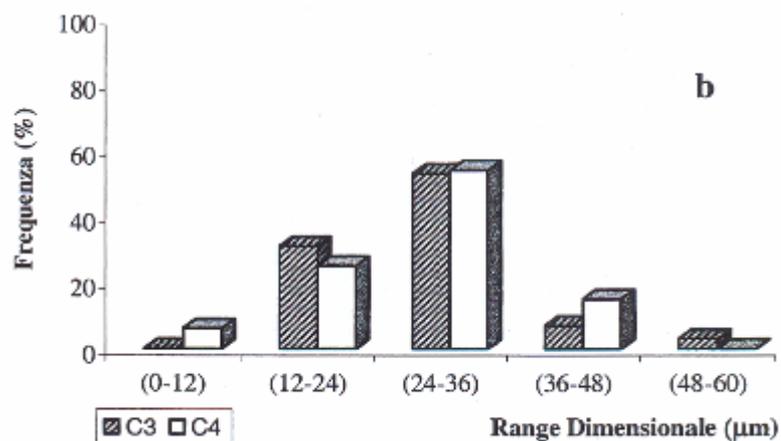
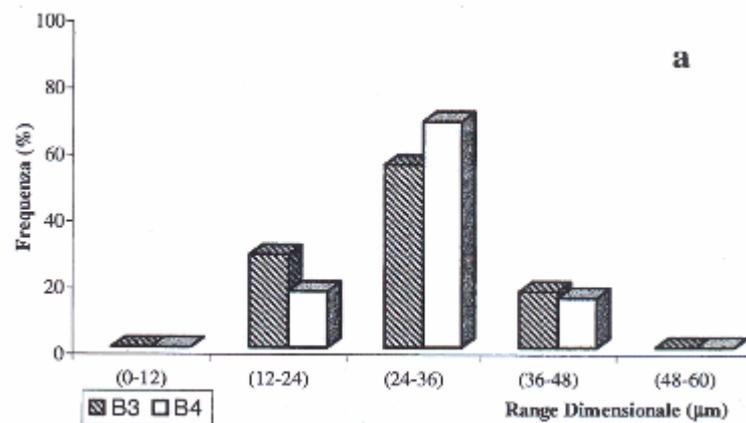


Figura 9.3

9.4.3 Analisi dimensionale

Tutte le matrici sono state caratterizzate mediante analisi dimensionale, usando uno stereomicroscopio collegato ad un analizzatore di immagini. Le distribuzioni dimensionali, di seguito riportate (figura 9.4: a-d), sono rappresentate riportando la frequenza percentuale in funzione delle dimensioni delle particelle. Gli esperimenti effettuati hanno permesso di calcolare per i campioni B3 e B4 un diametro medio di circa 36 μm , per C3 e C4 di 28 μm , per D2, D3 e D4 di 25 μm , per E2, E3 e E4 di 22 μm . I risultati ottenuti dall'analisi dimensionale sono in accordo con l'ipotesi che microparticelle aventi un maggior grado di reticolazione presentano dimensioni più piccole.



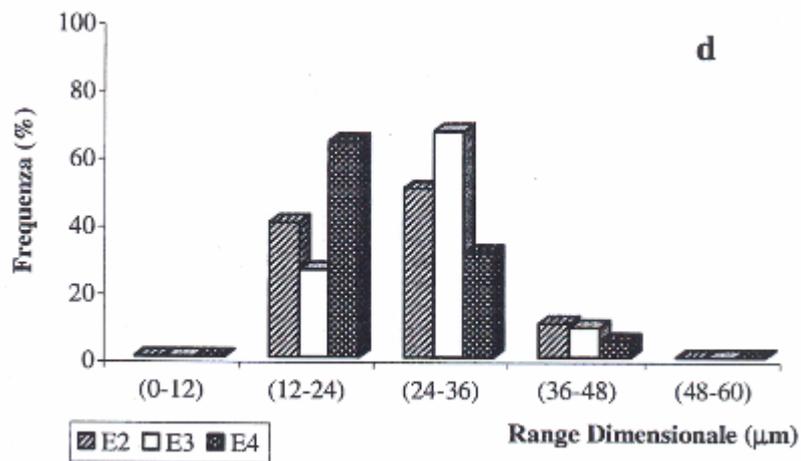
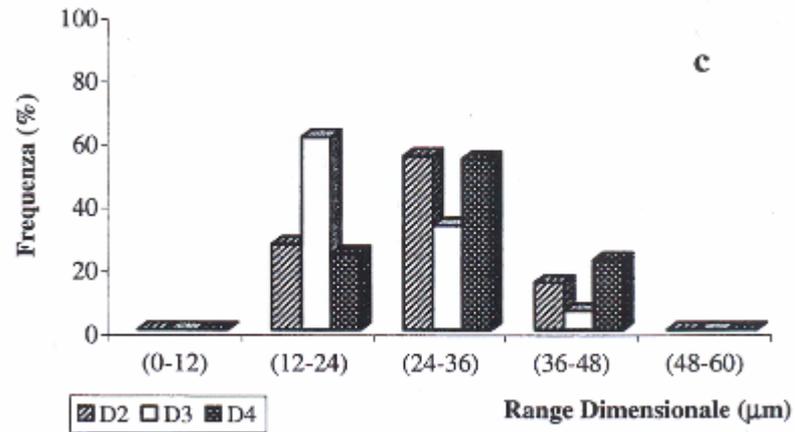


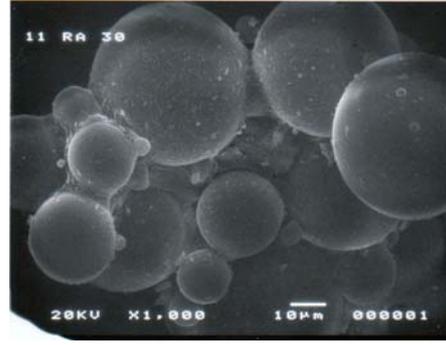
Figura 9.4 – Analisi dimensionale delle microsfere BSA₇-DMAA

9.4.4 Analisi morfologica

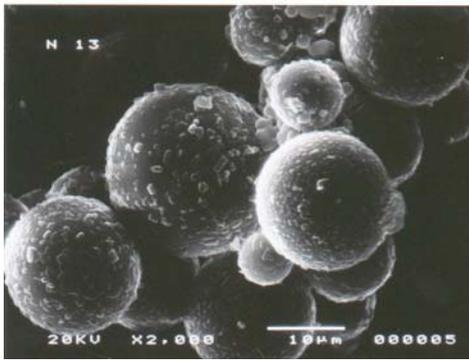
Le copolimerizzazioni effettuate utilizzando la BSA con un adeguato grado di reticolazione e in presenza della giusta quantità di DMAA hanno portato all'ottenimento di sistemi microparticellari di forma sferica, come mostrato dalle fotomicrografie di seguito riportate.



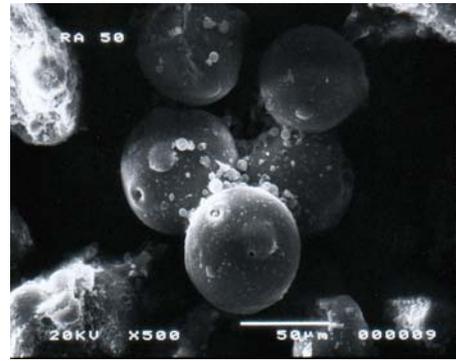
Campione B₃



Campione B₄



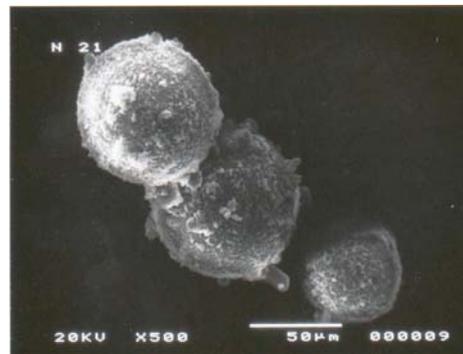
Campione C₃



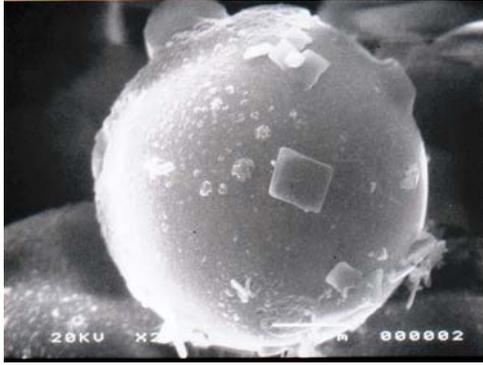
Campione C₄



Campione D₂



Campione D₃



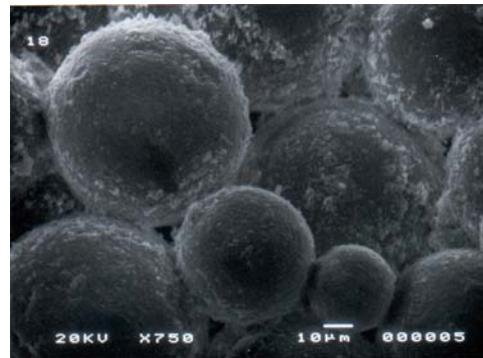
Campione D₄



Campione E₂



Campione E₃



Campione E₄

Figura 9.3 - SEM delle microsfele BSA₇-DMAA

L'analisi della superficie ha evidenziato una struttura estremamente porosa delle microsfele da noi realizzate (figura 9.4).

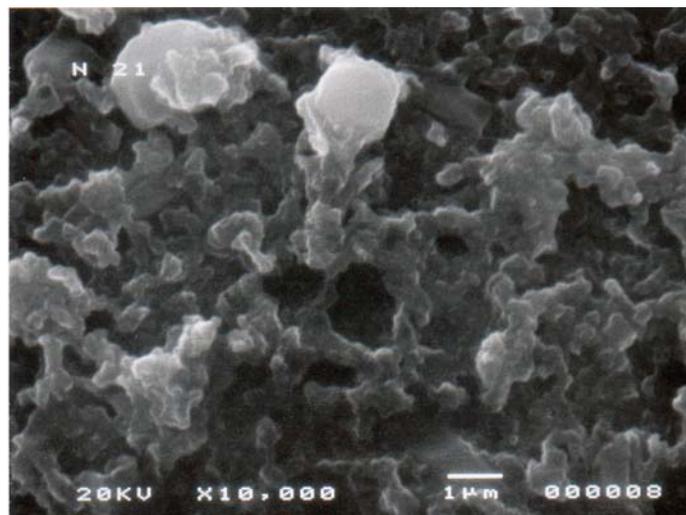


Figura 9.6- SEM della superficie delle microsfele

9.5 Inserimento di farmaci nelle microsfere BSA_f-DMAA

I promettenti risultati ottenuti riguardo le proprietà strutturali e la capacità di rigonfiamento in mezzo acquoso delle matrici polimeriche a base di BSA, ne hanno suggerito un possibile impiego come sistemi per la veicolazione di principi attivi. Allo scopo abbiamo studiato il rilascio di alcuni farmaci modello, introdotti nelle microsfere, con proprietà chimiche diverse (diflunisal, β -propranololo, 5-fluorouracile).

L'inserimento dell'agente terapeutico nelle microsfere può essere effettuato sia mediante la tecnica dell'impregnazione che dell'incorporazione. Questa ultima, tuttavia, risulta applicabile esclusivamente a principi attivi idrosolubili per cui presenta notevoli limitazioni.

9.5.1 Inserimento di farmaco per impregnazione

Nella tecnica dell'impregnazione, il farmaco è posto a contatto con la superficie esterna delle microsfere e, di conseguenza, stabilisce delle interazioni deboli con la matrice prevalentemente a livello di tale superficie. Ciò non toglie che una certa quota di principio attivo possa interagire anche con il nucleo delle microsfere (dipende dalla natura chimica sua e della matrice oltre che dal tempo di caricamento). Al contrario, il metodo di incorporazione prevede l'inserimento del farmaco nelle microsfere già durante la formazione della matrice, ciò implica il suo intrappolamento nella porzione interna di tali particelle ed ovviamente un'interazione farmaco-carrier ben più stabile.

In questo lavoro sono stati preparati sistemi a immobilizzazione fisica in cui l'agente terapeutico viene caricato nella matrice microparticellare a base di albumina mediante impregnazione. Tale metodologia, prevede l'introduzione di una quantità esatta di matrice in un piccolo volume di soluzione di farmaco a concentrazione nota. Il sistema così ottenuto, sottoposto a continua agitazione per tre giorni e in seguito ad allontanamento del solvente conduce alla formazione della matrice impregnata la quale è essiccata fino a costanza di peso. Mediante il procedimento appena descritto abbiamo impregnato le matrici D3, D4 , E3 e E4 con diflunisal, β -propranololo e 5-fluorouracile.

9.5.2 Caratteristiche dei farmaci inseriti nelle matrici

I principi terapeutici sono stati scelti in virtù della loro natura chimica: acida nel caso del diflunisal, basica quella del β -propranololo, neutra per il 5-fluorouracile per poter valutare l'influenza delle loro caratteristiche chimiche sul profilo di rilascio.

Il diflunisal (figura 9.7) è un nuovo antinfiammatorio^[10] chimicamente derivato dall'aspirina, la sua emivita è simile a quella del salicilato ed i livelli ematici raggiungono lo stato stazionario dopo diversi giorni di terapia. Possiede effetti analgesici ed una certa azione antipiretica, dunque risulta indicato in caso di artriti, artrite reumatoide ed affezioni dolorose. Gli effetti collaterali sono simili a quelli degli altri FANS (agenti antinfiammatori non steroidei).

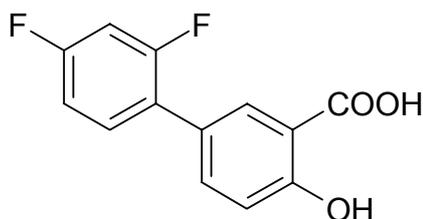


Figura 9.7 – Diflunisal

Il β -propranololo (figura 9.8) è un agente antipertensivo efficace nel ridurre i valori di pressione arteriosa in soggetti moderatamente o lievemente ipertesi. Tale farmaco è un antagonista farmacologico del recettore β -adrenergico, dunque è in grado di ridurre la pressione arteriosa soprattutto modulando la gittata cardiaca^[11].

