

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA CALABRIA

Facoltà di Farmacia

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

Dottorato di Ricerca in

“Metodologie per lo sviluppo di molecole di interesse farmacologico”

XIX ciclo

Tesi di Dottorato

Polimeri a memoria molecolare per l'identificazione di substrati di
interesse tossicologico nell'uomo

Settore disciplinare: Chim. 09

Supervisore

Prof. Nevio Picci

Coordinatore

Prof. Giovanni Sindona

Candidato

Dott. Carmelo Maria Garreffa

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

Indice

	<i>pag.</i>
Prefazione	1
Capitolo I	
“Introduzione all’<i>Imprinting</i> Molecolare”	
- Tecnologia dell’ <i>Imprinting</i> Molecolare: un modo per costruire serrature artificiali per chiavi molecolari	4
- Principi-guida sull’ <i>Imprinting</i> Molecolare	6
- Notizie storiche	7
- Principi di tecnologia dell’ <i>Imprinting</i> Molecolare (MIT)	8
- Costruzione di un polimero a memoria molecolare: scelta della molecola “target”	12
- Monomeri funzionali	12
- Iniziatori	14
- Reticolanti	15
- Porogeni (solventi)	16
- Configurazioni dei polimeri a memoria molecolare	18
- Un esempio reale di sviluppo di un polimero a memoria molecolare	19
- Valutazione della selettività di un MIP	21
- Applicazioni dei polimeri a memoria molecolare	22
- Materiali polimerici a memoria nel campo delle separazioni: imprinting molecolare per la cromatografia (MIC)	22
- Modelli di legame artificiali di anticorpi e recettori	24
- Applicazioni catalitiche e sintetiche: MIPs come sostituti di enzimi	26
- MIPs come elementi di riconoscimento nei sistemi biosensori	27
- MIPs e Drug Delivery	30
- Polimeri a memoria molecolare ed estrazione in fase solida	32
- Protocollo della metodologia “MISPE” (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction)	34
- Caratteristiche dei MIPs	39
- Prospettive sul futuro del <i>Molecular Imprinting</i>	39

Capitolo II

“Ambiente e strategie per l’identificazione di sostanze di rilevanza tossicologica”

- La crisi del rapporto uomo/ambiente	41
- Verso lo Sviluppo Sostenibile	42
- Fattori limitanti la qualità della vita umana	43
- Conseguenze del deterioramento della ecosfera	45
- Strategie di controllo dell’inquinamento	46
- Criteri e standard di qualità ambientale	48
- L’uso degli indicatori nel monitoraggio della catena alimentare	49

Capitolo III

“*Imprinting* Molecolare in campo alimentare”

- Introduzione	57
- MISPE (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction) e “Sudan I”	58
- Discussione	60

Capitolo IV

“*Imprinting* Molecolare e ambiente”

- Cenni sulla tossicologia del rotenone	66
- Polimeri a memoria molecolare per l’identificazione di “Rotenone”	70
- Discussione	72

Capitolo V

“*Imprinting* Molecolare ed amminoacidi”

- Introduzione	75
- Determinazione quantitativa degli amminoacidi	76
- L’omocisteina	79
- Metodi di riconoscimento	83
- Discussione	87
- Derivatizzazione dell’omocisteina	89
- Sintesi dei polimeri a memoria molecolare	90

- Analisi HPLC	93
- Analisi HPLC dell'eluato dei polimeri "MIP 1" e "NIP 1"	93
- Analisi HPLC dell'eluato dei polimeri "MIP 2" e "NIP 2"	96
- Analisi HPLC dell'eluato dei polimeri "MIP 3" e "NIP 3"	99
- Estrapolazione dell'effetto-imprinting a concentrazione zero di metanolo	100
- Conclusioni	101

Capitolo VI

"Parte sperimentale"

- Parte sperimentale "Sudan I": sintesi del polimero a memoria molecolare	102
- Preparazione delle colonne MISPE	103
- Procedura MISPE	103
- MISPE in una matrice alimentare	103
- Analisi HPLC	104
- Materiali	104
- Parte sperimentale "Rotenone": fasi di preparazione del polimero e MISPE	105
- Apparato HPLC	106
- Materiali	106
- Parte sperimentale "Omocisteina": protocollo sperimentale per la funzionalizzazione dell'omocisteina con benzoil cloruro e sintesi della N-benzoil omocisteina	107
- Sintesi dei " <i>Molecularly Imprinted Polymers</i> ": procedura generale tradizionale per la sintesi del MIP (monolito)	107
- Estrazione "soxhlet"	107
- Purificazione, frantumazione e setacciatura del polimero	108

Bibliografia	109
---------------------	-----

Prefazione

Gli obiettivi del presente progetto di ricerca sono stati la ideazione e la realizzazione di materiali polimerici utilizzabili per il rilevamento della presenza di additivi nocivi per l'uomo in matrici alimentari, di inquinanti in componenti dell'ecosistema (acque, suolo ed altri) e per l'identificazione di molecole che rappresentino indicatori di rilevante importanza in campo diagnostico-salutistico.

È stato pertanto necessario partire dalla sintesi di materiali polimerici da impiegare per la ricerca di sostanze inquinanti in substrati di diversa natura.

Si è ritenuto quindi, alla luce di quanto progettato, che nel campo delle tecnologie legate all'impiego dei polimeri quella che oggi si poteva ritenere più adatta alle esigenze di tale tipo di ricerca fosse quella dei Molecularly Imprinted Polymers (MIPs), ovvero Polimeri a Memoria Molecolare.

L'*imprinting* molecolare è una tecnica per la produzione di siti di legame selettivi per una particolare molecola o analita.

Monomeri funzionali polimerizzabili sono disposti intorno ad una molecola-stampo (l'analita) e la polimerizzazione, una volta avviata, scaturisce nella formazione di un network (una rete) che circonda la molecola stampo, anche detta "templante".

L'estrazione dello stampo lascia delle cavità nel polimero con complementarietà di forma e di gruppi funzionali rispetto alla molecola-stampo. Il polimero così ottenuto avrà la capacità di adsorbire in maniera specifica l'analita ed eventuali altre molecole strutturalmente analoghe ad esso (L. Pauling, 1942). Le proprietà di memoria molecolare sono mantenute a lungo ed è comunque possibile riutilizzare la matrice polimerica, in seguito all'estrazione dell'analita.

I "Molecularly Imprinted Polymers" (MIPs) hanno inoltre la caratteristica di essere molto stabili in seguito a stress meccanici e chimici; ciò li rende estremamente utili nelle loro applicazioni in chimica analitica e biologica (M.V. Pliakov, 1931).

Nel 1894 Fischer propose la definizione di "chiave e serratura", riguardo il modo in cui un enzima interagisce con un substrato e suggerì che l'enzima presentava depressioni sulla sua superficie, complementari alla forma del substrato (A.L. Lehninger et al., 1994).

Pertanto, il substrato si sarebbe incastrato come una "chiave" nella "serratura" del sito

attivo sull'enzima. Questo processo rappresenta l'esito di molte interazioni non-covalenti tra le due componenti (substrato ed enzima) e l'imprinting molecolare può quindi essere visto come una metodica per produrre "serrature" artificiali per "chiavi" molecolari. Ciò è ottenuto, come accennato prima, mettendo insieme una molecola-stampo (la chiave) con monomeri funzionali polimerizzabili e permettendo loro di interagire (M.V. Poliakov, 1931).

Un reticolante, anche detto "colla molecolare", viene in seguito aggiunto e la reazione di polimerizzazione ha così inizio (G. Wulff and A. Sarthan, 1972).

Ciò ha esito nella formazione del network prima citato (serratura) che circonda la molecola-stampo (templante). Quest'ultima può successivamente essere estratta lasciando un sito di legame con forma specifica e complementarità di gruppo funzionale rispetto al templante (L. Pauling, 1942).

Una volta che il polimero a memoria molecolare è stato costruito, esso sarà capace di legare ancora la molecola-stampo ed in alcuni casi anche prodotti strutturalmente correlati ad essa.