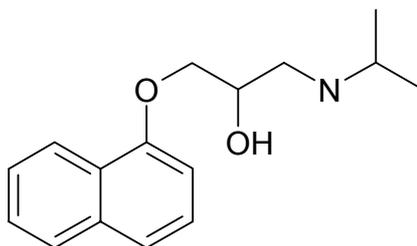


Figura 9.8 – β -propranololo

¹⁰ B.G.Katzung, "Farmacologia Generale e Clinica", IV, 620

¹¹ B.G.Katzung, "Farmacologia Generale e Clinica", IV, 174

Il 5-fluorouracile (figura 9.9) è un farmaco antineoplastico che ha trovato impiego nella terapia di numerosi adenocarcinomi e soprattutto del cancro al colon. Il suo meccanismo d'azione prevede l'inibizione della sintesi del DNA e dunque la morte delle cellule neoplastiche. Il principale limite del 5-fluorouracile è rappresentato dalla breve emivita, ciò implica che il farmaco sia somministrato per via endovenosa^[12].

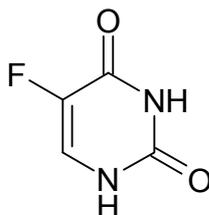


Figura 9.9 – 5-Fluorouracile

9.6 Valutazione del rilascio mediante analisi HPLC

Per valutare le proprietà di rilascio delle microsfele impregnate, è stato eseguito un saggio riportato nella USP XXII^[13] 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).

La quantità di farmaco liberata dalle microsfele di albumina 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 albumina;
- la capacità di *swelling* (o idrorigonfiabilità) della matrice nei diversi mezzi;
- le limitazioni diffusionali derivanti dalla larghezza delle maglie dell'idrogel (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, e tra farmaco e matrice polimerica.

¹² B.G.Katzung, "Farmacologia Generale e Clinica", IV, 946

¹³ USP XXII, "Test di rilascio per farmaci, Metodo A per particelle con rivestimento gastroresistente".

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. Bisogna, inoltre, considerare la fase di caricamento del farmaco sulle microsfele: quando il principio attivo riesce facilmente a penetrare nelle maglie del carrier, stabilisce con esso delle interazioni più stabili e, di conseguenza, verrà rilasciato in misura minore. Queste osservazioni ci permettono di prevedere che le microsfele sintetizzate a base di BSA funzionalizzata non sono un semplice supporto per i farmaci in quanto non sono materiale inerte ma, al contrario, hanno evidente capacità di interazione con le specie ad esse associate. Di seguito sono riportate le osservazioni sperimentali per ciascun farmaco, poiché non è stato osservato un andamento generalizzabile ma, piuttosto, sono stati evidenziati singolari aspetti sui profili di rilascio, dovuti alla diversa natura del principio attivo considerato.

9.6.1 Matrici impregnate con diflunisal

Gli esperimenti eseguiti sui campioni impregnati con diflunisal hanno condotto ad un rilascio limitato (tabella 9.5). Ciò è probabilmente implicabile alla forte relazione che si crea tra il farmaco e la proteina, infatti, l'albumina è particolarmente affine a molecole acide. È plausibile immaginare la formazione di un legame fisico stabile fra diflunisal e matrice che consente a questa molecola di raggiungere meglio la porzione interna della microsfera e conseguentemente di trattenerla con altrettanta facilità. A conferma di quanto detto, si può osservare che i materiali realizzati con una maggiore quantità di BSA_f, poiché stabiliscono un più alto numero di interazioni farmaco-proteina, sono quelli capaci di trattenere meglio il farmaco e, di conseguenza, di rilasciarlo meno. Questo andamento si riscontra sia con i campioni derivatizzati al 63% (D3 e D4) che con i corrispondenti al 100% (E3 e E4). L'interazione tra diflunisal ed ambiente esterno è molto meno spiccata di quella stabilita con la matrice di albumina, infatti tale agente terapeutico è praticamente insolubile in acqua ed è scarsamente solubile in soluzioni acide; dunque anche questo fattore influenza negativamente il rilascio. A proposito

dell'interazione tra diflunisal e mezzo esterno possiamo notare che l'andamento del rilascio è strettamente dipendente dalla variazione di pH: in corrispondenza del cambio di pH la percentuale di farmaco rilasciato subisce un discreto aumento (figure 9.10 e 9.11) dato che tale composto, essendo acido, diffonde prevalentemente in ambiente basico, tuttavia la matrice lo trattiene anche a pH basico.

pH	Tempo (h)	Carrier Polimerico			
		D3	D4	E3	E4
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	5,00	5,70	4,85	1,80
	0,25	5,80	6,10	4,87	1,92
	0,50	5,90	6,20	5,10	2,39
	1,00	5,91	6,40	5,14	2,94
	1,50	6,20	6,64	5,18	2,95
	2,00	6,70	6,90	5,40	2,98
6,8	2,05	19,16	21,8	24,9	8,47
	2,15	27,4	23,7	29,9	11,3
	2,50	29,2	26,3	30,0	14,2
	3,00	45,5	33,7	30,4	16,5
	6,00	51,6	41,3	32,8	19,9
	24,00	60,0	51,6	43,1	29,1

Tabella 9.5 – Profili di rilascio del Diflunisal dai campioni D3,D4,E3,E4

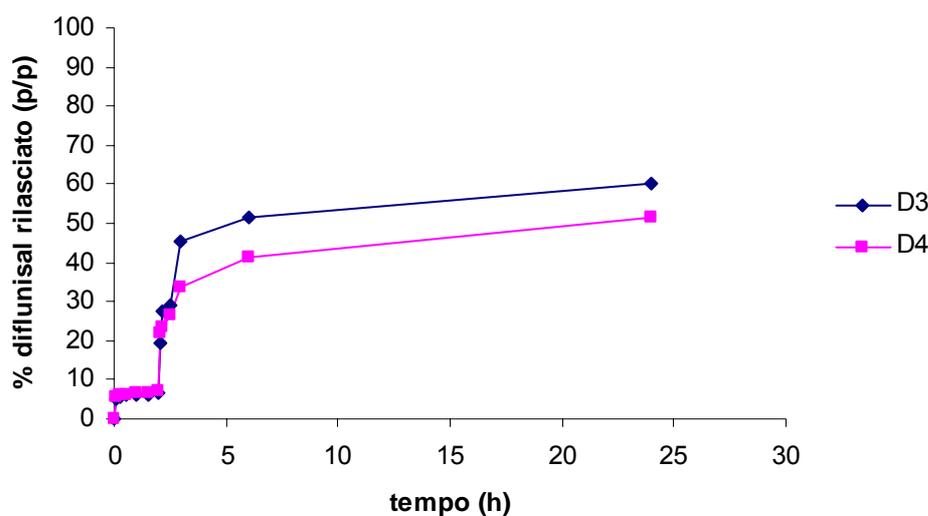


Figura 9.10 – Rilascio di diflunisal in funzione del tempo di D3 e D4

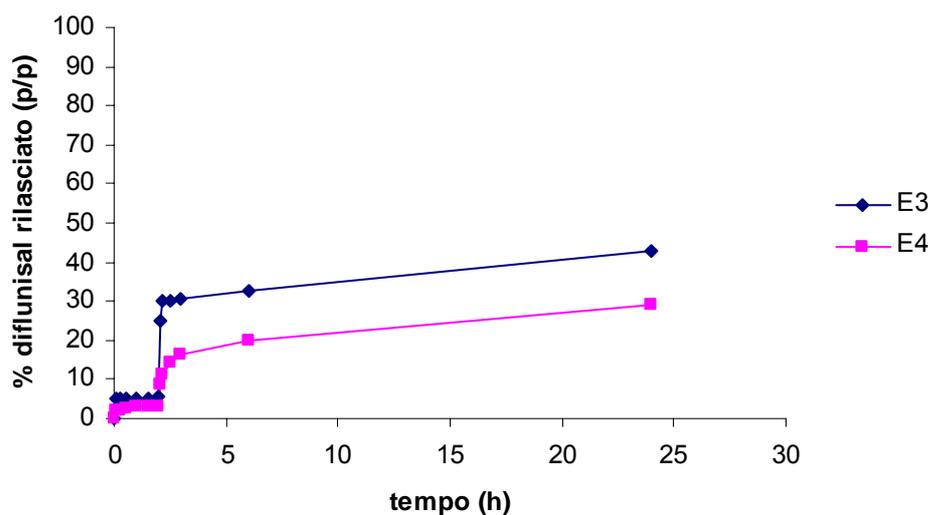


Figura 9.11 – Rilascio di diflunisal in funzione del tempo di E3 e E4

9.6.2 Matrici impregnate con β -propranololo

Rispetto al diflunisal, è possibile osservare un rilascio complessivamente superiore (figure 9.12 e 9.13); quasi tutte le matrici contenenti β -propranololo arrivano, dopo le 24 ore, ad una percentuale di rilascio pari ad 80% (tabelle 9.6). In questo caso il fattore predominante sull'andamento del rilascio è la natura basica del β -propranololo, in quanto costituisce la causa della debole interazione farmaco-proteina e della buona solubilità della molecola nell'ambiente

esterno. Tali condizioni favoriscono il distacco del composto dalla superficie delle microsfere e rendono ininfluyente sia la quantità di BSA_f presente nel carrier, sia il grado di reticolazione della proteina. È opportuno considerare che la natura chimica di questo principio attivo genera repulsione tra il farmaco e le catene basiche di albumina determinando complessivamente l'allargamento delle maglie della matrice, una maggiore capacità di rigonfiamento e, dunque, un rilascio più consistente.

pH	Tempo (h)	Carrier Polimerico			
		D3	D4	E3	E4
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	6,55	10,2	19,2	6,14
	0,25	7,19	13,1	20,9	8,61
	0,50	10,6	17,4	21,8	9,07
	1,00	11,0	25,9	22,2	10,2
	1,50	11,2	27,1	31,0	14,3
	2,00	15,0	27,3	34,0	14,7
	2,05	34,5	48,1	62,1	34,0
6,8	2,15	41,7	48,2	64,6	34,5
	2,50	42,2	50,1	68,7	35,7
	3,00	51,9	54,1	86,7	37,8
	6,00	56,7	77,5	88,0	38,7
	24,00	80,0	80,0	88,8	39,4

Tabella 9.6 – Profili di rilascio del β -propranololo dei campioni D3,D4,E3,E4.

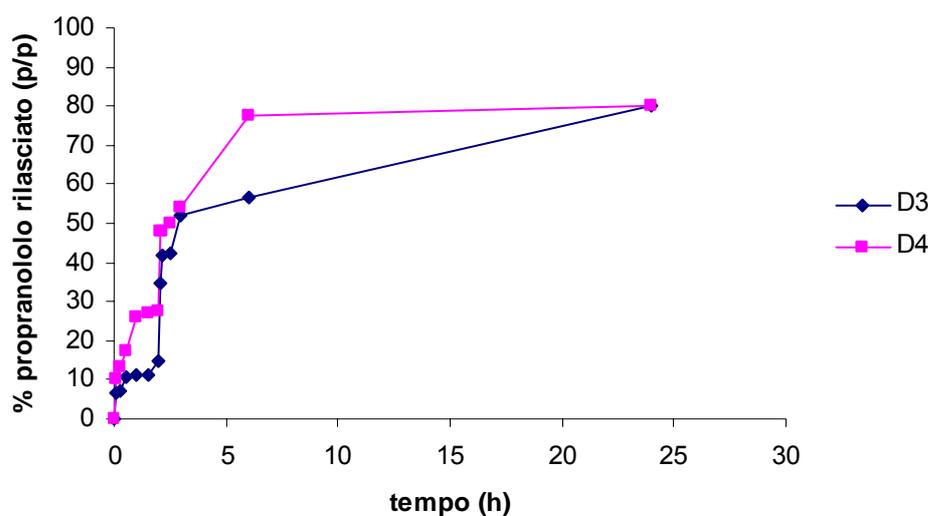


Figura 9.12 – Rilascio del β -propranololo in funzione del tempo dei campioni D3,D4

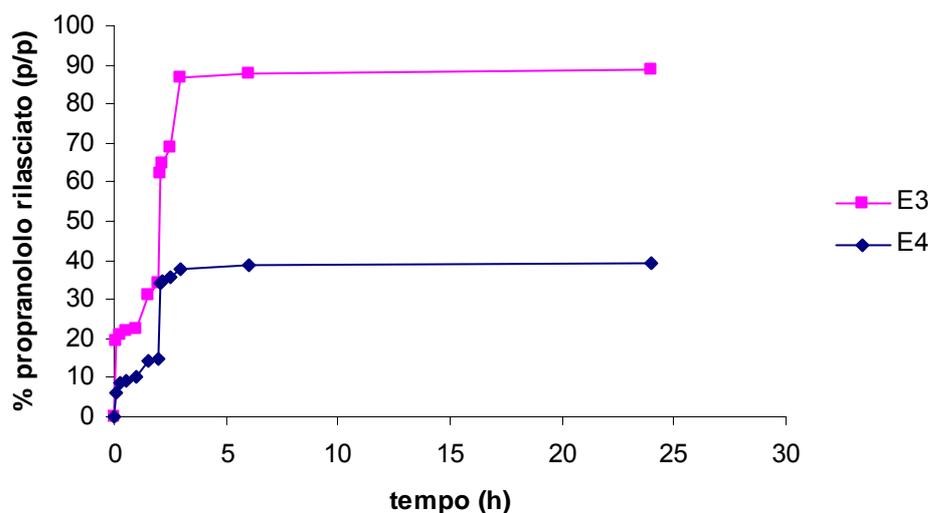


Figura 9.13 – Rilascio del β -propranololo in funzione del tempo dei campioni E3,E4

9.6.3 Matrici impregnate con 5-fluorouracile

La valutazione condotta su matrici caricate con 5-fluorouracile evidenzia elevate percentuali di principio attivo nel mezzo sottoposto ad analisi HPLC; nel giro di 24 ore il farmaco viene totalmente rilasciato nel caso delle matrici D3, D4 ed anche E3 (Tabella 9.7). La percentuale di rilascio tende rapidamente a crescere e, questa volta, non si osserva nessun salto nell'andamento del rilascio in corrispondenza della variazione di pH (Figure 9.14, 9.15). Questa

osservazione sperimentale è spiegabile pensando che nella fase di impregnazione il 5-fluorouracile, a causa della sua scarsa solubilità nel mezzo, non è capace di penetrare all'interno delle microsfeere e pertanto rimane confinato solo sulla loro superficie, ne consegue un rilascio immediato e non influenzato dalle interazioni con il sistema carrier. Dai dati riportati in tabella, è possibile, comunque, osservare che le matrici con grado di funzionalizzazione superiore, presentano una più bassa tendenza alla cessione del farmaco: E4 rilascia il 70% di 5-fluorouracile in 6 ore, mentre D3 raggiunge il 70% nell'arco di 15 minuti. È probabile che le matrici con DD% più elevato siano maggiormente reticolate e rilascino il farmaco con maggiore difficoltà.

pH	Tempo (h)	Carrier Polimerico			
		D3	D4	E3	E4
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	69,9	25,6	40,6	27,9
	0,25	70,0	81,2	70,6	57,6
	0,50	72,3	88,0	77,4	57,7
	1,00	75,1	88,1	80,9	58,0
	1,50	78,8	90,0	82,8	58,2
	2,00	88,5	90,1	83,5	58,4
	2,05	94,0	97,5	82,8	59,0
6,8	2,15	98,1	97,6	87,9	59,5
	2,50	98,2	97,7	88,0	60,0
	3,00	99,0	98,8	88,2	62,5
	6,00	99,9	99,0	87,3	65,9
	24,00	100,0	100,0	100,0	77,5

Tabella 9.6 – Profili di rilascio del β -propranololo dei campioni D3,D4,E3,E4.