Questa proprietà di riconoscimento, inizialmente, fu ritenuta non utilizzabile poiché, lavorando con i silicati e non avendo ancora adeguate conoscenze sulle tecniche di imprinting, non si riuscirono ad ottenere polimeri con le caratteristiche di riproducibilità e di stabilità attribuibili oggi ai polimeri a memoria molecolare (F.H. Dickey, 1949).

In effetti, con gli anni, questi ultimi, si sono invece dimostrati sempre più stabili rispetto a stress di tipo meccanico, alte temperature, alte pressioni, oltre ad essersi rivelati resistenti a trattamenti con acidi, basi, ioni metallici ed una serie di solventi organici (R. Arshadi and K. Mosbach, 1981; G. Wulff, 1995; M. Whitecombe et al., 1995; L. Ye and K. Mosbach, 2001).

È proprio questo il motivo per cui i MIPs hanno trovato largo impiego nel campo della chimica analitica e in biochimica (I. Schweitz et al., 1997; R. Bruggemann et al., 1997; I. Schweitz et al., 1997).

Il programma di ricerca in questione si propone dunque di realizzare polimeri a memoria molecolare in grado di riconoscere selettivamente sostanze inquinanti e/o contaminanti e loro eventuali metaboliti, mediante la metodologia "MISPE" (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction).

I suddetti polimeri verranno utilizzati in maniera specifica per rivelare eventuali tracce

di inquinanti in prodotti alimentari (cibi e congeneri) o in substrati appartenenti all'ecosistema (acqua, suolo), oltre che in campo salutistico-diagnostico.

Nell'ambito dei numerosi campi di applicazione dei MIPs (catalisi, cromatografia, intelligent drug delivery, estrazione in fase solida, biosensori ed altri) sempre maggiori risorse vengono oggi destinate a ricerche mirate a sviluppare il loro impiego per il rilevamento di sostanze tossicologicamente attive, principalmente nei campi ambientale ed alimentare.

Nella fattispecie di tale ricerca l'attenzione è stata rivolta a tre diversi substrati, ovvero il "Sudan I", colorante azoico di sintesi per anni usato illegalmente come additivo in cibi di diversa natura, il "Rotenone", erbicida di origine naturale che è stato per molto tempo impiegato indiscriminatamente in agricoltura perché ritenuto innocuo ed infine la "Omocisteina", amminoacido importante anche perché correlato a diverse patologie cardiache e cerebrovascolari acute ed inoltre, se in eccesso, ad una lunga serie di disfunzioni ed alterazioni tra cui ad esempio quelle a carico degli apparati scheletrico, vascolare, oculare e del sistema nervoso centrale.

Per il rilevamento di tali substrati ci si è avvalsi, come già detto in precedenza, dell'Imprinting Molecolare associato ad una efficace e consolidata tecnica di estrazione e concentrazione di analiti (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction).

L'analisi HPLC dell'eluato concentrato ottenuto in seguito ad estrazione in fase solida, dà la possibilità di riscontrare di volta in volta la capacità di imprinting dei MIPs sintetizzati e quindi l'eventuale presenza del substrato da identificare.

È possibile altresì utilizzare i polimeri a memoria molecolare sintetizzati direttamente come fasi stazionarie per HPLC.

Capitolo I

“Introduzione all’Imprinting Molecolare”

Tecnologia dell’imprinting molecolare: un modo per costruire serrature artificiali per chiavi molecolari

Il concetto di interazione molecolare è molto antico, essendo stato già introdotto dagli imperi greco e romano. A partire dalla seconda metà del XIX secolo, cominciarono ad emergere idee più moderne a proposito di tali interazioni, per esempio attraverso il lavoro di Van der Waals nei suoi studi sulle interazioni tra atomi allo stato gassoso, mentre nel 1894 Fischer presentava il suo famoso lavoro sul modello chiave-serratura, a proposito del modo in cui un substrato interagisce con un enzima.

Da questa intuizione emergeva che un enzima, che è grossolanamente paragonabile al suo substrato, avesse rilievi ed invaginazioni sulla sua superficie, complementari per forma a quelli del substrato.

Negli anni trenta Pauling propose la teoria “istruttiva” per la determinazione della diversità anticorpale, secondo la quale la struttura tridimensionale dell’anticorpo si formerebbe solo in seguito all’incontro con l’antigene, che viene a rappresentare uno stampo intorno al quale la proteina si modella modificando la propria configurazione tridimensionale, per formare quante più interazioni possibili con gli epitopi dell’antigene e presentare poi siti di riconoscimento altamente specifici. Si comprese solo qualche anno dopo che la presenza di un antigene induce una “selezione” tra i linfociti B e questi stessi, stimolati a dividersi in cellule della “memoria” e a differenziarsi in plasmacellule per produrre grandi quantità di anticorpi, danno origine ad un clone di cellule identiche altamente reattive e specifiche (teoria della “selezione clonale”). Nonostante l’infondatezza immunologica, la teoria di Pauling fu fonte di grande interesse nel campo del riconoscimento molecolare e ancora oggi costituisce le fondamenta della tecnologia definita *molecular imprinting*. L’idea di sviluppare una tecnologia basata sul riconoscimento molecolare e sulla capacità di mimare le proprietà naturali di legame delle molecole biologiche, ha stimolato la curiosità scientifica di molti ricercatori. Negli anni ‘70 Wulff (Wulff et al., 1973) sintetizzò polimeri sintetici

con cavità specifiche in grado di separare le forme enantiomeriche di alcuni zuccheri. L'approccio (pre-organised) di Wulff e collaboratori si basa su legami covalenti reversibili tra la molecola-stampo e i monomeri prima della polimerizzazione. I tipi di legame più comuni sono esteri degli acidi carbossilici e borici, immine (basi di Schiff) e chetali per la loro rapida cinetica di formazione e rottura in confronto ad altri legami covalenti. Mosbach e collaboratori (Arshady e Mosbach, 1981) hanno sviluppato un approccio diverso (self-assembly) stimolati dall'osservazione che la maggior parte delle interazioni tra molecole biologiche si basa su forze non covalenti.

Nei sistemi biologici, complessi molecolari sono spesso formati da una moltitudine di interazioni di tipo non-covalente come legami a idrogeno o di tipo ionico. Sebbene tali interazioni, quando considerate individualmente risultano essere deboli in natura, se paragonate ai legami di tipo covalente, la simultanea azione di più d'uno di questi legami deboli spesso dà luogo alla formazione di complessi dotati di una stabilità molto elevata.

Questo è il caso, per esempio, del legame tra biotina ed avidina, dove è stata misurata in mezzo acquoso una costante di dissociazione in un range femtomolare, corrispondente ad una energia di legame di circa 90 kJ/mole a 25°C.

Pertanto, l'azione contemporanea di numerose interazioni di tipo non-covalente e quindi deboli, può tradursi nella formazione di complessi altamente stabili.

Gli studi di interazioni complesse tra specie molecolari, di riconoscimento molecolare, sulla capacità di mimare i processi di legame esistenti in natura, ha affascinato un gran numero di scienziati da ormai molti anni.

Questi punti di partenza hanno costituito le basi per un nuovo settore della chimica biomimetica, nel quale sono state studiate e si studiano "imitazioni" dei diversi meccanismi di legame naturali, come ad esempio quelli riguardanti gli enzimi e gli anticorpi.

Il termine "biomimetico" si riferisce generalmente a tutti gli aspetti che riguardano processi chimici che mimano reazioni biochimiche. Così come le strutture ed i meccanismi dei vari sistemi biochimici diventano sempre più conosciuti, gli scienziati stanno tentando di trasferire queste conoscenze al campo delle strategie sintetiche.

Spesso questi approcci sintetici sono mirati a ridurre il grado di complessità dei sistemi biologici in più semplici modelli, paragonabili a delle "riproduzioni", come per esempio

i modelli enzimatici mancanti di una solida struttura peptidica macromolecolare, ma che contengono gruppi attivi catalitici, orientati spazialmente e stericamente vincolati ai siti attivi degli enzimi.

Principi-guida sull'*Imprinting* Molecolare

Un affascinante approccio biomimetico agli studi su modelli sintetici che mimano le reazioni biochimiche che avvengono in natura, è quello che riguarda la tecnologia dell'*Imprinting* Molecolare (MIT), che può essere descritta come un modo di costruire serrature artificiali per chiavi molecolari.

Per dare un'idea generale sulla procedura di *imprinting* molecolare, è bene enunciarne le principali fasi.

Inizialmente, una molecola “chiave” selezionata è messa in contatto con una serie di altri agenti necessari alla costruzione di questa “serratura” artificiale.

I componenti messi insieme con l'obiettivo di costruire il complesso chiave-serratura, vengono lasciati in condizioni favorevoli al loro assemblaggio, sia esso di natura covalente, sia esso di natura non-covalente.

I complessi così formati tra la molecola-chiave e l'intera struttura sono successivamente lasciati consolidare tra di loro in modo da far ancorare la struttura in corso di formazione alla chiave molecolare (anche definibile come molecola-stampo).

Una volta rimossa la chiave molecolare rimarrà una struttura avente connotazioni stereochimiche tali da permettere, se tutto funziona per il meglio, un riconoscimento selettivo per la chiave molecolare originaria ed eventualmente per altre molecole strutturalmente analoghe ad essa, ma escludendo la possibilità di riconoscimento di qualsiasi altra molecola.

La “chiave molecolare” può, inizialmente, essere rappresentata da qualsiasi tipo di molecola, a partire da piccole molecole come principi attivi farmacologici, aminoacidi o ormoni steroidei, fino ad arrivare a molecole più grandi come acidi nucleici o proteine.

Grossi assemblati molecolari come cellule e virus possono anche essere utilizzati come molecole-stampo.

In generale, comunque, la difficoltà nella costruzione dei materiali “imprantati” cresce con l'aumentare delle dimensioni delle chiavi molecolari selezionate.

Notizie storiche

La ricerca e lo sviluppo dell'Imprinting Molecolare hanno le loro origini nel campo dell'immunologia.

Durante gli anni '30 Breinl e Haurowitz, seguiti da Mudd, proposero una ipotesi sulla diversità nella formazione degli anticorpi durante la fase del loro incontro con antigeni xenobiotici. La notevole specificità dei complessi anticorpo-antigene riscontrata nel riconoscimento chirale dell'acido d- e l-tartranilico, fu attribuita alle interazioni dei gruppi chimici dell'anticorpo nascente con l'antigene, durante la biosintesi dell'anticorpo stesso.

Ogni unità strutturale dell'anticorpo sarà selezionata e orientata, nel momento della sintesi, per adattarsi alla struttura locale ed assumere la configurazione della superficie antigenica.

Queste considerazioni teoriche furono ulteriormente elaborate da Pauling, il quale ipotizzò che la grande diversità nella biosintesi degli anticorpi era dovuta alla formazione di diverse configurazioni tridimensionali del canale polipeptidico dell'anticorpo indotta dalla interazione con gli antigeni.

Quindi, secondo queste illuminanti teorie sulla diversità anticorpale, gli anticorpi dovrebbero essere in grado di cambiare la loro struttura tridimensionale così da formare più punti di interazione possibile con gli epitopi degli antigeni.

Pertanto, i siti combinatori anticorpali, verrebbero plasmati con l'antigene così come uno stampo in una procedura di fusione, ovvero essi avrebbero una "memoria molecolare" per gli antigeni (figura 1).

Più tardi, queste teorie si rivelarono poco corrette e i loro modelli ispiratori furono abbandonati a favore della più appropriata teoria della "selettività clonale" nella formazione degli anticorpi. Nonostante ciò, i precedenti modelli hanno gettato le basi per lo sviluppo dell'Imprinting Molecolare.

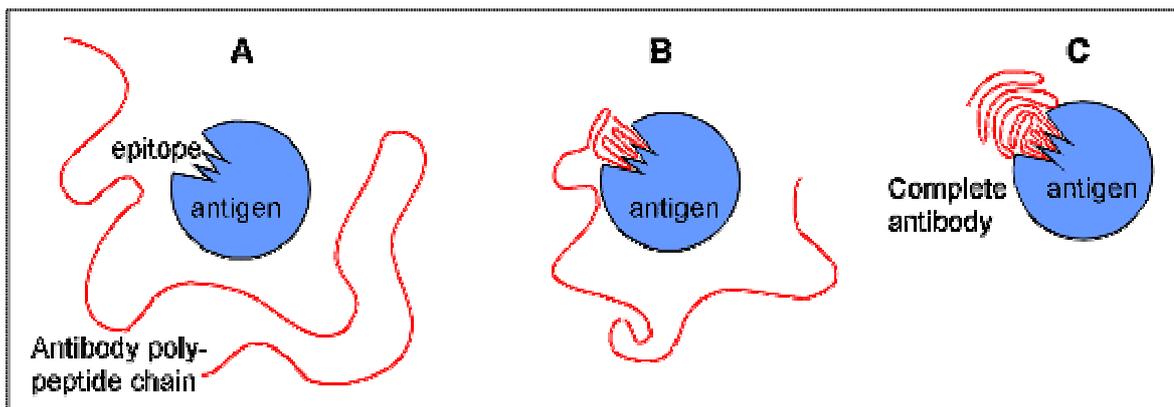


Figura 1. Formazione dell'anticorpo secondo Pauling. A) Il canale polipeptidico anticorpale nascente incontra l'antigene. B) Il canale polipeptidico comincia ad adattarsi, guidato dalle caratteristiche strutturali dell'epitopo. C) La formazione dell'anticorpo "guidata" è così completa.

Principi di tecnologia dell'*Imprinting* Molecolare (MIT)

Come conseguenza delle teorie di Pauling sugli anticorpi, prese piede l'idea che lo stesso concetto poteva essere utilizzato per le matrici sintetiche.

Tentativi separati furono portati avanti nelle decadi successive, ma non si compì un consistente passo in avanti in questo settore prima degli anni '70 e '80.

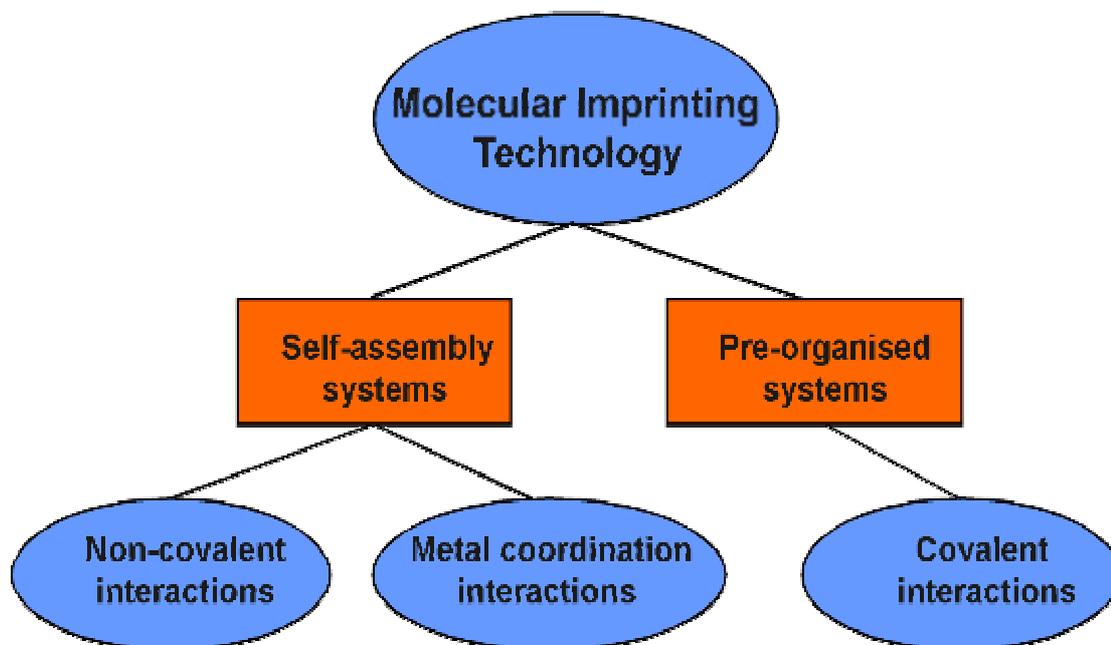


Figura 2. Approcci alla metodologia dell'imprinting molecolare.