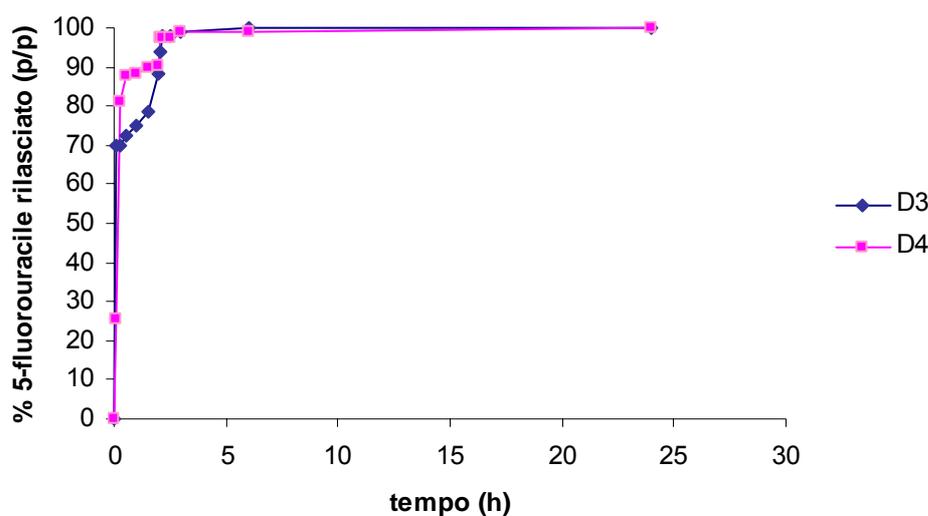


Figura 9.14 – Rilascio del 5-fluorouracile in funzione del tempo dei campioni D3,D4

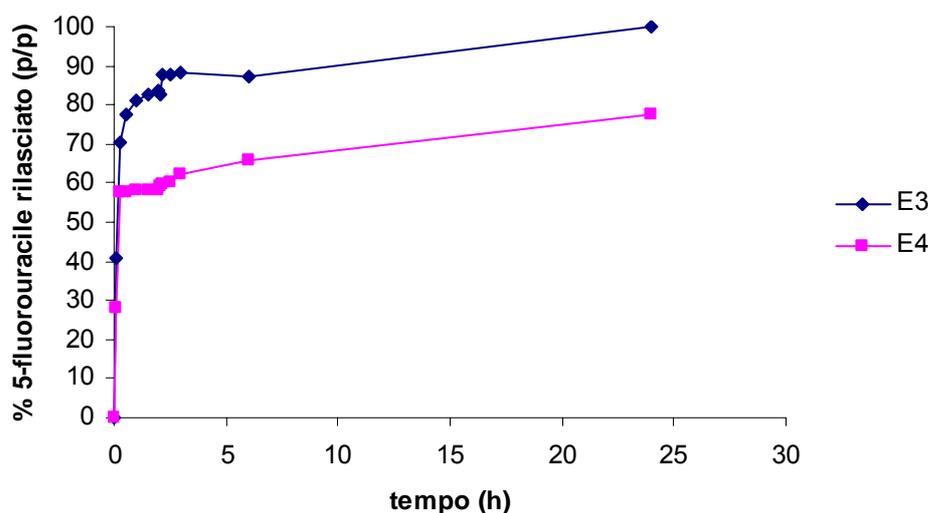


Figura 9.15 – Rilascio del 5-fluorouracile in funzione del tempo dei campioni E3,E4

9.7 Preparazione dei sistemi microparticellari BSA_f-NaM

Al fine di introdurre un comportamento pH-sensibile più marcato all'interno delle matrici polimeriche precedentemente descritte, si è pensato di sostituire la DMAA con un monomero acido, quale ad esempio acido acrilico o metacrilico. Tuttavia, la presenza di un acido organico nella miscela di polimerizzazione porterebbe alla denaturazione della BSA_f, con conseguente precipitazione della proteina. Per superare tale inconveniente, si è deciso di copolimerizzare la BSA_f con il metacrilato di sodio (NaM) che assicurando un pH

nella miscela di reazione leggermente basico preserva la solubilità dell'albumina. La BSA funzionalizzata al 63% e al 100% (Campioni E e D in tabella 9.1) è stata così copolimerizzata con NaM tramite copolimerizzazione in sospensione in fase inversa, descritta ampiamente nella prima parte del presente capitolo (tabella 9.8).

Fase acquosa dispersa		Fase organica continua	Matrice	
Reagenti (mg)	H ₂ O (ml)	CCl ₄ /Esano (ml/ml)	mg (conv.%)	Sigla
A (350) NaM (194)	2,5	17/23	430 (79,0)	AM1
A (450) NaM (40,0)	2,5	17/23	350 (71,4)	AM2
B (350) NaM (194)	2,5	17/23	370 (68,5)	BM1
B (450) NaM (40,0)	2,5	17/23	390 (79,6)	BM2

Tabella 9.8 – Sintesi dei sistemi polimerici BSA_f-NaM (il sistema iniziatore è costituito da persolfato d'ammonio 150 mg, TMEDA 150 µl- i tensioattivi sono SPAN85 100 µl e Tween85 µl)

L'ottimizzazione del metodo di preparazione ha richiesto tutta una serie di tentativi volti a trovare le condizioni, che permettessero di realizzare sistemi microparticellari di forma sferica. In particolare, è stato osservato che il valore di HLB dei tensioattivi risulta particolarmente importante. Utilizzando una miscela di Span 85 e Tween 85 che avessero un valore di HLB complessivo di 3,0, come nel caso dei copolimeri con DMAA, il risultato è stato piuttosto deludente, perché si sono ottenute particelle polimeriche di forma irregolare probabilmente a causa della scarsa stabilizzazione della fase acquosa in quella organica. Aumentando l'idrofilicità della miscela, attraverso una modifica del rapporto tra i tensioattivi, fino ad un valore finale di 4,8, è stata raggiunta una sufficiente stabilizzazione della fase dispersa e di conseguenza si sono sintetizzati sistemi polimerici aventi una forma perfettamente sferica. I sistemi AM1-2 e BM1-2 sono stati ampiamente caratterizzati tramite spettrofotometria FT-IR, determinazione dell'affinità verso mezzi acquosi, analisi di distribuzione dimensionale e analisi

morfologica.

9.8 Caratterizzazione delle microsfere BSA_f-NaM

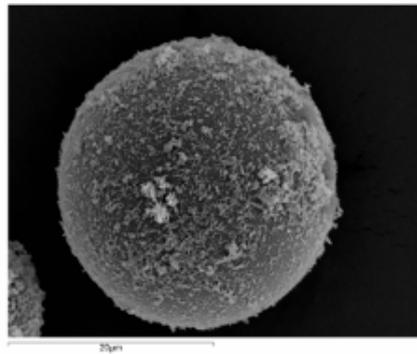
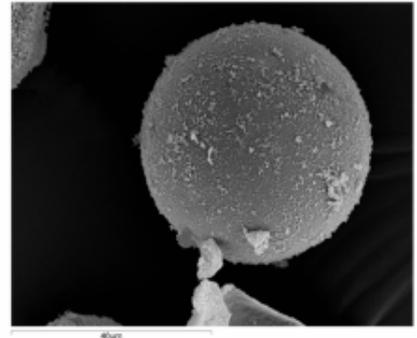
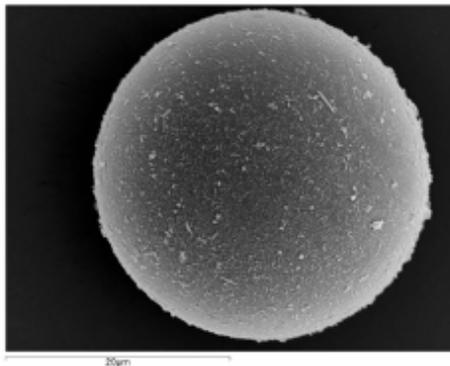
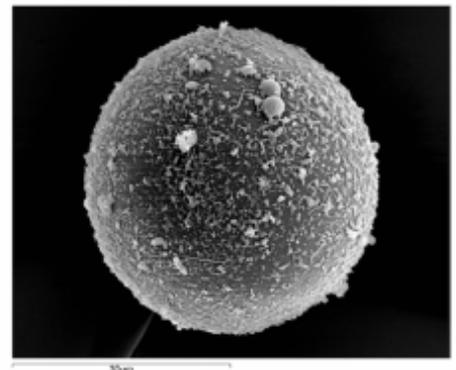
I campioni preparati sono stati caratterizzati tramite analisi FT-IR che ha confermato l'avvenuta reazione. In particolare, per tutti i campioni è stata notata la scomparsa delle bande a 1307 e 934 cm⁻¹ attribuibili ai gruppi metacrilici della BSA_f e a 944 e 921 cm⁻¹ imputabili al doppio legame C-C del metacrilato di sodio. Inoltre, a 617 cm⁻¹ è stata registrata in tutti gli spettri una tipica banda degli omopolimeri di BSA_f. L'applicabilità degli idrogel preparati, in campo biomedico e farmaceutico, particolarmente come sistemi per il rilascio modificato di farmaci, è stata verificata determinando la capacità di *swelling* dei sistemi sintetizzati in diversi mezzi simulanti i fluidi biologici. In particolare, pensando ad una veicolazione orale dei principi attivi è stata analizzata la capacità di rigonfiare a pH 1 (simulante il fluido gastrico) e a pH 6,8 simulante il fluido intestinale) e conducendo le misure alla temperatura corporea di 37°C. I dati sperimentali ottenuti sono riportati in tabella 9.9, dove viene anche calcolato il valore di R_s, già definito in precedenza, come il rapporto tra le percentuali di acqua assorbite a pH 6,8 e pH 1.

Resina	WR (%)		R _s
	pH =1	pH =6.8	
AM1	83	265	3,2
AM2	58	286	4,9
BM1	60	593	9,9
BM2	83	340	4,1

Tabella 9.9- Contenuto di acqua assorbito dai sistemi microsferici BSA_f-NaM

A differenza delle matrici polimeriche con DMAA, i materiali preparati mostrano una netta differenza di affinità verso il mezzo circostante a pH 1 e a pH 6,8, grazie alla presenza di una maggiore quantità di funzioni ionizzabili all'interno del reticolo polimerico. In questo caso si osservano valori di R_s compresi tra 3,2 per la resina AM1 e 9,9 per la resina BM1. La grande innovazione

di tali materiali risiede, dunque, nel fatto che la loro capacità di rigonfiamento è estremamente limitata a pH 1 dove le funzioni acide risultano protonate, mentre appena il pH è portato a 6,8 la deprotonazione dei gruppi carbossilici porta ad una forte repulsione elettrostatica tra le maglie del reticolo polimerico che rigonfiando permette all'acqua di diffondere al suo interno. L'analisi morfologica dei campioni preparati è stata effettuata tramite fotomicrografie a scansione elettronica (SEM), che hanno evidenziato la superficie porosa (figura 9.17) e la forma perfettamente sferica (figura 9.16: a-d).

**Campione AM1 (a)****Campione AM2 (b)****Campione BM1 (c)****Campione BM2 (d)****Figura 9.16**

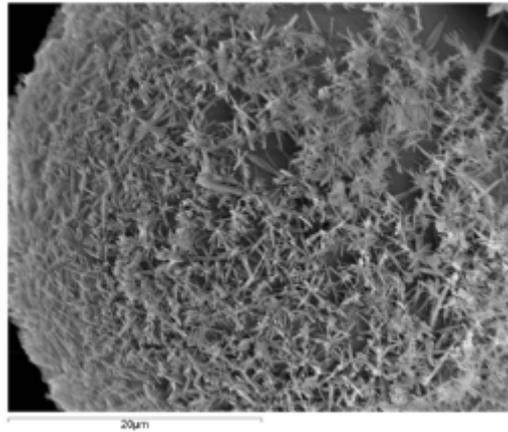
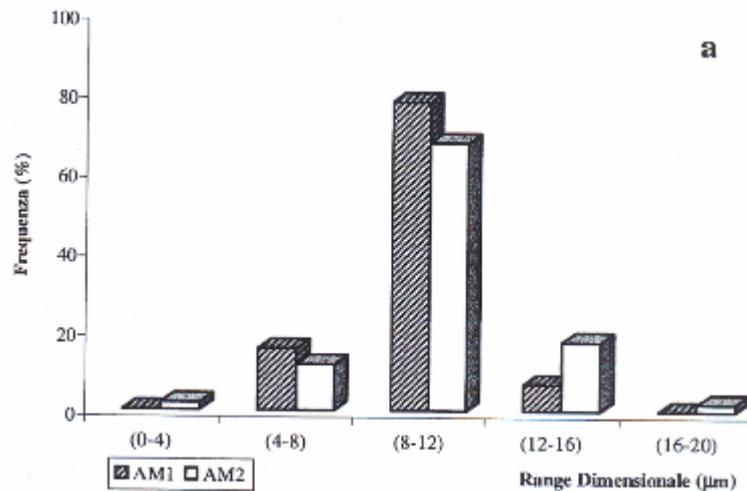


Figura 9.17

Tutte le matrici sono state caratterizzate mediante analisi dimensionale usando uno stereomicroscopio collegato ad un analizzatore di immagini. Questo processore di immagini calcola il diametro delle particelle convertendolo nel diametro di cerchio equivalente. Le distribuzioni dimensionali, di seguito riportate (Figure 9.18: a e b), sono rappresentate riportando la frequenza percentuale, in funzione delle dimensioni delle particelle.