Attualmente possiamo distinguere due approcci fondamentali all'Imprinting Molecolare (figura 2): quello pre-organizzato, portato avanti soprattutto da Wulff e collaboratori, dove gli aggregati in soluzione prima della polimerizzazione sono tenuti insieme da legami covalenti (reversibili) e quello dell'auto-assemblaggio, sviluppato principalmente da Mosbach e collaboratori, nel quale lo stadio di pre-arrangiamento tra la molecola stampo e i monomeri funzionali è costituito da interazioni non-covalenti o metallo-coordinate.

Entrambe le procedure di imprinting necessitano di un'alta percentuale di reticolante e danno luogo a polimeri caratterizzati da sostanziale rigidità e completamente insolubili. Questo tipo di assemblamento indotto dallo stampo, che porta ad una matrice di riconoscimento artificiale, è messo a punto secondo una metodica molto diretta.

La procedura di sintesi di polimeri a memoria molecolare (MIPs) con la metodica dell'approccio "pre-organizzato" richiede la scelta di una molecola che sia in grado di formare legami covalenti reversibili con i monomeri prima della polimerizzazione. Questo riduce il numero degli stampi potenziali nonché le possibili strategie operative. Una volta formatosi il derivato polimerizzabile, si aggiunge il reticolante e si procede alla polimerizzazione. Alla formazione del polimero segue l'estrazione della molecola con la rottura di questi legami covalenti mediante idrolisi (si ottiene un'estrazione al massimo del 90% ma generalmente i valori sono inferiori). Il successivo legame della molecola target con il polimero comporterà il formarsi degli stessi legami covalenti nelle cavità specifiche rimaste libere.

Con l'approccio non covalente, ovvero mediante "auto-assemblaggio", si sfruttano solo legami deboli (interazioni tipiche in questo caso sono legami idrogeno, interazioni ioniche e idrofobiche) e interazioni con metalli di coordinazione. I monomeri funzionali formano in soluzione diverse interazioni deboli con la molecola e solo la successiva aggiunta di reticolante porta alla co-polimerizzazione del complesso. Il processo di polimerizzazione avviene in solventi organici come il toluene o il cloroformio, data l'influenza che la polarità del solvente esercita su questo tipo di legami. Dopo la rimozione della molecola usata come stampo mediante estrazioni blande, si ottiene una matrice sintetica relativamente porosa dotata di memoria, con un'architettura macromolecolare complementare alla forma della molecola e alle sue funzioni. Associazione e dissociazione della molecola con i siti artificiali creati, avvengono per

semplice diffusione dentro e fuori il polimero senza formazione o rottura di alcun legame covalente. Il sistema non covalente risulta più versatile ed è più facile identificare un cocktail di monomeri che permetta la realizzazione di un polimero con determinate caratteristiche. In una procedura tipica si usa acido metacrilico (MAA) come monomero, etilen glicole dimetacrilato (EGDMA) come reticolante, cloroformio o toluene come porogeno (solvente), 2,2'- azobisisobutirronitrile (AIBN) come iniziatore della polimerizzazione, che può essere determinata da raggi UV o mediante induzione termica. Il polimero (MIP) che si ottiene è sotto forma di un "bulk" (un corpo rigido) che viene rotto, macinato finemente in un mortaio in particelle omogenee, setacciato prima del recupero della molecola stampo. Alternativamente si può depositare la miscela di polimerizzazione tra un "silicon wafer" e un vetrino in modo che il successivo processo di polimerizzazione porti ad una membrana polimerica (sandwich). I polimeri possono essere rigenerati con estrazioni che portano al recupero fino al 99% della molecola stampo.

I polimeri (MIPs) che si ottengono con questa tecnica hanno caratteristiche chimico-fisiche interessanti e vantaggiose rispetto alla componente biologica che sostituiscono. Sono infatti altamente stabili rispetto a stress meccanici, resistenti a temperature e pressioni relativamente elevate, nonché a trattamenti con acidi, basi, ioni metallici, si possono conservare a temperatura ambiente per lunghi periodi e riutilizzare numerose volte senza perdita dell'effetto memoria.

Bisogna però tenere in considerazione anche alcuni aspetti svantaggiosi.

Un primo problema è rappresentato dalla necessità di disporre di quantità discrete della molecola di partenza, che può essere di per sé costosa o di difficile reperibilità (da 50 a 500 $\mu\text{mol/g}$ di polimero secco). La natura stessa del processo di polimerizzazione comporta inoltre la presenza, nel polimero finale, di siti di legame con diversa affinità. Questa eterogeneità può essere paragonata alla policlonalità degli anticorpi prodotti in vivo da animali da laboratorio in risposta all'immunizzazione e si riflette nella distribuzione della forza di legame del polimero che, rappresentata sotto forma di un'analisi Scatchard, mostra un andamento non lineare, passando da siti ad alta affinità a siti con affinità nulla. Un grosso ostacolo rimane inoltre la polimerizzazione con le proteine quali molecole stampo: essendo di grandi dimensioni è difficile realizzare una rete polimerica con sufficienti legami crociati. Rimuovere poi la proteina dal polimero e

farla diffondere attraverso esso stesso durante le procedure di analisi sembra ancora poco probabile; le proteine sono inoltre insolubili e denaturabili in solventi organici. Alcuni risultati sono stati ottenuti usando interazioni forti tipo boronato-estere (Glad et al., 1985) o metalli-istidine (Kempe et al., 1995).

Un esempio del protocollo usato per l'imprinting mediante auto-assemblaggio, che prevede soltanto interazioni non-covalenti, è mostrato in figura 3.

In questo esempio, una matrice a memoria molecolare della morfina è preparata utilizzando acido metacrilico come monomero funzionale, in grado di formare interazioni non-covalenti con l'antigene-stampo in soluzione precedentemente la polimerizzazione.

In seguito alla co-polimerizzazione di tali complessi solubili con un reticolante, ovvero etilen-glicole dimetacrilato (EGDMA) e la successiva rimozione dell'antigene-stampo per mezzo di una semplice estrazione del solvente, rimarranno nel polimero siti di riconoscimento complementari per forma e gruppi funzionali alla molecola-stampo.

L'associazione e la dissociazione dell'antigene-stampo può avvenire mediante semplice diffusione verso l'interno e l'esterno dei siti.

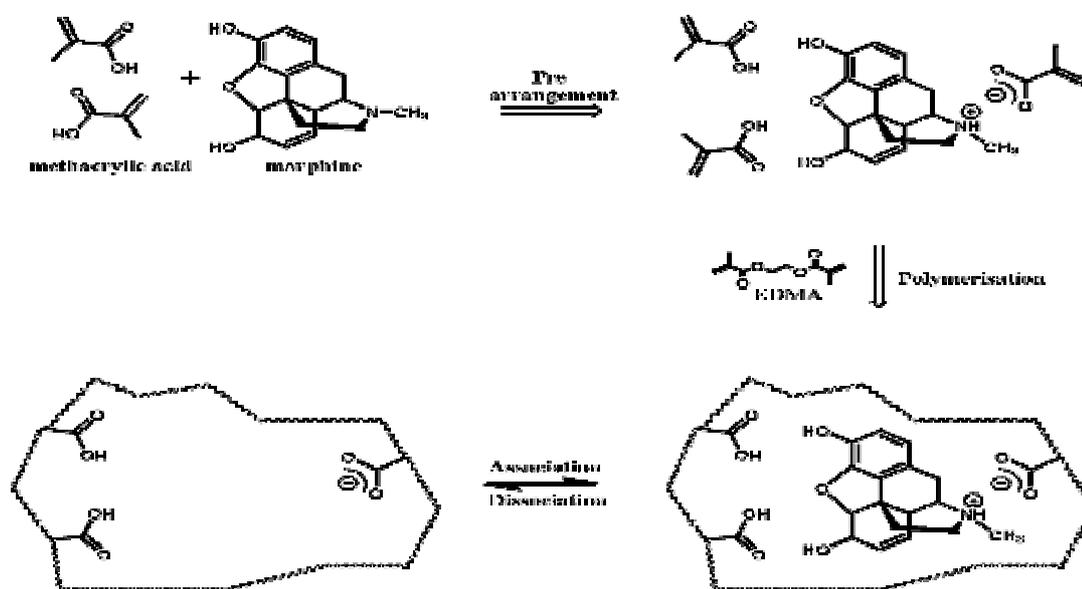


Figura 3. Uno dei primi esempi di preparazione di un polimero a memoria molecolare della morfina.

Costruzione di un polimero a memoria molecolare: scelta della molecola “target”

Una grande varietà di molecole-stampo è stata usata nei molteplici protocolli di imprinting testati. Composti come farmaci, aminoacidi, carboidrati, proteine, basi nucleotidiche, ormoni, pesticidi e co-enzimi sono stati già impiegati con successo per la preparazione di matrici destinate al riconoscimento selettivo.

Tra le metodologie di imprinting usate, è ormai opinione comune che l’approccio che prevede la formazione di interazioni non-covalenti tra la molecola-stampo ed i monomeri funzionali, è certamente quello più versatile. L’apparente debolezza di questi tipi di interazione, quando considerati singolarmente, può essere superata favorendo la formazione di una moltitudine di punti di interazione simultaneamente.

Anche grazie alle rapide cinetiche di associazione e dissociazione di questi tipi di legame, così che in brevissimi tempi possano essere verificate molte possibili combinazioni prima di arrivare a quella ideale, questo protocollo ha dimostrato di essere realmente vantaggioso.

Inoltre, l’uso di interazioni non-covalenti nella procedura di imprinting sembra rappresentare molto da vicino i meccanismi di riconoscimento osservati in natura.

Monomeri funzionali

Diversi sistemi polimerici sono stati sviluppati per essere impiegati nella tecnologia dell’imprinting molecolare (MIT).

Da diverso tempo i più frequentemente utilizzati sono quelli a base di poliacrilato o a base di poliacrilamide. Un altro tipo di approccio è quello che si avvale di sistemi a base di polistirene, usati però in maniera meno estesa.

I monomeri funzionali sono direttamente responsabili delle interazioni di legame nei siti di binding dei polimeri a memoria molecolare. Questi sono normalmente usati in eccesso, in relazione al numero delle moli di template utilizzate. Di norma il rapporto stechiometrico template-monomero funzionale è 1:4. E’ evidente che, per favorire le interazioni del complesso e quindi l’effetto-imprinting, risulta di fondamentale importanza che le funzionalità del monomero siano complementari a quelle della molecola del template.

Tipici monomeri funzionali usati sono gli acidi carbossilici (acido acrilico, acido metacrilico, acido vinilbenzoico), gli acidi solfonici (acido acrilamido-metilpropanosolfonico) e basi (deboli) eteroaromatiche (vinilpiridina, vinilimidazolo).

Per quanto riguarda le interazioni di tipo metallico, è comunemente impiegato un derivato dell'acido iminodiacetico.

Un'altra possibile strategia messa in atto è quella basata sulla preparazione di polimeri con un polisilossano. In quest'ultimo sistema sono usati come monomeri funzionali diversi silossani.

In figura 4 sono riportate le strutture di alcuni tra i monomeri funzionali oggi in uso, ovvero, nell'ordine: acido metacrilico (MAA), 2-vinilpiridina (2VP), 4-vinilpiridina (4VP), acrilammide (AAm), N,N'-dimetilacrilammide (DMAA), 2-idrossietil metacrilato (HEMA).

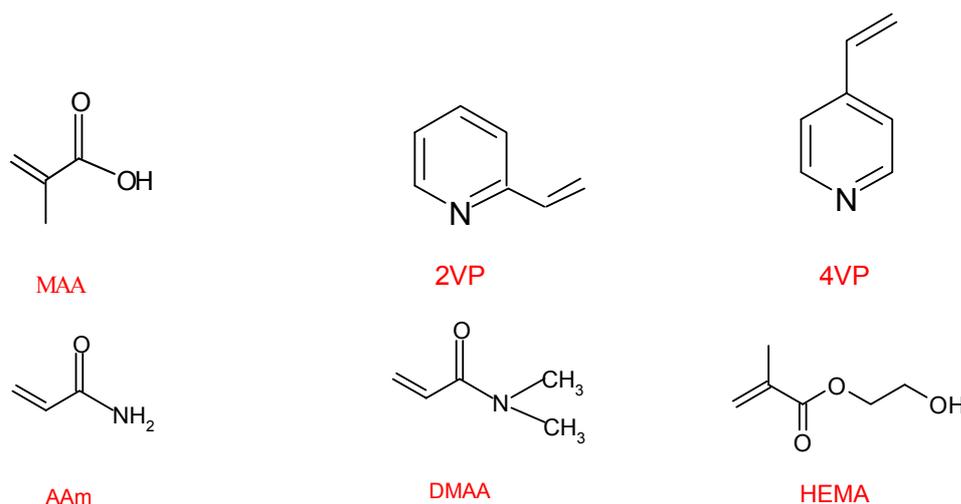


Figura 4

Altri monomeri funzionali disponibili in commercio, in funzione del tipo di imprinting che si desidera realizzare, sono qui di seguito riportati. Come monomeri usati nell'imprinting covalente vi sono: acido 4-vinilfenil borico, acido acrilico, 4-vinilfenil carbonato e ammine, aldeidi, dioli, emiacetali, complessi organometallici e alcoli aventi una funzione polimerizzabile; per quanto riguarda i monomeri usati nell'imprinting non covalente vi sono invece: acido acrilico, acido metacrilico, acido trifluoro metacrilico, acido 4-vinilbenzoico, 1-vinilimidazolo, 2-vinilpiridina, 4-vinilpiridina, acido 2-

acrilammido 2-metil-1-propanosolfonico, 4-vinilimidazolo.

Iniziatori

I polimeri a memoria molecolare vengono comunemente preparati mediante polimerizzazione radicalica. I radicali liberi, promotori dell'innesco del processo, sono normalmente prodotti *in situ* dalla decomposizione termica o fotochimica di un iniziatore organico.

La scelta dell'iniziatore può senz'altro essere condizionata da precise esigenze del sistema, per esempio se la molecola del templante ha caratteristiche di instabilità termica, si potrà optare per un iniziatore attivabile fotochimicamente e viceversa. Se, ad esempio, ci si trova nella situazione in cui l'imprinting è prevalentemente guidato dal legame ad idrogeno, è preferibile lavorare a temperature non molto elevate e scegliere quindi un iniziatore adatto al caso (P. A. G. Cormack and A. Zurutuza Elorza, 2004).

Tra gli iniziatori oggi più utilizzati, sono riportati in figura 5 come esempi l'azobis-isobutirronitrile, ovvero AIBN e il 2,2 azobis-(2,4-dimetilvaleronitrile), ovvero ABDV.

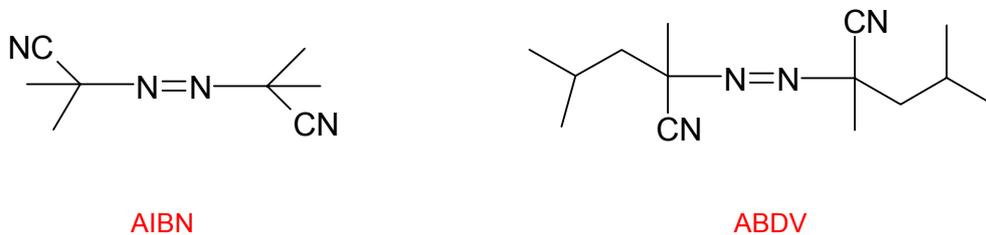


Figura 5

Gli azobisnitrili decompongono sia per via termica (ABDV: 40°C; AIBN: 60°C) che per via fotochimica. Dalla degradazione si libera N₂ e due radicali metastabili, capaci di iniziare la polimerizzazione. Nella figura 6 è illustrata la reazione di decomposizione dell'AIBN.