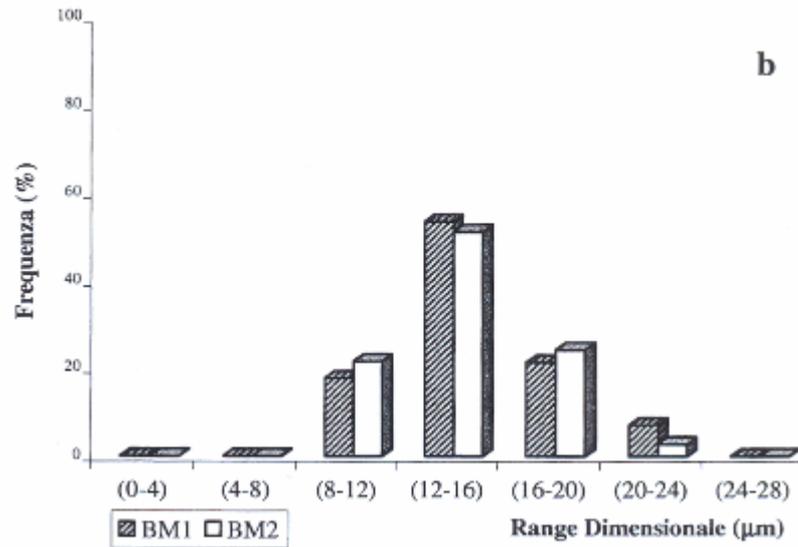


Figura 9.18 – Analisi dimensionale di AM1, AM2 (a); BM1, BM2 (b)

Nei nostri esperimenti è stato calcolato un diametro medio delle microsfele che è risultato essere circa 12 μm per i campioni AM1 e AM2 e circa 15 μm per i campioni BM1 e BM2.

9.9 Inserimento di farmaco per impregnazione e valutazione del rilascio

Le matrici polimeriche costituite da BSAf e NaM sono state caricate tramite impregnazione con diflunisal e β-propranololo, utilizzati come farmaci modello. Nella tecnica dell'impregnazione il farmaco è assorbito prevalentemente a livello della superficie della matrice e a seconda della sua natura chimica e di quella della matrice una certa percentuale di principio attivo può interagire anche con il nucleo delle microsfele. In particolare, nel caso specifico tutte le matrici polimeriche sintetizzate sono state poste in una soluzione a concentrazione nota di principio attivo e dopo 3 giorni a temperatura ambiente è stata valutata, tramite HPLC, la percentuale di principio attivo adsorbito (LE%), utilizzando l'equazione 9.3:

$$LE\% = M_i \cdot \frac{C_i - C_0}{C_i} \cdot 100 \quad (q. 9.3)$$

dove C_i è la concentrazione di farmaco nella soluzione prima del caricamento, C_0 è la concentrazione di farmaco nella soluzione dopo il caricamento e M_i è la massa di principio attivo disponibile. I dati riportati in Tabella 9.10 mostrano la percentuale di farmaco rispetto al totale presente nella miscela di impregnazione, caricato dalle diverse matrici:

Farmaco	Matrice Polimerica			
	AM1	AM2	BM1	BM2
Diflunisal	96,3	97,5	96,5	92,4
B-propranololo	67,4	43,0	59,1	47,0

Tabella 9.10 – Percentuale di farmaco impregnato nelle microparticelle BSA₇-NaM

I risultati riportati in tabella, sono molto interessanti in quanto mostrano chiaramente un diverso comportamento delle matrici polimeriche verso i principi attivi. Mentre il diflunisal, viene caricato quasi completamente da tutti i polimeri (percentuali di incorporazione superiori al 90%), il β -propranololo risulta poco affine ai sistemi macromolecolari preparati (percentuali di incorporazione inferiori al 70%). La disparità di tali risultati può essere spiegata, solo invocando una notevole differenza di affinità tra i due principi attivi e i sistemi proteici, che è ipotizzabile come diretta conseguenza della natura del farmaco: acido il diflunisal, basico il β -propranololo. La determinazione della dispersione dei farmaci all'interno dei sistemi microparticellari è stata effettuata tramite analisi ai raggi X. E' stato così determinato il pattern di diffrazione ai raggi X del farmaco puro, delle microsfele senza farmaco e delle stesse microsfele dopo processo di impregnazione. In particolare le figure 9.19 e 9.20 si riferiscono rispettivamente al diflunisal e al β -propranololo caricati sulla matrice AM1.

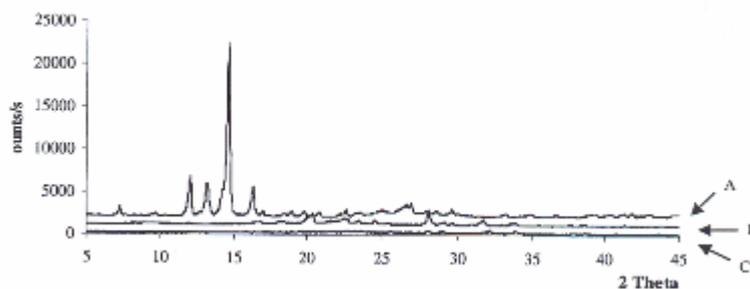


Figura 9.19

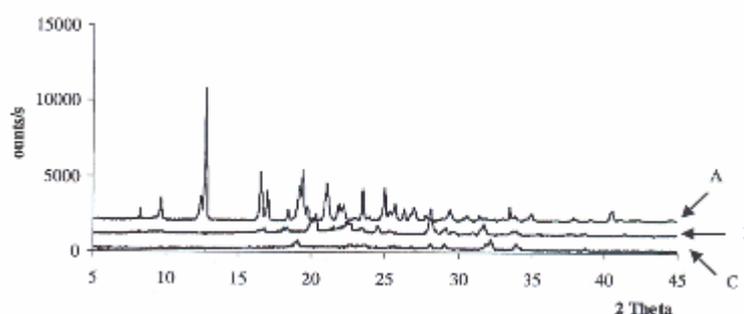


Figura 9.20

Dalle figure riportate, è evidente che, in entrambi i casi, il principio attivo puro si trova in uno stato cristallino (curva A), mentre sia la matrice non caricata (curva B) che quella caricata di farmaco (curva C) sono in uno stato amorfo. Le conseguenze di tali risultati sono veramente importanti. Le conclusioni che si possono trarre permettono di affermare, che durante la reazione di polimerizzazione/reticolazione non si ha la formazione di zone cristalline e che durante il processo di impregnazione il farmaco risulta chimicamente intrappolato nel reticolo polimerico, ad esempio in un stato fisico che lo rende facilmente disponibile per il processo di dissoluzione in un mezzo di rilascio. A conferma delle considerazioni fatte, è necessario riportare che analoghi risultati sono stati ottenuti per tutte le altre matrici polimeriche preparate.

9.9.1 Rilascio di diflunisal

Gli esperimenti eseguiti sui campioni impregnati con diflunisal hanno condotto a risultati interessanti (Tabella 9.11). Esprimendo il rilascio del principio

attivo come percentuale di farmaco (riferita alla quantità totale di agente terapeutico intrappolata) rilasciata in funzione del tempo, è stato osservato, per tutti i sistemi polimerici, un rilascio molto limitato a pH 1 ($p/p \% < 15\%$) e un rilascio maggiore a pH 6,8 ($p/p \% > 75\%$). Come spiegato, per i sistemi BSAf-DMAA, a pH acidi si instaurano forti interazioni tra il farmaco e la matrice polimerica, e interazione estremamente scarse tra il principio attivo e l'ambiente esterno. Tale comportamento viene ritrovato anche in questi nuovi sistemi, dove DMAA viene sostituita con NaM, in quanto direttamente imputabile alla presenza della proteina. Accanto a questa spiegazione, occorre anche ricordare la scarsa affinità del principio attivo per l'acqua a tale valore di pH, questo rende particolarmente difficile la diffusione del farmaco attraverso le maglie del reticolo polimerico. Innalzando il pH del mezzo di rilascio al valore di 6,8, gli equilibri in gioco si capovolgono. Il farmaco, che prima tendeva a stare all'interno della matrice polimerica, ora mostra una certa affinità per il mezzo circostante, e la sua diffusione attraverso il reticolo dell'idrogel viene, in questo caso, agevolata dal rigonfiamento dello stesso. Il passaggio dallo stato raggomitolato a quello rigonfiato può essere spiegato, come detto più volte in questa dissertazione, con l'istaurarsi di forze repulsive dovute in gran parte ai gruppi carbossilici ionizzati presenti nel reticolo polimerico. La presenza di una componente diffusiva importante viene confermata dal fatto che per tutti i sistemi macromolecolari preparati si osservano a pH 6,8 rilasci nettamente superiori agli analoghi sistemi con DMAA.

pH	Tempo (h)	Carrier Polimerico			
		AM1	AM2	BM1	BM2
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	8,90	5,00	3,00	5,20
	0,25	9,19	5,50	3,00	5,70
	1,00	9,84	5,60	3,90	4,80
	1,50	10,3	5,60	5,40	5,60
	2,00	15,0	5,90	5,80	6,40
	2,05	85,0	65,0	40,0	50,7
	2,15	89,0	65,0	68,0	51,6
6,8	2,50	90,0	65,0	70,0	60,0
	3,00	90,0	66,0	81,7	76,0
	6,00	90,0	67,3	88,1	76,1
	9,00	90,0	70,0	88,1	76,0
	24,00	100,0	79,1	88,1	76,3

Tabella 9.11 – Profili di rilascio del diflunisal dalle microparticelle BSA_f-NaM

La teoria proposta trova conferma nel fatto che, a parità di funzionalizzazione della BSA_f, i materiali realizzati con una maggiore quantità di proteina derivatizzata (AM2 e BM2) trattengono maggiormente il principio attivo poiché stabiliscono un più alto numero di interazioni farmaco-proteina. A parità di quantitativo proteico nelle microsfeere, a diventare importante è il grado di funzionalizzazione della BSA, che a pH 6,8 può facilitare la diffusione dell'agente terapeutico attraverso il reticolo polimerico. Dopo 24 ore riscontriamo un maggior rilascio dalla matrice AM1 rispetto ad AM2 (Figura 9.21) e di BM1 rispetto a BM2.

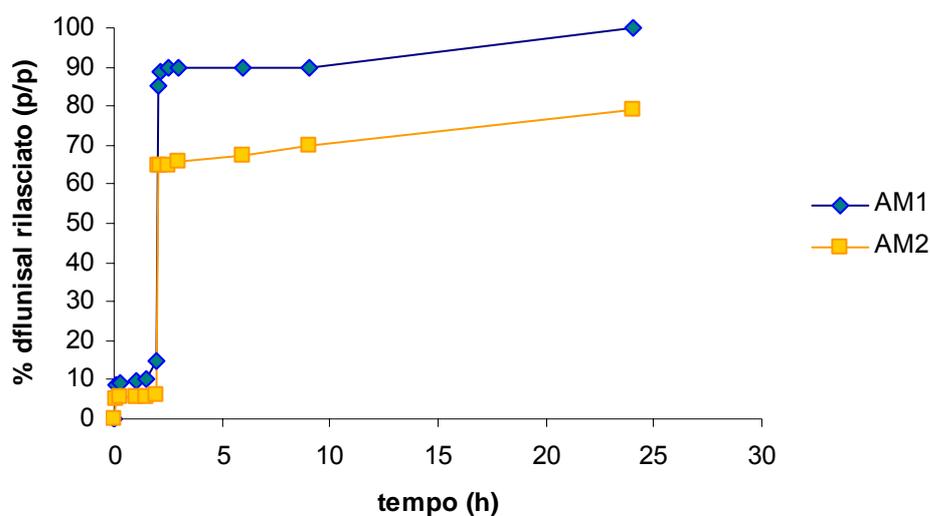


Figura 9.21 – Rilascio di diflunisal in funzione del tempo dei campioni AM1 e AM2

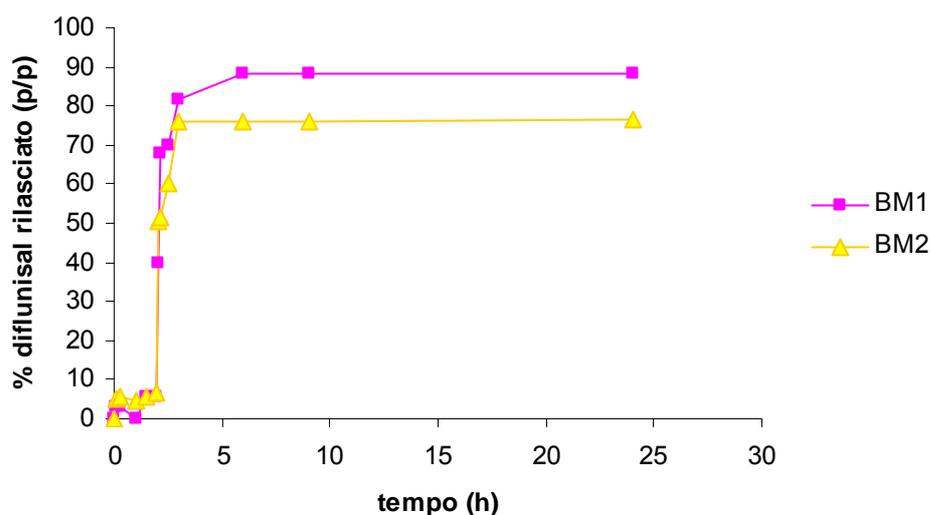


Figura 9.22 – Rilascio di diflunisal in funzione del tempo dei campioni BM1 e BM2

9.9.2 Rilascio di β -propranololo

Come si poteva ipotizzare dal valore delle percentuali di incorporazione, il β -propranololo presenta un profilo di rilascio completamente diverso rispetto al diflunisal (Figure 9.23 e 9.24). Quasi tutte le matrici contenenti β -propranololo arrivano, dopo le 24 ore, ad una percentuale di rilascio pari al 100% (Tabelle 9.12). In particolare, già a pH acido il rilascio si presenta quasi completo e questo può essere spiegato invocando la scarsa interazione farmaco-proteina, che non

permette in fase di impregnazione una diffusione in profondità del principio attivo attraverso le maglie della rete polimerica. La conseguenza di ciò sta nel fatto che il principio attivo viene rilasciato non appena le matrici impregnate si trovano in un ambiente di rilascio verso il quale il farmaco presenta una minima affinità. In questo caso il fattore predominante sull'andamento del rilascio è la natura basica del β -propranololo, in quanto costituisce la causa della debole interazione farmaco-proteina e della buona solubilità della molecola nell'ambiente esterno. Tali condizioni favoriscono il distacco del composto dalle microsfeere e rendono ininfluyente sia la quantità di BSA_f presente nel carrier, sia il grado di reticolazione della proteina.

pH	Tempo (h)	Carrier Polimerico			
		AM1	AM2	BM1	BM2
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	65,5	55,0	95,0	56,0
	0,50	65,6	60,0	100,0	58,0
	1,00	66,8	60,0	100,0	60,0
	1,50	70,2	62,2	100,0	83,0
	2,00	70,0	64,0	100,0	89,0
	2,05	100,0	100,0	100,0	100,0
	2,15	100,0	100,0	100,0	100,0
6,8	2,50	100,0	100,0	100,0	100,0
	3,00	100,0	100,0	100,0	100,0
	6,00	100,0	100,0	100,0	100,0
	9,00	100,0	100,0	100,0	100,0
	24,00	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabella 9.21 – Profili di rilascio del diflunisal dalle microparticelle BSA_f-NaM

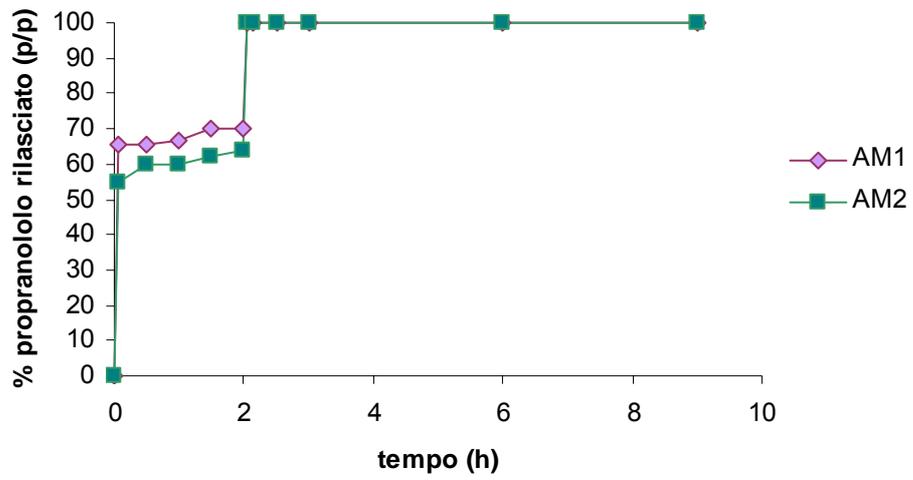


Figura 9.23 – Rilascio di propranololo in funzione del tempo dei campioni AM1 e AM2

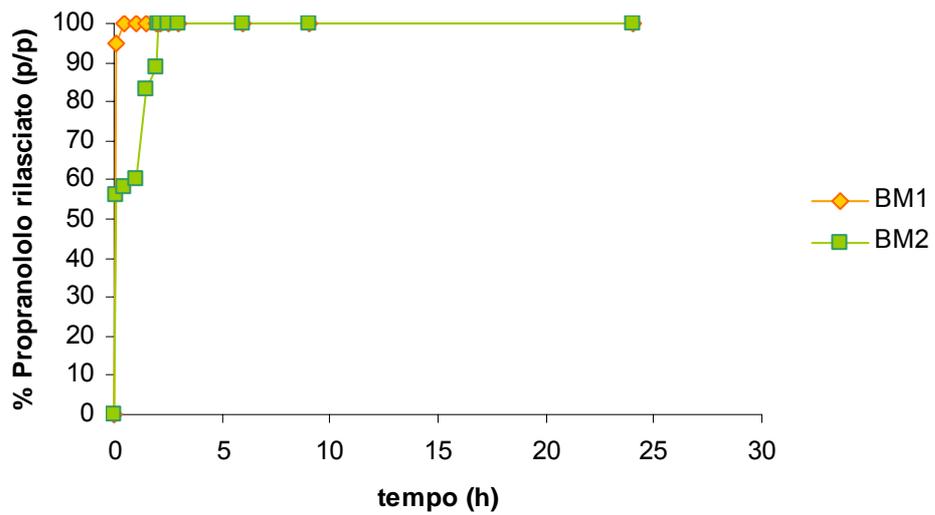


Figura 9.24 – Rilascio di propranololo in funzione del tempo dei campioni BM1 e BM2

CONCLUSIONI

Nel corso del triennio sono state seguite più linee di ricerca tutte basate sullo sviluppo di nuovi sistemi polimerici di sintesi e naturali per applicazioni in campo cosmetico e farmaceutico. In particolare nella prima parte del lavoro sono stati realizzati polimeri biocompatibili con attività antiossidante mediante due strategie di sintesi. Nella prima via sintetica si è ottenuto inizialmente, per copolimerizzazione radicalica, una struttura polimerica presentante gruppi amminici liberi in catena laterale; la reattività di tali gruppi è stata impiegata per l'inserimento successivo di due noti e potenti antiossidanti: acido lipoico e acido ferulico. Con la seconda via di sintesi si sono ottenuti invece inizialmente dei derivati polimerizzabili lipoilici e feruloilici ancora attivi, che sono stati successivamente copolimerizzati con DMAA per l'ottenimento di due nuovi polimeri antiossidanti. Come previsto polimeri simili ottenuti secondo le due vie hanno in realtà proprietà differenti come la solubilità nei vari solventi organici, motivabili con la differenza dei pesi molecolari. Nei polimeri ottenuti secondo la prima via è stato determinata la quantità di gruppi amminici non reagiti (moli di gruppi amminici per grammo di polimero) secondo il metodo Gaur-Gupta. Per i polimeri recanti in catena laterale residui di acido lipoico è stata valutata il grado di funzionalizzazione (moli di gruppi lipoilici /grammo di polimero) mediante la determinazione dei gruppi tiolici con il reattivo di Ellman dopo riduzione con DTT. Per i polimeri recanti in catena laterale residui feruloilici è stato determinato il grado di funzionalizzazione mediante determinazione dei gruppi fenolici secondo il metodo di Folin. In tutti i sistemi realizzati è stata valutata l'efficacia antiossidante con due diversi metodi. L'attività di bloccare direttamente specie radicaliche (attività *scavenger*) è stata valutata mediante analisi spettrofotometrica del decremento della concentrazione di un radicale cromoforo (DPPH); la capacità di inibire la perossidazione lipidica è stata valutata spettrofotometricamente seguendo la formazione della malondialdeide prodotta in membrane microsomiali

di fegato di ratto e indotta da un agente pro-ossidante (TBOOH). I risultati ottenuti con entrambi i test hanno evidenziato che i sistemi polimerici progettati e realizzati presentano una attività antiossidante dipendente dalla concentrazione del polimero impiegata e confrontabile a quella dell'acido lipoico e ferulico commerciali.

Nella seconda parte del lavoro di Dottorato di Ricerca, in collaborazione con gli autori che ne hanno depositato il brevetto, è stata valutata, dopo la sintesi, l'efficacia di un sistema polimerico non idrosolubile recante in catena laterale diversi gruppi reattivi: alcuni utili per il legame con altre molecole d'interesse cosmetico come coloranti, e altri gruppi capaci di reagire con le lisine cheratiniche dei capelli formando legami stabili. La validità del polimero è stata dimostrata attraverso l'analisi di scansione elettronica (SEM) mediante la quale si evince la sua capacità di rivestire la cuticola dei capelli. È stato valutato inoltre il grado di funzionalizzazione della cheratina secondo il metodo di determinazione dei gruppi amminici di Gaur-Gupta. Parallelamente si è cercato di realizzare sistemi polimerici con proprietà analoghe, ma idrosolubili e non ancora ottenuti. Un altro sviluppo futuro di questa linea di ricerca prevede la possibilità di formare legami disolfurici stabili e reversibili fra i polimeri con residui lipoilici già sintetizzati e la cheratina.

L'ultima linea di ricerca, e non meno importante, si è rivolta alla sintesi di sistemi polimerici per la veicolazione di farmaci. In particolare si sono ottenuti sistemi microparticellari utili nel rilascio controllato di principi attivi, con caratteristiche strutturali tali da impartire al materiale un comportamento dipendente dalle condizioni ambientali. Alcune proteine rappresentano, nel settore del rilascio modulato di farmaci, materiali estremamente interessanti per le necessarie proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità, e i dati di letteratura che riportano l'impiego di tali macromolecole sono molto incoraggianti in quanto lasciano prevedere le loro notevoli potenzialità applicative. Allo scopo di realizzare un sistema microsferico proteico pH-sensibile è stato inizialmente affrontato il problema di introdurre sulla proteina presa in esame, l'albumina serica bovina (BSA), dei gruppi funzionali che ne consentano la polimerizzazione radicalica. Il notevole lavoro svolto, appoggiato

da uno studio sistematico di reattività, ha consentito di individuare con chiarezza le condizioni utili per lo sfruttamento favorevole dell'acilazione dei gruppi amminici in catena laterale, appartenenti alle lisine, con anidride metacrilica, anche ai fini di produrre derivati variamente funzionalizzati. La reazione di acilazione è stata condotta in blande condizioni e non altera notevolmente la struttura e la funzionalità della proteina stessa. Impiegando diversi rapporti BSA/agente acilante sono stati preparati campioni di albumina con vari gradi di funzionalizzazione. La quantità molare di gruppi metacrilici per grammo di supporto è stata calcolata indirettamente mediante il metodo spettrofotometrico con il TNBS per la determinazione dei gruppi amminici liberi in sistemi proteici. Tutti i campioni di BSA funzionalizzata prodotti sono stati successivamente reticolati, in presenza di un comonomero, mediante la tecnica della polimerizzazione in sospensione inversa. Alla fine di un laborioso iter di tentativi eseguiti per raggiungere le appropriate condizioni sperimentali, si sono ottenuti idrogel microsferici a diversa composizione con caratteristiche molto interessanti per gli obiettivi prefissi. Sono stati, così, preparati sistemi le cui proprietà possono essere modulate al variare della composizione. La tecnica della polimerizzazione in sospensione inversa consente di realizzare materiali estremamente versatili. A seconda della natura del comonomero, acida, basica o ancora sensibile alla variazione di temperatura o a cambiamenti di campi elettrici e magnetici, si possono ottenere idrogel a struttura proteica che possono esibire un diverso comportamento di rilascio al variare delle condizioni esterne. La composizione monomerica iniziale di polimerizzazione risulta determinante per la produzione di sistemi microparticellari di forma sferica, i quali risultano ottimali nella veicolazione e nel rilascio di un agente terapeutico. Le prime microsfele sono state sintetizzate copolimerizzando la BSA funzionalizzata con la N,N-dimetilacrilammide (DMAA). Le proprietà dei materiali ottenuti, si sono rivelate incoraggianti e lasciano prevedere ottime prospettive di impiego nel rilascio sito-specifico di molecole con attività terapeutica. L'applicabilità di tali materiali come *Drug Delivery Systems* è stata valutata caricando le microsfele con diversi farmaci modello e analizzando il profilo di rilascio in mezzi simulanti i fluidi del tratto gastrointestinale. In

particolare, per questi materiali, il profilo di rilascio dei farmaci dipende principalmente dal grado di reticolazione dell'idrogel, dal rapporto BSA funzionalizzata/DMAA e dalle specifiche interazioni che si creano tra il principio attivo e la proteina naturale. Utilizzando come farmaci modello uno acido, il diflunisal, e uno basico, il β -propranololo di peso molecolare comparabile è possibile notare come l'interazione farmaco-proteina risulti particolarmente importante. Questo comportamento può essere spiegato con la nota tendenza della BSA ad interagire principalmente con farmaci di natura acida. Utilizzando un farmaco neutro, come il 5-fluoruracile, si è osservato un rilascio immediato pressoché totale e il ritardo registrato può essere attribuito esclusivamente a limitazioni diffusionali. Al fine di impartire alle matrici polimeriche un maggiore comportamento pH-sensibile si è pensato di sostituire la DMAA con il metacrilato di sodio (NaM) in modo da realizzare un polielettrolita fortemente anionico a pH superiori a 5. In tal modo, il sistema si presenta in una forma raggomitolata ai bassi valori di pH dello stomaco, dove si ha la protezione del farmaco dagli enzimi proteolitici, e in una forma rigonfiata ai valori di pH neutro dell'intestino dove si ha il rilascio del principio attivo che può così essere assorbito dalla parete intestinale e entrare nel torrente ematico. I sistemi realizzati sono stati testati in prove di rilascio *in vitro* utilizzando come farmaci modello diflunisal e β -propranololo. I risultati finali sono stati particolarmente interessanti. L'introduzione di un monomero acido nel reticolo polimerico ha portato alla realizzazione di un materiale in grado di rigonfiare notevolmente a pH neutro. La conseguenza è che la presenza di maglie più larghe contemporaneamente indebolisce l'interazione farmaco-proteina facilitando la diffusione del principio attivo tra le maglie del reticolo polimerico.

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchiature

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati elaborati mediante uno spettrometro Bruker VM-300 ACP. Gli spettri IR sono stati registrati su uno spettrofotometro Perkin Elmer FT-IR Paragon 1000 PC usando pasticche o lamine di KBr. Gli spettri di massa sono stati registrati mediante GC-MS 5890 Series II della Hewelett Packard. 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. L'analisi ai raggi X delle matrici impregnate è stata effettuata utilizzando un generatore PW 1729. I parametri sperimentali furono: radiazione CuK α ; tubo settato a 40 KV, 20 mA; velocità di angolo pari a 2° (2 θ /min); il range di angolo fu di $10\text{--}40^\circ$ (2 θ /min). 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 fu utilizzata una colonna C18 a fase inversa ($\mu\text{Bondapak 250x 4.6 mm}$, 10 μm di diametro interno, Waters).

Materiali

Acido lipoico, acido ferulico, cloruro di acriliole, cloruro di metacriliole, dicicloesilcarbodimmide (DCC), 1,4-D,L-ditiotreitolo (DTT), Acido-5-tio-2-nitrobenzoico (DTNB), Reattivo di Folin, 1-H Benzotriazolo, 1-idrossibenzotriazolo, N,N-dimetilamminoetilmetacrilato, N,N-dimetilacrilammide (DMAA), Vinil pirrolidone (VP), L-cisteina, trietilammina, radicale difenilpicrilidrazilico (DPPH), anidride Metacrilica, acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS), metacrilato di sodio, sorbitan trioleato (Span 85), poliossietilene sorbitan trioleato (Tween 85), N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TMEDA), persolfato d'ammonio, diflunisal, β -propranololo, 5-fluorouracile, acido fosforico, acido acetico, ammoniaca furono comprati dalla Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO).

Albumina Serica Bovina (BSA), Frazione V, Roche, liofilizzata, MM = 68000, pH = 7.0 ± 0.2 , purezza $\geq 98\%$.