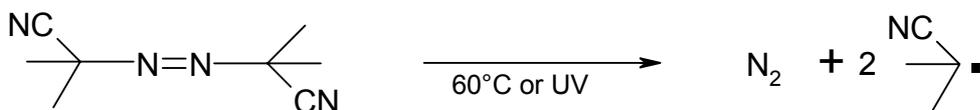


Figura 6

Reticolanti

Dal momento che risulta necessaria una alta percentuale di reticolante (70-90 %) se si vuole ottenere un buon livello di specificità, si è arrivati a selezionare un ristretto numero di reticolanti.

La solubilità del reticolante stesso nella soluzione di pre-polimerizzazione e la solubilità della specie-stampo sotto forma di monomeri, riducono notevolmente il numero di alternative possibili. A tal proposito, sono stati provati con differenti gradi di successo numerosi reticolanti di diversa natura.

Un reticolante è un monomero con più gruppi polimerizzabili. Ciò significa che il reticolante può essere incorporato in più catene polimeriche, facendo da ponte tra di esse e rendendo il polimero più rigido. Esso è quindi molto importante per la stabilizzazione del sito a memoria molecolare e per il conferimento di resistenza meccanica al materiale.

Il materiale che si ottiene dalla polimerizzazione deve avere una struttura sufficientemente porosa e flessibile, tale da consentire alla molecola di template di entrare ed uscire dalle cavità contenenti i siti di riconoscimento. Nello stesso tempo deve essere abbastanza rigido da non perdere la configurazione spaziale impartita dal template durante la formazione del complesso monomero-template. Spesso si giunge ad un compromesso che prevede quantità di reticolante che oscillano tra il 40% e l'80% in peso della miscela di polimerizzazione.

Originariamente, isomeri di divinilbenzene furono usati come agenti reticolanti per lo stirene e altri monomeri funzionali per i polistireni.

Più tardi emerse che i sistemi che si avvalevano dell'impiego dell'acido acrilico o metacrilico potevano essere messi a punto ottenendo un grado di specificità più elevato.

L'etilenglicole dimetacrilato (EGDMA) e il trimetilolo propano trimetacrilato (TRIM) sono attualmente largamente utilizzati in diversi sistemi. Recentemente sono stati testati numerosi altri agenti reticolanti.

Pertanto, reticolanti tri- e tetrafunzionali dell'acrilato, come il pentaeritritolo triacrilato (PETRA) e il pentaeritritolo tetraacrilato (PETEA), sono stati usati per la preparazione di polimeri a memoria molecolare peptide-selettivi.

Oltre a reticolanti non polari o debolmente polari in natura, sono stati studiati reticolanti

contenenti gruppi funzionali. Per esempio, un reticolante monomero contenente due gruppi funzionali amidici insieme ad una porzione piridinica è stato già utilizzato in un protocollo per l'imprinting di alcuni barbiturici.

Qui di seguito, in figura 7, sono riportati alcuni tra i reticolanti attualmente più usati e precisamente: divinilbenzene (DVB), etilenglicoldimetacrilato (EGDMA), N,N'-metilenbisacrilammide (MBA), trimetilpropanotrimetacrilato (TRIM).

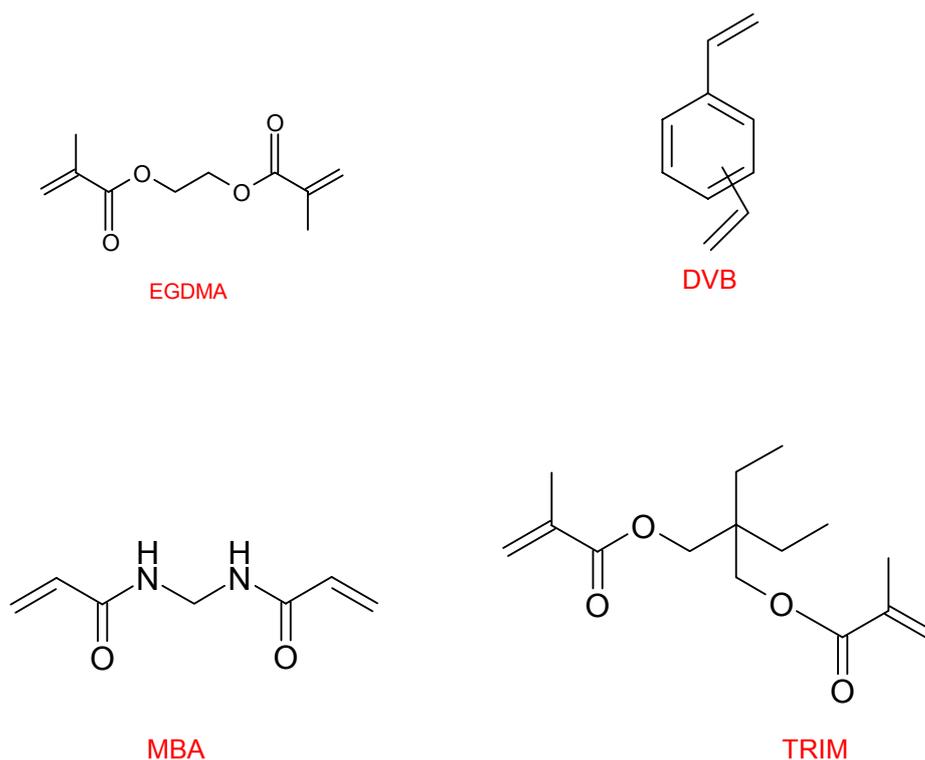


Figura 7

Porogeni (solventi)

Il solvente gioca un ruolo molto importante nella realizzazione di un processo di imprinting molecolare e tale ruolo diventa ancora più importante nei sistemi basati sull'auto-assemblaggio.

Esso è detto "porogeno" proprio perché è responsabile della formazione di porosità sul polimero e la natura e la quantità del porogeno usato determineranno il numero e la grandezza dei pori.

Fungendo da agente porogeno durante la polimerizzazione, il solvente regola la forza

delle interazioni non-covalenti oltre ad influenzare la morfologia del polimero stesso. Generalmente, più è polare il porogeno (solvente), più debole sarà il risultante effetto di riconoscimento, come conseguenza dell'influenza della polarità del solvente sulle interazioni di tipo non-covalente.

I migliori porogeni per imprinting, adatti ad accrescere la tenacia dei legami, sono solventi aventi costante dielettrica molto bassa, come ad esempio toluene e diclorometano. L'impiego di solventi più polari renderà inevitabilmente più debole la forza delle interazioni tra le specie-stampo ed i monomeri funzionali, dando luogo di conseguenza ad un riconoscimento di entità più debole.

D'altro canto, l'influenza del porogeno sulla struttura del polimero costruito può compensare questo apparente inconveniente sull'area superficiale specifica e lo stesso diametro medio dei pori sarà drasticamente dipendente dal tipo di porogeno usato.

Pertanto l'acetonitrile – un solvente abbastanza polare (la sua costante dielettrica è: $\epsilon = 36$) – darà luogo a polimeri maggiormente macroporosi rispetto al cloroformio ($\epsilon = 5$). Una minore area superficiale ed una minore macroporosità potrebbero determinare un basso livello di riconoscimento, a causa della scarsa accessibilità ai siti.

Nella fase di riconoscimento sorgono domande simili a proposito della scelta del solvente. Dal momento che tutte le forze di tipo non-covalente sono influenzate dalle proprietà del solvente, i solventi non polari normalmente garantiscono il miglior livello di riconoscimento.

Quando i polimeri vengono preparati con solventi gradualmente più polari, la loro capacità di riconoscimento diminuisce sensibilmente.

Inoltre, la loro morfologia risulterà notevolmente condizionata, dal momento che il rigonfiamento dei polimeri stessi dipende dal mezzo circostante. Pertanto il rigonfiamento sarà maggiormente pronunciato nei solventi clorurati, come cloroformio e diclorometano, in confronto, per esempio, ad acetonitrile o tetraidrofurano.

Questa modalità di rigonfiamento può portare a cambiamenti nella configurazione tridimensionale dei gruppi funzionali coinvolti nel meccanismo d'azione dei siti di riconoscimento, evento questo che si traduce in una ridotta capacità di legame.