Acetonitrile, etere etilico, etanolo, metanolo, tetraidrofurano (THF), N,N,-dimetilformammide (DMF), toluene, cloroformio, diclorometano, acetone, acqua furono acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

I PARTE

Sintesi del 2-amminoetilmetacrilato (**94**)

Acido cloridrico gassoso, ottenuto facendo gocciolare una soluzione di HCl 37% in acido solforico al 98% è fatto gorgogliare in un pallone contenente 2 ml di etanolamina (**110**) in 300 ml di etere etilico sotto agitazione magnetica fino alla formazione di etanolamina cloridrato (**111**), precipitato bianco. La reazione è fortemente esotermica ed immediata. La sospensione ottenuta è filtrata e il prodotto è purificato mediante ricristallizzazione in etanolo. Il prodotto è conservato in atmosfera inerte.

Etanolamina cloridrato (10 g, 103 mmoli), cloruro di metacrilato (**112**) (15,38 ml, 147,648 mmoli) e idrochinone (0,077g) sono stati miscelati in un pallone a tre colli munito di condensatore a ricadere. La miscela è poi riscaldata in un bagno ad olio sotto atmosfera d'azoto alla temperatura di 93-95°C. La miscela eterogenea del sale e del cloruro di metacrilato è agitata vigorosamente per 1 ora a questa temperatura. L'acido cloridrico sviluppato è rimosso per passaggio in soluzione alcalina. Si ottiene una soluzione viscosa giallo-marrone che è agitata per altre due ore ad una più bassa temperatura (70-75°C). Alla miscela, raffreddata a circa 40°C, è aggiunto THF (23 ml). Questa soluzione è poi addizionata lentamente a n-pentano freddo (100 ml) e il precipitato bianco cremoso formato è isolato per filtrazione, lavato bene con n-pentano e anidrificato a pressione ridotta. Il prodotto (**94**) è purificato per ricristallizzazione in acetonitrile. Resa 70%. (Il composto (**94**) è un prodotto commerciale e i risultati analitici sono conformi a quelli già noti in letteratura).

Sintesi del polimero P 2.1 (**113**)

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, vengono aggiunti 1g (60.4 mmol) di 2-amminoetilmetacrilato cloridrato (**94**), 1.197 g (120.8 mmol) di N,N-dimetilacrilamide (**96**), 10 ml di DMF dry e il 3 % (p/p) di AIBN (azoisobutirronitrile). Dopo completa omogeneizzazione, 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 fatta procedere sotto agitazione magnetica a 60°C per circa 24 ore. Al termine della reazione si ottiene un precipitato bianco che viene recuperato per filtrazione e lavato con etere etilico. Il prodotto **113** è purificato con cicli di dissoluzione/precipitazione nella coppia solvente/non-solvente H₂O distillata e acetone. Il polimero è infine trattato con una soluzione di NaOH (a pH = 9, 10), dializzato e successivamente liofilizzato. (Conversione 91%); (IR ν (cm⁻¹) 1800; 1650; 1400; 1000.m⁻¹).

Sintesi del polimero PL1 (115)

In un pallone a tre colli da 250 ml, munito di agitatore magnetico, condensatore a ricadere e imbuto gocciolatore, accuratamente fiammato e mantenuto sotto corrente di azoto, sono disciolti 413 mg (2 mmol) di DCC in 5 ml di CH₂Cl₂ anidro. La soluzione così ottenuta viene raffreddata a - 20 °C e successivamente addizionata di 309 mg (1.5 mmol) di acido lipoico (**20**), 500 mg (1.4 mmol) di P2.1, 270 mg (2 mmol) di HOBT, 202 mg (2 mmol) di NEt₃ disciolti in 10 ml di CH₂Cl₂ anidro. Il polimero ottenuto è insolubile nella maggior parte di solventi polari e apolari; la sua purificazione è ottenuta per filtrazione e lavaggi estensivi con etere etilico, CH₂Cl₂, metanolo, etanolo, acqua, acetone ed ancora etere etilico. Il polimero è seccato a pressione ridotta.

IR: ν (cm⁻¹): 2900; 1700; 1200; 1100; 700; 600;

Sintesi del polimero PF1 (116)

In un pallone a tre colli da 250 ml, munito di agitatore magnetico, condensatore a ricadere e imbuto gocciolatore, accuratamente fiammato e mantenuto sotto corrente di azoto vengono disciolti 413 mg (2 mmol) di DCC in 5 ml di CH₂Cl₂ anidro. Alla soluzione sono addizionati sotto agitazione 952 mg (3.4 mmol) di P 2.1_b, 330 mg (1.7 mmoli) di acido ferulico (**51**), 344 mg (2.55 mmol) di HOBT in 7 ml di CH₂Cl₂ anidro. La reazione è condotta a temperatura ambiente. Dopo 24 ore il prodotto **116** viene purificato con cicli di dissoluzione/precipitazione nella coppia solvente/non-solvente DMF e Et₂O. Il

polimero si presenta come polvere di colorazione giallo intenso. E' successivamente seccato a pressione ridotta. (conversione 67%);

IR: ν (cm^{-1}): 3100; 3000; 1600; 1300; 900.

Sintesi dell'anidride lipoica (103)

In un pallone a due colli acido lipoico (**31**) (1 g, 4.854 mmoli) è agitato con 500 mg di dicicloesilcarbodimmide (DCC, 2,425 mmoli) in 40 ml di CH_2Cl_2 anidro sotto azoto per 24 h. La miscela di reazione diventa gialla e la formazione di anidride lipoica è seguita per analisi cromatografica su TLC usando come miscela eluente CHCl_3 : CH_3OH – 9:1 (R_f anidride lipoica = 0.81; R_f Acido lipoico 0.62). Dopo filtrazione il solvente è allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto è un solido giallo.

Sintesi del cloruro lipoilico (105)

In un pallone a tre colli, munito di condensatore a ricadere si discioglie 1 g di acido lipoico (**31**) (4.854 mmoli) in 20 ml di CHCl_3 in atmosfera d'azoto. Alla soluzione sono aggiunti, sotto agitazione magnetica, 354 μl di SOCl_2 e una quantità catalitica di DMF. La miscela è agitata alla temperatura di refluxo per 5 h. A fine reazione il solvente è allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto è una polvere marrone, che si altera facilmente a contatto con l'aria. È conservato in ambiente anidro.

Sintesi del 2-N-lipoil-amminoetilmetacrilato (108)

In un pallone a tre colli da 250 ml, munito di agitatore magnetico, condensatore a ricadere e imbuto gocciolatore, accuratamente fiammato e mantenuto sotto corrente di azoto, sono disciolti 721 mg (3,5 mmol) di DCC in 5 ml di CH_2Cl_2 anidro. La soluzione così ottenuta è raffreddata a -20°C e addizionata di 1g (6,04 mmol) di AEM (**94**), 622 mg (3,02 mmol) di acido lipoico (**31**), 504 mg (4mmol) di 1-idrossibenzotriazolo (HOBT) disciolti in 15 ml di CH_2Cl_2 anidro. A fine reazione il solvente è allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è successivamente ripreso con 50 ml di

acetato di etile. La fase organica viene estratta per tre volte con 1/3 di ciascuna delle seguenti soluzioni:

- 50 ml di una soluzione acquosa 1 N di HCl (37%)
- 50 ml di una soluzione acquosa al 5% (p/v) di NaHCO₃
- 50 ml di una soluzione satura di NaCl

La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ anidro per due ore e successivamente filtrata. Il prodotto è recuperato per allontanamento del solvente a pressione ridotta. (resa 87%); GC/MS: M⁺317 (45%); 281 (25%); 231 (35%); 207 (50%); 166 (37%); 130 (22%). IR: ν (cm⁻¹): 3300; 2900; 1700; 1150; 700. ¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 6.043 (1H; =CH₂; d; J_{gem}=0.6 Hz); 5.524 (1H; =CH₂; d; J_{gem}=0.6 Hz); 4.162 (2H; OCH₂; t; J=5.4 Hz); 3.474 (2H; NHCH₂; m); 3.075 (S-CH-CH₂-CH-S; m) 2.374 (1H; CH-S;m) 2.114 (2H;CH₂-S; t;J= 7.5 Hz) 1.924 (2H; CH₂-C=O-NH; t; J=3.6 Hz) 1.583 (2H;CH₂ ; m).

(La stessa reazione è stata condotta in DMF anidra con rese inferiori: 44%)

Sintesi dell'anidride ferulica (104)

In un pallone a due colli acido ferulico (941,6 mg, 4.854 mmoli) è agitato con 500 mg di dicicloesilcarbodimmide (DCC, 2,425 mmoli) in 40 ml di CH₂Cl₂ anidro sotto azoto per 24 h. A fine reazione la dicicloesilurea formatasi è allontanata per filtrazione. Il prodotto solido giallo è ottenuto per allontanamento del solvente per evaporazione a pressione ridotta.

Sintesi del cloruro feruloilico (106)

I. Protezione dell'OH fenolico

In atmosfera d'azoto in un pallone a due colli si aggiungono 10 g di acido ferulico a 50 ml di una soluzione alcalina (NaOH 2,6 M). la soluzione è raffreddata ad una temperatura inferiore a 10°C. A questa temperatura si aggiungono 6,04 ml di anidride acetica. La soluzione è poi portata alla temperatura di 20°C per 10 minuti e successivamente a temperatura ambiente per 10 minuti. Il prodotto è recuperato per precipitazione dall'ambiente di reazione per successiva aggiunta di una soluzione di acido solforico diluito (<10 %) fino al raggiungimento di pH 4-5. Si ottiene un precipitato bianco, che è successivamente isolato per filtrazione e

lavaggi con acqua distillata. Il prodotto ottenuto è infine purificato per ricristallizzazione in etanolo. L'acido p-acetil ferulico è un solido granulare bianco. (resa 77%) $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 12.45 (s 1 H); 7.61 (d 1H, $J=15.6$ Hz); 7,12-7,49 (m, 3 H); 6,61 (d, 1H, $J=15,6$ Hz); 3.84 (s, 3H); 2.28 (s, 3H); GC/MS: M^+ 347 (23%); 327 (7%); 305 (80%); 281 (5%); 260 (4%); 236 (11%), 218 (23%); 205 (7%); 192 (19%);177 (100%); 145 (52%); 130 (8%), 117 (32%), 89 (12%).

II. Sintesi del cloruro feruloilico

In un pallone a tre colli munito di condensatore a ricadere, sotto atmosfera d'azoto, si sospende acido p-acetilferulico (2,36 g, 0,01 mol) in 10 ml di CHCl_3 addizionato di una quantità catalitica di DMF. Alla sospensione è aggiunto SOCl_2 (0,85 ml, 0,012 moli). La miscela è agitata per 5 ore alla temperatura di refluxo. A fine reazione il solvente è allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Si ottiene un prodotto solido sottoforma di cristalli gialli (resa 93 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 7.79 (d, 1H, $J=15.6$ Hz); 7.09-7-12 (m, 3H); 6.59 (d, 1H, $J=15,2$ Hz), 3.88 (s, 3H); 2.35 (s, 3H); GC/MS

III. Sintesi del 2-N-feruloilamminoetilmetacrilato

Il materiale ottenuto è utilizzato senza ulteriore purificazione per la sintesi del composto 109. In un pallone a tre colli, munito di condensatore a ricadere, sono fatti reagire in 10 ml di CH_2Cl_2 e 10 ml di Trietilammina anidri 1 g (4,2 mmoli) di **106** e 684,6 mg (4,2 mmoli) di N-amminoetilmetacrilato cloridrato (**94**) sotto agitazione, per 24 h a temperatura ambiente. A fine reazione il solvente è allontanato per evaporazione a pressione ridotta. . Il grezzo di reazione è successivamente ripreso con 50 ml di acetato di etile. La fase organica viene estratta per tre volte con 1/3 di ciascuna delle seguenti soluzioni:

- 50 ml di una soluzione acquosa satura di KHSO_4
- 50 ml di una soluzione acquosa satura di NaHCO_3
- 50 ml di una soluzione satura di NaCl

La fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 anidro per due ore e successivamente filtrata. Il prodotto è recuperato per allontanamento del solvente a pressione ridotta. (resa 75%);

Sintesi del 2-N-feruloil-amminoetilmetacrilato (109)

In un pallone a tre colli da 100 ml munito di agitatore magnetico e imbuto gocciolatore, accuratamente fiammato e mantenuto sotto corrente di azoto, vengono disciolti 1,26 g (6,1 mmol) di DCC in 5 ml di CH₂Cl₂ anidra. La soluzione così ottenuta viene raffreddata a - 20 °C e successivamente addizionata di 1g (mmol) di AEM, 1,07g (5,5 mmol) di acido ferulico (**33**), 824 mg (6,1 mmol) di HOBT, 656 mg (6,5 mmol) di NEt₃ disciolti in 15 ml di CH₂Cl₂ anidra. Il precipitato bianco formatosi (HCl-NEt₃) è successivamente allontanato per filtrazione. Il grezzo di reazione, seccato a pressione ridotta, è successivamente purificato mediante cromatografia su colonna (eluente CHCl₃/CH₃OH: 9/1). (resa 83%); GC/MS: M⁺ 305 (36%); 218 (17%); 177 (100%); 145 (32%); 117 (12%); IR: ν (cm⁻¹): 3100; 1600; 1300; 900.¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7.465 (1 H;CH=CH;d;J= 15.3 Hz); 6.849 (3H; m; benzene), 6.184 (1H; CH=CH; d; J=15.3 Hz); 6.045 (1H; =CH₂; d; J_{gem}=0.6 Hz); 5.523 (1H; =CH₂; d; J_{gem}=0.6 Hz); 4.164 (2H; OCH₂; t; J=5.4 Hz); 3.843 (3H; OCH₃;S); 3.477 (2H; NH- CH₂; m).

Sintesi del polimero PL2 (123)

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, vengono aggiunti 864,4 mg (2,73 mmol) del 2-N-lipoil-amminoetilmetacrilato (**79**), 540,6 mg (5,45 mmol) di DMAA in 4 ml di DMF anidra e il 3% (p/p) di AIBN. Dopo completa omogenizzazione, la soluzione viene sifonata in un pallone monocollo preventivamente fiammato in corrente di azoto, munito di tappo a vite con setto in silicone e agitatore magnetico. La polimerizzazione è condotta sotto agitazione alla temperatura di 60°C. A fine reazione la soluzione ha una colorazione dal giallo intenso al marroncino. Il polimero formatosi solubile in DMF è recuperato per precipitazione in Et₂O. Il precipitato ottenuto è filtrato e seccato a pressione ridotta a temperatura ambiente. (conversione 49%); IR: ν (cm⁻¹): 2900; 1700; 1600; 1200; 1100; 700.