Secondo metodo empirico, la scelta d'elezione del solvente più adatto a favorire il riconoscimento, dovrebbe seguire gli stessi criteri di quella del porogeno da adoperare per l'imprinting, così da evitare ogni eventuale problema di rigonfiamento, sebbene

questo non costituisca un prerequisito fondamentale.

Il rigonfiamento dei polimeri che ha luogo quando questi sono preparati in porogeni organici e successivamente usati in fase acquosa, non rappresenta comunque un ostacolo insormontabile. Il rigonfiamento in acqua è approssimativamente lo stesso rispetto a quello che avviene con molti altri solventi, come ad esempio l'acetone.

Configurazioni dei polimeri a memoria molecolare

I polimeri a memoria molecolare sono stati impiegati con diverse configurazioni. Da ormai molto tempo la tecnica più usata prevede la preparazione di monoliti polimerici compatti, i quali in seguito a frammentazione e ad un'adeguata setacciatura del polimero macinato (al fine di ottenere particelle che normalmente si aggirano intorno ai 25 μm), vengono usati in numerose applicazioni. Per le applicazioni di tipo cromatografico sono stati sviluppati altri particolari tipi di configurazioni. Pertanto, sono stati preparati polimeri "in situ" in colonne cromatografiche ed in sistemi di elettroforesi capillare.

Dal momento che le proprietà di flusso in cromatografia sono strettamente dipendenti dalle dimensioni e dalla forma delle particelle, sono stati fatti numerosi tentativi al fine di ottenere particelle di polimeri a memoria molecolare che siano omogenee sia nelle dimensioni che nella morfologia. Questo risultato è stato conseguito seguendo due diverse strategie: la prima consistente nella produzione e nel rivestimento del polimero "improntato" su particelle pre-formate, come ad esempio particelle di silicati o di poli-(trimetilolo propano trimetacrilato); la seconda consistente invece nella preparazione di microsfere mediante polimerizzazione per sospensione, emulsione o dispersione.

Così facendo, possono essere ottenute particelle di polimero a memoria molecolare sferiche aventi una ristretta distribuzione dimensionale, capaci così di fornire un buon rendimento per quanto riguarda il flusso in cromatografia.

Per quanto riguarda le applicazioni analitiche o come dispositivi-sensore, sono stati messi a punto strati di polimeri molto sottili o membrane polimeriche. In questo caso il polimero può essere sia posizionato direttamente sotto forma di strato sottile su una superficie o su parte di essa o alternativamente, le particelle di polimero a memoria molecolare vengono "incollate" insieme utilizzando un agente legante *ad hoc* ed

ottenendo così, ad esempio, dischi di vetro rivestiti simili a quelli usati nella cromatografia su strato sottile.

I naturali vantaggi ottenuti mediante gli approcci diretti consistono nel fatto che non è necessario ottenere particelle con determinate dimensioni e che i siti che rimangono nel polimero non vengono danneggiati da alcun processo di frammentazione o di setacciatura.

Una ulteriore tecnica, che può essere denominata “imprinting di superficie”, prevede i seguenti passaggi: la molecola-stampo, solitamente di grosse dimensioni, viene dapprima messa in condizioni di formare addotti con monomeri funzionali in soluzione e i complessi così formati sono successivamente in grado di legarsi ad una superficie attivata come quella dei dischetti di silice o delle superfici di vetro.

Pertanto, con questa tecnica, è possibile ottenere una superficie a memoria molecolare disegnata e configurata secondo le specifiche esigenze del caso. Tale approccio potrebbe potenzialmente essere preso in considerazione per la costruzione di superfici in grado di legare specifiche linee cellulari.

Quando vengono preparati monoliti di polimeri a memoria molecolare di specie di molecole-stampo di grosse dimensioni, si corre il rischio che la molecola-stampo rimanga intrappolata permanentemente nella matrice polimerica in seguito alla polimerizzazione. Quando invece vengono usati strati sottili polimerici o superfici a memoria molecolare questo inconveniente viene evitato.

Un esempio reale di sviluppo di un polimero a memoria molecolare

Qui di seguito si cercherà di fornire un esempio concreto riguardo le fasi di costruzione di un polimero a memoria molecolare, avvalendosi ovviamente dei protocolli procedurali standard oggi a disposizione in materia di imprinting molecolare e della relativa terminologia di uso corrente.

Si considererà un sistema virtuale in cui la molecola-stampo sarà un derivato della fenilalanina (dansil-l-fenilalanina), i monomeri funzionali saranno l'acido metacrilico (MAA) e la 2-vinilpiridina (2VP), il reticolante sarà l'etilen glicole dimetacrilato (EGDMA), l'agente porogeno sarà l'acetonitrile, l'iniziatore sarà l'azobis-isobutirronitrile (AIBN) e l'innescò della polimerizzazione sarà termo-indotto ad una

temperatura di 60°C.

Nel primo passaggio, la molecola-stampo viene disciolta nel porogeno (acetonitrile) insieme ai due monomeri funzionali.

Le molecole dell'acido metacrilico e della vinilpiridina formano in soluzione interazioni, complessi di pre-arrangiamento, con la molecola-stampo. Il numero e la qualità delle interazioni sono controllati dalle specifiche funzionalità mantenute dalla molecola-stampo e dai monomeri funzionali. In questo caso in particolare, si possono andare a formare potenziali legami ionici tra il gruppo carbossilico della molecola-stampo e l'anello piridinico ed anche tra il gruppo naftilaminico della molecola-stampo ed i gruppi carbossilati dell'acido metacrilico. Inoltre si possono formare altri legami a idrogeno tra i monomeri dell'acido metacrilico ed il gruppo solfonamidico della molecola-stampo.

Nello stadio successivo viene aggiunta una notevole quantità di monomero reticolante (EGDMA) insieme con l'iniziatore (AIBN).

Dal momento che la polimerizzazione di radicali liberi (radicalica) viene inibita dalla presenza di ossigeno, la soluzione, di norma, viene in questa fase trattata in corrente d'azoto.

La polimerizzazione viene successivamente iniziata portando la temperatura a 60°C, dando così luogo all'inizio della scissione omolitica dell'AIBN ad azoto e radicali isobutirronitrile.

Tale formazione radicalica quindi dà inizio alla polimerizzazione dei monomeri funzionali e del reticolante, evento che condurrà alla formazione di un polimero rigido.

Il polimero a memoria molecolare così costruito sarà sottoposto a diverse procedure, a seconda dell'applicazione a cui esso è destinato.

Se il polimero è stato costruito sotto forma di un monolito rigido, normalmente si procede ad una frammentazione del monolito stesso il quale, in seguito a passaggi di frantumazione e di setacciatura, sarà ridotto in particelle aventi la dimensione media di 10-25 µm.

Prima che il polimero a memoria molecolare possa essere adoperato per studi di rebinding, rimane da compiere un passaggio di estrema rilevanza, ovvero l'estrazione della molecola-stampo originaria della matrice polimerica. A tale proposito sono stati sviluppati numerosi protocolli di estrazione per le differenti procedure di imprinting.

Nella fattispecie del caso qui riportato come esempio, risulterebbe efficace lavare il polimero con un gran volume di metanolo contenente trietilamina o acido acetico.

Infine, dopo averlo fatto asciugare, il polimero a memoria molecolare sarà pronto per essere utilizzato.

Il risultato di tale procedura è l'ottenimento di una matrice artificiale dotata di capacità di legame selettiva per la molecola-stampo adoperata nella costruzione del polimero a memoria molecolare.

Valutazione della selettività di un MIP

Prima di essere impiegato in esperimenti di MISPE, un MIP è solitamente testato nelle sue proprietà di riconoscimento nei confronti di uno specifico analita.

La valutazione di tipo cromatografico insieme ad esperimenti sulla capacità di legame specifico rappresentano oggi i metodi più comunemente usati per determinare la selettività di materiali a memoria molecolare. La valutazione mediante cromatografia permette misurazioni dei fattori di capacità (K') e dei fattori di imprinting (IF) dei MIPs. Tali valori si deducono dal tempo di ritenzione della molecola-stampo in una colonna cromatografica impaccata con il MIP ed una seconda colonna contenente il NIP. Se il MIP è dotato di memoria molecolare, allora l'analita dovrebbe essere trattenuto più tenacemente nella colonna contenente il MIP che in quella contenente il NIP, a causa delle interazioni selettive che si instaurano tra la matrice polimerica e l'analita.