Sintesi del polimero PF2 (124)

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, vengono aggiunti 134 mg (0,439 mmol) del 2-N-feruloil-amminoetilmetacrilato (**109**), 173 mg (1.75 mmol) di DMAA (**96**), in 2 ml di DMF anidra e 3% (p/p) di AIBN 15 mg.. Dopo completa omogeneizzazione, la soluzione viene sifonata in un pallone monocollo preventivamente fiammato in corrente di azoto, munito di tappo a vite con setto in silicone e agitatore magnetico. La polimerizzazione è condotta sotto agitazione alla temperatura di 60°C. Dopo 24 h la soluzione passa allo stato di gel. A fine reazione la soluzione è addizionata di 1,5 ml di DMF; successivamente il prodotto è recuperato per precipitazione in 300 ml di Et₂O, filtrato e seccato a pressione ridotta a temperatura ambiente. (conversione 38.5%); IR:ν (cm⁻¹):3100; 1600; 1300; 900.

Determinazione dell'attività antiossidante

Inibizione della perossidazione lipidica

I. Sospensione microsomiale

I microsomi di fegato sono stati preparati da ratti Wistar omogeneizzando il tessuto con 5 volumi di una soluzione fredda di saccarosio 0,25 M contenente HEPES 5 mM, EDTA a 0,5 mM a pH 7.5 in un omogeneizzatore 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 HCl a 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 di acido lipoico, ferulico, e rispettivi polimeri ai microsomi

I microsomi sono stati sospesi in un tampone fosfato 0,1 M a pH 7.5. Aliquote di soluzioni stock di acido lipoico, acido ferulico e copolimeri sono state addizionate rapidamente al sistema per ottenere concentrazioni finali note di antiossidante. Ai microsomi di controllo è stata invece somministrata una stessa quantità di acqua distillata. A tutti i microsomi sono state aggiunte quantità di TBOOH per

raggiungere la concentrazione finale di 250 μ M. Le sospensioni sono state incubate in un bagno a 37° C, sotto agitazione, all'aria e al buio.

III. Formazione di Malondialdeide (MDA)

Aliquote di 1 ml di sospensione microsomiale (0.5 mg di proteine), prelevate agli intervalli di tempo prestabiliti, sono state aggiunte ad una soluzione costituita da 3 ml di acido tricloroacetico (TCA) 0,5%, 0,5 ml di una soluzione di acido tiobarbiturico (TBA) (2 parti di TBA 0,4% in HCl 0,2 M e una parte di acqua distillata) e 0,07 ml di idrossitoluenebutilato (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.

DPPH Test

I. Preparazione della soluzione madre di DPPH

In un matraccio da 1 litro si prepara una soluzione del radicale 1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH) $2 \cdot 10^{-4}$, disciogliendo 74 mg del DPPH in MeOH o EtOH a seconda della solubilità dei due campioni standard, acido ferulico e lipoico.

II. Preparazione dei campioni di riferimento da analizzare

Acido lipoico

In un matraccio da 100 ml si sciolgono 824 mg di acido lipoico in EtOH in modo da ottenere una concentrazione finale di $4 \cdot 10^{-2}$ M. Con una buretta di precisione si prelevano rispettivamente 6.250, 3, 1.5, 1 e 0.5 ml della soluzione madre di acido lipoico e si trasferiscono in matracci da 25 ml in modo da ottenere concentrazioni finali rispettivamente di $1 \cdot 10^{-2}$ M, $0.48 \cdot 10^{-2}$ M, $0.24 \cdot 10^{-2}$ M, $0.16 \cdot 10^{-2}$ M e $0.08 \cdot 10^{-2}$ M. Si aggiungono, in ogni matraccio, 10 ml della soluzione di DPPH e si porta a volume con EtOH puro. La concentrazione finale di DPPH è pari a $8 \cdot 10^{-5}$ M. Le soluzioni ottenute vengono analizzate mediante spettrofotometro UV dopo aver mantenuto i campioni al buio a temperatura ambiente per 30 min ($\lambda = 517$ nm).

Acido ferulico

In un matraccio da 100 ml si introducono mediante una buretta di precisione 5 ml di una soluzione di acido ferulico $2 \cdot 10^{-2}$ M, preparata sciogliendo 388,4 mg in

100 ml di MeOH. Si prelevano rispettivamente 10.5, 6, 3, 1.5 e 0.5 ml di tale soluzione, e si trasferiscono in matracci da 25 ml in modo da ottenere concentrazioni finali rispettivamente di $4.2 \cdot 10^{-8}$, $2.4 \cdot 10^{-8}$, $1.2 \cdot 10^{-8}$, $0.6 \cdot 10^{-8}$ e $0.2 \cdot 10^{-8}$ M. In ogni matraccio, si aggiungono 10 ml della soluzione madre di DPPH, in modo da ottenere una soluzione finale $8 \cdot 10^{-5}$ M; si porta a volume con MeOH puro. Le soluzioni ottenute vengono analizzate mediante spettrofotometro UV dopo aver mantenuto i campioni al buio a temperatura ambiente per 30 minuti ($\lambda = 517$).

Polimeri PL1 - PF1 - PL2 - PF2

Per ogni polimero sintetizzato si preparano 5 campioni pesando accuratamente in matracci le quantità riportate in tabella 3 in appendice. Ai matracci è aggiunto un volume della stessa soluzione di DPPH utilizzata come controllo e un volume di alcol per ottenere una soluzione di DPPH alla concentrazione finale di $8 \cdot 10^{-5}$ M dopo l'aggiunta della soluzione del radicale picridazilico i campioni sono mantenuti al buio a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente viene effettuata analisi allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm.

Determinazione dei gruppi amminici secondo il metodo di Gaur Gupta

I. Funzionalizzazione con SDTB

In un palloncino vengono posti alcuni mg del materiale da analizzare (P2.1, PL1), alcuni μ l di Reattivo A (N-succinimidil-4-O-(4,4'-dimetossitifenil)butirrato in N,N-Dimetilformammide anidra), alcuni μ l di Et₃N anidra ed una quantità catalitica di 4-dimetilamminopiridina (le quantità impiegate sono riportate in tabella 1 in appendice). La miscela così ottenuta viene lasciata sotto agitazione per 2 h a temperatura ambiente. A fine reazione la fase solida è separata per filtrazione e lavata in successione con i seguenti solventi: N,N-dimetilformammide anidra, metanolo anidro, etere etilico anidro; quindi seccata per evaporazione del solvente a pressione ridotta per 4 h (0,05 torr, temperatura ambiente) e accuratamente pesata.

II. Rimozione del gruppo 4,4'-dimetossitifenilmetilico

Un campione (1-10 mg) del solido, ottenuto secondo la I fase, è accuratamente pesato in un matraccio da 10 ml e portato a volume con una miscela detritilante (reattivo B) composta del 52,7% di HClO₄ al 70% e dal 47,3 % di MeOH.

La reazione di detritilazione viene lasciata progredire a temperatura ambiente; un volume esatto di tale soluzione, una volta filtrata dal solido, è prelevato e trasferito in una celletta di quarzo (1cm) per la registrazione dello spettro visibile usando la stessa miscela detritilante come riferimento. I valori di assorbanza A al massimo di assorbimento $\lambda = 498$ nm, trattati secondo Gaur Gupta forniscono le quantità di gruppi amminici liberi presenti nel solido espresse come mol/ gr di supporto.

Determinazione dei fenoli secondo il metodo di Folin

I. Preparazione della retta di taratura

In un matraccio da 100 ml si sciolgono 388,4 mg di acido ferulico (2 mmoli) in MeOH in modo da ottenere una concentrazione finale di $2 \cdot 10^{-2}$ M. Si prelevano 5 ml della soluzione ottenuta e si trasferiscono in un matraccio da 100 ml e si porta a volume per ottenere una concentrazione finale di $1 \cdot 10^{-3}$ M. Con una microsiringa si prelevano rispettivamente 1.25, 1, 0.750, 0.50 e 0.25 ml della soluzione di acido ferulico e si trasferiscono in matracci da 25 ml in modo da ottenere concentrazioni finali di $5 \cdot 10^{-5}$ M, $4 \cdot 10^{-5}$ M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, $2 \cdot 10^{-5}$ M e $1 \cdot 10^{-5}$ M. In ogni matraccio si aggiungono rispettivamente 0.25, 0.5, 0.750, 1 e 1.25 ml di MeOH, 3 ml di una soluzione satura di carbonato di sodio e 1,5 ml del reattivo di Folin. Dopo 48 ore circa le soluzioni ottenute sono limpide e di colore variabile dal blu intenso all'azzurro. Si analizzano le soluzioni con uno spettrofotometro UV ($\lambda = 725$ nm). Dai valori ottenuti si ottiene una retta di taratura con equazione lineare: $Abs = 15186 \text{ Molarità}$ ($R^2 = 0,9916$)

II. Ossidazione dei gruppi fenolici dei polimeri PF1 e PF2 con il reattivo di Folin

Cinque campioni rispettivamente di PF1 e PF2 sono preparati pesando accuratamente in matracci le quantità crescenti dei polimeri riportate nella tabella 2 in appendice. A tali campioni sono addizionati volumi calcolati di metanolo e di una soluzione acquosa satura di NaCO₃ e di reattivo di Folin. Le soluzioni portate

a volume sono mantenute al buio a temperatura ambiente per 48 h. Successivamente un'aliquota delle soluzioni preparate (soluzioni A) è prelevata e trasferita in cuvette; dopo l'aggiunta di acqua distillata fino al volume di 1,5 ml (soluzione B) i campioni sono stati analizzati mediante uno spettrofotometro UV ($\lambda = 725 \text{ nm}$) (tabella 2 in appendice). Dalla retta di taratura dello standard e dalle assorbanze dei campioni ottenute è possibile risalire alla concentrazione di gruppi fenolici di ciascun campione.

Determinazione dei tioli con il reattivo di Ellman

I. Determinazione dei tioli dello standard L-Cisteina

In un matraccio da 100 ml si sciolgono 121.16 mg di L-cisteina (1 mmoli) in tampone fosfato 1 M a pH 8. Si prelevano 30,50,80,100 e 150 μl della soluzione ottenuta per trasferirli in un matraccio da 25 ml. Dopo aver addizionato 1000 μl di reattivo di Ellman si porta a volume con ulteriore soluzione tampone, per ottenere le concentrazioni finali indicate nella tabella 3 in appendice. Il reattivo di Ellman è una soluzione metanolica 0,02 M di DTNB, preparata dissolvendo 396 mg di DTNB (1 mmole) in 50 ml di metanolo. Dopo 3 ore le soluzioni ottenute sono limpide e di colore giallo di varia intensità. Si analizzano le soluzioni con uno spettrofotometro UV ($\lambda = 412 \text{ nm}$). I valori ottenuti sono indicati nella tabella 3 in appendice. Dai valori ottenuti si ottiene una retta di taratura con equazione lineare: $\text{Abs} = 12920 \text{ Molarità}$ ($R^2 = 0,9989$)

II. Riduzione dei ponti disolfuro dei polimeri PL1 e PL2 con il reattivo di Cleland

Si prepara una soluzione 0,1 M di DTT (reattivo di Cleland) in soluzione, dissolvendo 386 mg di DTT (2.5 mmoli) in 25 ml di acquosa di tampone fosfato 1 M a pH 7. In provetta da centrifuga sono pesati circa 100 mg del polimero da analizzare, a cui sono aggiunti 2 ml di DTT 0,1 M e ulteriori 4 ml di soluzione di tampone fosfato 1 M a pH 7. Si lascia reagire per tre ore alla temperatura di 40°C. A fine reazione si effettuano lavaggi esaustivi fino alla completa rimozione del DTT attraverso cicli di centrifugazione, allontanamento del surnatante e ricostituzione della sospensione con acqua bidistillata fresca. Gli ultimi lavaggi si

effettuano con acetone ed etere etilico. I polimeri sono seccati bene per evaporazione del solvente a pressione ridotta per 5 ore.

III. Ossidazione dei tioli con il reattivo di Ellman.

Tre campioni rispettivamente di PL1 e PL2 (tabella 3 in appendice) sono accuratamente pesati in matracci da 25 ml. Ai polimeri sono addizionati 1000 μ l di reattivo di Ellman (DTNB 0,02M in MeOH) prima di portare a volume con soluzione di tampone fosfato 1 M a pH 8. Dopo tre ore le soluzioni sono analizzate allo spettrofotometro UV alla lunghezza d'onda di 412 nm.

Dalla retta di taratura dello standard e dalle assorbanze dei campioni ottenute è possibile risalire alla concentrazione di gruppi tiolici di ciascun campione. I residui lipoilici su ciascun polimero corrispondono esattamente alla metà dei valori calcolati.

II PARTE

Sintesi dell'N-acriloil benzotriazolo

In un pallone a tre colli munito di condensatore a ricadere ed imbuto gocciolatore, precedentemente fiammato in corrente d'azoto, si introducono 1,19 ml (14,7 mmoli) di cloruro di acrilioile e 10 ml di toluene anidro. La miscela di reazione è mantenuta alla temperatura di 0°C mediante un bagno acqua/ghiaccio e successivamente addizionata in 40 minuti di una miscela costituita da 1,75 g (14,7 mmoli) di benzotriazolo e 1,49 g (14,7 mmoli) di trietilammina in 25 ml di toluene anidro. La reazione è condotta sotto agitazione magnetica per 20 ore. A fine reazione il cloridrato di trietilammina è allontanato per filtrazione. Successivamente si effettuano delle estrazioni con acqua, acqua satura di cloruro sodico e di nuovo acqua. Le fasi organiche riunite sono seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto di reazione è ottenuto per allontanamento del solvente a pressione ridotta dopo aggiunta di inibitore delle polimerizzazioni radicaliche.. L'acriloil 1-benzotriazolo è purificato per cromatografia su gel di silice con miscela eluente CHCl_3 /Esano in rapporto 7/3 (vv). Il prodotto è un solido sottoforma di cristalli bianchi. (resa 82%).

Sintesi del polimero BZP1

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, sono addizionati 200 mg (1,156 mmoli) di 1-acriloilbenzotriazolo e 176 mg (1,156 mmoli) di p-metichlorostirene, 4 mg di AIBN e 3 ml di DMF anidra. Il p-clorometilstirene è precedentemente purificato per cromatografia su gel di silice usando esano come eluente. Dopo completa omogeneizzazione, 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 procede sotto agitazione magnetica a 60°C. Dopo 24 ore il polimero ottenuto è purificato mediante cicli di dissoluzione/precipitazione nella coppia solvente-non solvente DMF/etere etilico. Il prodotto è una fine polvere di colore giallo. (conversione 83%)

Sintesi del polimero BZP2 (143)

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, sono addizionati 200 mg (1,156 mmoli) di 1-acriloilbenzotriazolo e 181 mg (1,156 mmoli) di N,N-dimetilamminoetilmetacrilato, 11 mg di AIBN e 3 ml di DMF anidra. Dopo completa omogeneizzazione, 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 procede sotto agitazione magnetica a 60°C. Dopo 24 ore il polimero ottenuto è purificato mediante cicli di dissoluzione/precipitazione nella coppia solvente-non solvente DMF/etere etilico. Il prodotto è una polvere di colore bianco. (conversione 77%)

Sintesi del polimero BZP3 (144)

In una fiala codata da 25 ml, provvista di tappo a vite con setto in silicone, fiammata in corrente di azoto, sono addizionati 200 mg (1,156 mmoli) di 1-acriloilbenzotriazolo e 114 mg (1,156 mmoli) di DMAA, 9 mg di AIBN e 3 ml di DMF anidra. Dopo completa omogeneizzazione, 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

procede sotto agitazione magnetica a 60°C. Dopo 24 ore il polimero ottenuto è purificato mediante cicli di dissoluzione/precipitazione nella coppia solvente-non solvente DMF/etere etilico. Il prodotto è una fine polvere di colore bianco. (conversione 72%)

Reazione polimero BZP1 - Cheratina

In una beuta sono disciolti 150 mg del polimero 140 in 25 ml di DMF. Alla soluzione è addizionata una ciocca di capelli (100 mg). Si lascia reagire a temperatura ambiente e all'aria per tre ore. A fine reazione si effettuano lavaggi esaustivi con ulteriore DMF e infine acqua. La ciocca di capelli così trattata è poi asciugata con aria calda.

Reazione polimeri BZP2 e BZP3 - Cheratina

In una beuta sono disciolti separatamente 150 mg dei polimeri 143 e 144 in 25 ml di acqua. A ciascuna soluzione è addizionata una ciocca di capelli (100 mg). Si lascia reagire a temperatura ambiente e all'aria per 24 h. A fine reazione si effettuano lavaggi esaustivi con acqua. La ciocca di capelli così trattata è poi asciugata con aria calda.

Determinazione dei gruppi amminici secondo il metodo di Gaur-Gupta

I. Funzionalizzazione con SDTB

In un pallone da 10 ml vengono posti alcuni mg (50 mg) di capelli da analizzare (campione A = capelli non trattati; campione B = capelli trattati con il polimero BZP1). <successivamente si addizionano 250 µl di Reattivo A (0,5 mmoli di N-succinimidil-4-O-(4,4'-dimetossitriphenil)butirrato in 5 ml di N,N-Dimetilformammide anidra), 100 µl di Et₃N anidra ed una quantità catalitica di 4-dimetilamminopiridina. La reazione è condotta per 2 h a temperatura ambiente. A fine reazione la soluzione di DMF è allontanata, mentre i capelli acilati sono esaustivamente lavati con ulteriore DMF, MeOH, THF ed infine etere etilico fino al completo allontanamento del reattivo in eccesso e seccati a pressione ridotta per 5 ore.

II. Rimozione del gruppo 4,4'-dimetossitriifenilmetilico

Una aliquota di campione A e B, pari rispettivamente a 21,7 mg e 27,6 mg, costituiti da capelli acilati secondo ottenuto secondo la I fase, è accuratamente pesata in un matraccio da 10 ml e portata a volume con una miscela detritilante (reattivo B) composta del 52,7% di HClO₄ al 70% e dal 47,3 % di MeOH. La reazione di detritilazione viene lasciata progredire a temperatura ambiente; un volume esatto di tale soluzione, una volta filtrata dal solido, è prelevato e trasferito in una cassetta di quarzo (1cm) per la registrazione dello spettro visibile usando la stessa miscela detritilante come riferimento. Il valore di assorbanza A al massimo di assorbimento $\lambda = 498$ nm (0,058 per il campione A; 0,032 per il campione) fornisce la quantità di gruppi amminici liberi presenti nel solido espresse come mol/ gr di supporto (campione A: 3,8E-7mol/g; campione B: 1,65E-7).

III PARTE

Funzionalizzazione della BSA

500 mg di BSA sono solubilizzati in 50 ml di H₂O distillata in un beker da 100 ml, posto su un agitatore magnetico. A solubilizzazione avvenuta, il beker è immerso in un bagno di ghiaccio e la soluzione è addizionata dell'appropriata quantità di anidride metacrilica (AM). Il pH della soluzione è monitorato con un pHmetro e mantenuto costante a valori prossimi alla neutralità; tali valori sono assicurati dall'aggiunta di una soluzione 0.2 M di NaHCO₃. Si lascia il tutto sotto agitazione per 1h, sempre controllando la temperatura e il pH. Trascorso il tempo necessario la soluzione appare limpida e di colore giallo chiaro.

Dialisi della BSA funzionalizzata

La soluzione acquosa ottenuta dalla reazione di funzionalizzazione della BSA è introdotta in una porzione di tubo da dialisi (taglia 6-27/32") precedentemente bollito in acqua distillata, allo scopo di renderlo permeabile e flessibile. Il tubo è 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 48h, sostituendo l'acqua della vasca con acqua distillata di fresco (l'uso di acqua distillata contaminata da perossidi può portare alla polimerizzazione della BSA funzionalizzata) ogni 12h, per allontanare le impurezze in essa contenute e favorire l'ulteriore diffusione dei sali attraverso la membrana verso l'esterno. Dopo 48h il sacchetto è prelevato dalla vasca e la soluzione in esso contenuta è travasata in un pallone da 100 ml. La soluzione, che si presenta viscosa, appare omogenea e non necessita di filtrazione. Il campione risultante, congelato e liofilizzato risulta un solido molto soffice e vaporoso di colore bianco-verde.

Determinazione dei gruppi amminici terminali

In un matraccio da 10 ml vengono posti la BSA funzionalizzata e non (≈ 2 mg) e 250 μ l (7.5 μ moli) di una soluzione 0,03M di acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS) e si porta a volume con una soluzione 0.1 M di sodio tetraborato. La reazione è lasciata agitare per 45 minuti a temperatura ambiente.

Preparazione delle microparticelle (Procedura generale)

Un reattore cilindrico di vetro di opportune capacità (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 introdotte le quantità pesate dei monomeri, dell'iniziatore e dell'acqua bidistillata (fase dispersa). La miscela omogenea così ottenuta viene sifonata, mediante ago flessibile, nel reattore contenente i solventi. Successivamente nel reattore viene introdotto, tramite imbuto gocciolatore, il solvente necessario a far sì che la densità della fase organica sia circa uguale a quella della fase acquosa. Terminata l'aggiunta viene fatta partire l'agitazione meccanica ad una velocità adeguata (1000 r.p.m.), quindi

vengono aggiunti tramite siringa la miscela di tensioattivi (SPAN 85/ TWEEN 85), e dopo dieci minuti di agitazione, l'acceleratore di polimerizzazione N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina (TMEDA). L'agitazione viene continuata per circa due ore a 40° C. La resina ottenuta viene filtrata e rimessa nel reattore per essere lavata abbondantemente con porzioni da 50 ml di isopropanolo, etanolo ed infine acetone. Dopo l'ultimo lavaggio, la resina viene filtrata ed essiccata a pressione ridotta per 12 ore.

Determinazione del contenuto d'acqua nelle microparticelle

In un filtro con setto a porosità 2, preventivamente bagnato, centrifugato (5 minuti a 3000 g/min) e quindi pesato viene introdotta una quantità nota di resina (circa 50 mg). Il filtro contenente la resina viene pesato, riempito di un solvente e allo stesso tempo immerso in una beuta contenente lo stesso solvente.

Dopo un'ora il filtro viene tolto dalla beuta e il solvente in eccesso lasciato gocciolare, quindi viene inserito in una provetta da centrifuga e viene allontanato il solvente per centrifugazione (5 minuti a 3000 g/min). Dopo aver pesato il filtro contenente la resina più il solvente inglobato si rimette il tutto nella beuta contenente il solvente. La stessa operazione viene ripetuta dopo 4 ore e dopo una notte. Le pesate dopo centrifugazione sono così determinate:

$$\begin{aligned} & \text{peso (filtro + resina + solvente inglobato)} - \text{peso (filtro umido centrifugato)} \\ & = \text{peso (resina + solvente inglobato)} \end{aligned}$$

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

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

Impregnazione dei farmaci

30 mg di farmaco sono stati disciolti in 2 ml di etanolo per HPLC. 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 ore abbiamo aggiunto, 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 tre farmaci diversi, dunque si è reso necessario impostare le condizioni sperimentali più idonee per ogni tipo di sostanza:

Diflunisal

flusso = 0,5 ml/min ; λ = 254 ; miscela eluente = MeOH/H₂O/H₃PO₄ in rapporto 95/4,95/0,05.

β -propranololo

flusso = 0,7 ml/min ; λ = 254 nm ; miscela eluente = Acetonitrile/MeOH/CH₃COOH/NH₃(25%) in rapporto 95/4,6/0,3/0,1.

5-fluorouracile

flusso = 1,0 ml/min ; λ = 266 nm ; miscela eluente = H₂O/ MeOH/ H₃PO₄ in rapporto 97,95/2/0,05.

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

APPENDICE

TABELLA 1

Determinazione dei gruppi NH₂ dei materiali polimerici sintetizzati

INTRODUZIONE DEL GRUPPO DIMETOSSITRITILICO						
Sigla	Campione		Reattivo A		t	
	mg		µl		h	
P2.1	20		600		2	
PL1	20		600		2	
PF1	20		600		2	
PF2	20		600		2	

RIMOZIONE DEL GRUPPO DIMETOSSITRITILICO						
Soluzione A			Soluzione B			
Resina-DMT (mg)	Reattivo B (ml)	T H	Soluzione A (µl)	Reattivo B (µl)	Abs 498 nm	Mol / g di supporto
9,44	10	1	300	2700	0,87857	1,329 E ⁻³
6,48	10	1	30	2970	0,90159	1,9856 E ⁻⁴
3,76	10	1	100	2900	0,49646	5.65E ⁻⁴

Abs = Assorbanza

Reattivo A = SDTB in DMF

Reattivo B = Miscela detritilante: 52,7% di HClO₄ al 70% e dal 47,3 % di MeOH.

Mol/ g di supporto = moli di gruppi amminici per grammo di supporto polimerico analizzato

T = tempo espresso in ore

Resina-DMT = Polimero legato al gruppo dimetossitritilico

TABELLA 2

Determinazione dei gruppi fenolici dei materiali polimerici PF1 e PF2

Soluzione A					
Campione	mg	V_{tot} (ml)	RF (ml)	Na₂CO₃ 7% (ml)	MeOH (ml)
Controllo	/	100	/	12	6
PF1	8,2	100	6	12	6
	14,4	100	6	12	6
	19,7	100	6	12	6
	25,8	100	6	12	6
	32,3	100	6	12	6
PF2	5,36	25	1,5	3	1,5
	10,63	25	1,5	3	1,5
	15,10	25	1,5	3	1,5
	21,20	25	1,5	3	1,5
	26,80	25	1,5	3	1,5
Soluzione B					
Campione	Soluzione A (µl)	H₂O (ml)	Conc.	Abs (725 nm)	
Controllo	500	1	/	/	
PF1	500	1	0,027	0.174	
	500	1	0,048	0.285	
	500	1	0,066	0.381	
	500	1	0,086	0.463	
	500	1	0,1076	0.624	
PF2	250	1,250	0,036	0,079	
	250	1,250	0,0709	0.262	
	250	1,250	0,1006	0.354	
	250	1,250	0,1413	0.540	
	250	1,250	0,1786	0.678	

*RF = Reattivo di Folin**Conc = Concentrazione finale mg/ml*

TABELLA 3

Determinazione dei gruppi tiolici dei materiali polimerici PL1 e PL2

Campione	ml	V _{tot} (ml)	RE (μl)	Conc. (M)	Abs (725 nm)	/
Bianco	/	25	1000	/	/	/
L-cisteina 0,01 M	30	25	1000	1.2E-5	0,1560	/
	50	25	1000	2E-5	0,2267	/
	80	25	1000	3.2E-5	0,4062	/
	100	25	1000	4E-5	0,5114	/
	150	25	1000	6E-5	0,7783	/
Campione	mg	V _{tot} (ml)	RE (μl)	Conc. ng/ml	Abs (725 nm)	Mol / g
Bianco	/	25	1000	/	/	/
PL1	5,6	25	1000	0,225	0,7645	2,60E-4
	4,9	25	1000	0,198	0,6658	2,61E-4
	3,5	25	1000	0,130	0,4778	2,61E-4
PL2	7,3	25	1000	0,292	0,9325	2,46E-4
	6.1	25	1000	0,245	0,7676	2,43E-4
	4,3	25	1000	0,176	0,5465	2,40E-4

RE = Reattivo di Ellman

Conc = Concentrazione finale espressa in molarità

Abs = Assorbanza

Mol/g = Moli di gruppi SH per grammo di polimero

TABELLA 4

Determinazione dell'attività antiossidante mediante DPPH Test sui polimeri PL1 e PL2

Campioni Sigla	mg	DPPH 2E ⁻⁴ in EtOH	EtOH (ml)	V tot (ml)	Abs (517 nm)	PI
controllo	0	10	15	25	0.83164	/
	230	10	15	25	0.55681	33,05
	115	10	15	25	0.61104	26,53
PL1	57,5	10	15	25	0.65714	20,98
	27,5	10	15	25	0.69941	15,89
	10	10	15	25	0.74641	10,25
controllo	0	10	15	25	0.80026	/
	115	10	15	25	0.5343	33,23
	86	10	15	25	0.5996	25,07
PL2	57,5	10	15	25	0.67049	16,21
	27,5	10	15	25	0.73842	7,721
	10	10	15	25	0.70144	1,1

PI = Percentuale di inibizione
Abs = Assorbanza
V_{tot} = Volume totale
DPPH = radicale picrilidrazile

TABELLA 5

Determinazione dell'attività antiossidante mediante DPPH Test sui polimeri PF1 e PF2

campione		DPPH 2E ⁻⁴ in MeOH	MeOH (ml)	V tot (ml)	Abs (517 nm)	PI	
sigla	mg						
Controllo	0	40	60	100	0.71317	/	
	10,1	40	60	100	0.36343	49	
	6,7	40	60	100	0.42749	40	
	PF1	4	40	60	100	0.46565	34,7
		2	40	60	100	0.5348	25
		1,1	40	60	100	0.60407	15,3
Controllo	0	10	15	25	0.80132	/	
	5,82	10	15	25	0.18671	76,69	
	2,78	10	15	25	0.30587	61,83	
	PF2	1,08	10	15	25	0.48109	39,96
		0,74	10	15	25	0.54208	32,35
		0,57	10	15	25	0.65356	18,44

PI = Percentuale di inibizione

Abs = Assorbanza

V_{tot} = Volume totale

DPPH = radicale picrilidrazile