In alcuni studi la selettività del MIP è stata anche provata usando composti strutturalmente analoghi alla molecola del template. Se il MIP tratterrà questi composti con efficacia paragonabile o addirittura migliore rispetto al template, tale evento indicherà che il MIP è dotato di reattività crociata.

Per quanto riguarda gli esperimenti sugli equilibri di legame, una quantità nota di template in soluzione viene aggiunta ad una provetta contenente una data aliquota di polimero.

Una volta che il sistema raggiunge l'equilibrio, la concentrazione di template libero in soluzione viene misurata e si calcola quindi la quantità di template adsorbito dal MIP.

Alcuni di questi esperimenti si basano sul legame di radio-ligandi, metodo questo altamente sensibile per lo studio di gruppi di siti di legame aventi caratteristiche di

interazione più forti.

Nel caso della metodica ora citata, comunemente il campione viene incubato con il radio-ligando per molte ore e per far sedimentare le particelle di polimero si effettua un passaggio di centrifugazione. Viene quindi misurata la radioattività nella soluzione supernatante.

Applicazioni dei polimeri a memoria molecolare

In aggiunta agli studi in cui la natura degli eventi di riconoscimento di per sé ha costituito l'obiettivo principale, oggi sono state individuate numerose aree di applicazione per matrici a memoria molecolare, come quella della separazione e dell'isolamento (separazioni chirali, separazioni substrato-selettive), quella che prevede l'impiego di polimeri a memoria molecolare come anticorpi e recettori artificiali in analisi di tipo immunologico (saggi di legame con ligandi competitivi, applicazioni diagnostiche), l'applicazione di MIPs come enzimi artificiali in processi catalitici e l'utilizzo di matrici polimeriche a memoria molecolare come biosensori in modelli biologici artificiali.

Materiali polimerici a memoria nel campo delle separazioni: imprinting molecolare per la cromatografia (MIC)

La prima area di applicazione dei MIPs è stata la cromatografia. Il *molecular imprinting* è una tecnica che si adatta molto bene alle separazioni permettendo la preparazione di supporti fatti su misura dotati di una certa specificità. Di particolare interesse sono le separazioni chirali in cui l'ordine di eluizione dipende dall'enantiomero che si è utilizzato per la costruzione del polimero. Con le colonne classiche infatti la separazione dipende da scambi ionici e esclusione molecolare, per cui gli enantiomeri avrebbero lo stesso tempo di ritenzione. Le tradizionali fasi stazionarie chirali commerciali (CSPs) utilizzano composti chirali immobilizzati (da piccole molecole organiche a proteine intere) che formano complessi diastereomerici con l'analita da separare, ma con questa tecnica generalmente è necessario un range di CSPs per trovare il sistema adatto alla specifica separazione e le molecole biologiche che vengono usate hanno una stabilità

chimica, termica e meccanica significativamente minore dei MIPs. Ci sono oggi più di 500 molecole di interesse farmaceutico otticamente attive e la risoluzione delle soluzioni racemiche è una delle principali possibili applicazioni. Il primo MIP in questo campo fu realizzato per il Timolol (Fischer et al., 1991), inibitore dei recettori α -adrenergici, seguito dal Naproxen (Kempe and Mosbach, 1994), agente antinfiammatorio non steroideo e dall'efedrina, agonista adrenergico, (Ramström et al., 1996). Altri polimeri per separazioni chirali sono stati preparati per analiti importanti nella diagnostica medica e nei processi biotecnologici: aminoacidi, derivati di amminoacidi e peptidi, (Kempe and Mosbach, 1995), carboidrati (Mayes et al., 1994; Nilsson et al., 1995; Wulff and Haarer, 1991) e ormoni (Andersson et al., 1995). E' stata verificata la possibilità di sfruttare la tecnologia dell'imprinting molecolare per estrazioni in fase solida per la purificazione di estratti. Nella prima applicazione in questo settore sono stati prodotti MIP specifici per atrazina da utilizzare su estratti di fegato di bue (Muldoon and Stanker, 1997). Questo tipo di sistema, ovvero "Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction" (MISPE), permette così di separare analiti da campioni biologicamente complessi e potrebbe offrire una valida alternativa nelle fasi di pretrattamento per composti lipofili. Oltre alle tradizionali colonne cromatografiche sono stati sviluppati con i MIPs altri sistemi di separazione come la cromatografia a strato sottile (L-phenilalanina anilide, Kriz et al., 1994) e l'elettroforesi capillare (Nilsson et al., 1994). Una delle applicazioni in questo senso è stata la polimerizzazione con la pentamidina (un farmaco usato nel trattamento delle affezioni AIDS correlate, presente in concentrazioni fisiologiche nelle urine) quale molecola stampo (Sellergren, 1994).

Tra le varie applicazioni che interessano questo particolare tipo di matrici polimeriche, l'imprinting molecolare per la cromatografia rappresenta certamente il campo studiato in maniera più estesa ed approfondita, anche perché scienziati sono riusciti a portare a termine con successo numerose separazioni anche molto complesse, ma altrettanto interessanti per lo sviluppo della metodologia in questione.

Le separazioni condotte con l'ausilio di questa tecnica hanno dato ottimi risultati sia in termini di isolamento che di resa complessiva.

Si può quindi affermare con certezza che la tecnica dell'imprinting molecolare è altamente indicata per la separazione, permettendo la preparazione di supporti creati su

misura, dotati di selettività predeterminata. Di particolare interesse in questo settore è la separazione chirale. Avvalendosi dei protocolli sull'imprinting mediante auto-assemblaggio, possono essere prodotte fasi chiralmente selettive altamente efficienti.

Caratteristico di questi materiali è l'ordine di eluizione degli enantiomeri, che dipende soltanto da quale forma enantiomerica è stata usata come molecola-stampo. Per fare un esempio, quando l'enantiomero "R" è usato come antigene, la forma "S" sarà eluita per prima e viceversa se l'enantiomero "S" è usato come stampo.

Alla luce delle recenti linee-guida dettate dalle autorità ufficiali in materia di preparazione e somministrazione dei farmaci, l'attenzione si sta rivolgendo a composti enantiomericamente puri e per questo motivo sono necessarie nuove ed efficienti tecniche per la enantio-separazione.

Modelli di legame artificiali di anticorpi e recettori

I modelli di legame tra anticorpi e recettori preparati con la tecnica dell'imprinting molecolare rappresentano concettualmente una affascinante alternativa rispetto ai loro analoghi naturali.

Durante gli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato che i polimeri a memoria molecolare possono servire come modelli di legame artificiali di anticorpi naturali e possono essere usati come elementi di riconoscimento in analisi di tipo immunologico.

Gli anticorpi, per la loro alta specificità e affinità, vengono largamente impiegati per realizzare saggi immunologici per scopi diagnostici in campo biomedico e negli ultimi anni per la rilevazione qualitativa e quantitativa di contaminanti in matrici di interesse ambientale.

La possibilità di preparare anticorpi (Henricksen and Martin, 1996) e recettori artificiali potrebbe rappresentare un'alternativa interessante viste le caratteristiche chimico-fisiche dei polimeri rispetto a molecole proteiche quali gli anticorpi. Sono stati portati avanti diversi progetti per verificare se i MIPs possano rappresentare una valida alternativa all'uso di anticorpi come elementi di riconoscimento negli immunosaggi.

I "molecularly imprinted sorbent assays" fino ad ora realizzati, sono saggi competitivi in cui l'analita da rilevare compete, per i siti chimicamente e stericamente specifici nel polimero, con l'analogo radioattivo (protocollo simile ai RIA). La misura della

radioattività nel supernatante sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di analita non marcato presente nel campione.

Questi saggi con sostanze adsorbenti a memoria molecolare (MIAs) sono stati progettati basandosi su protocolli di legame competitivo di radioligandi e la loro capacità di riconoscimento di strutture ad essi correlate può risultare anche inesistente, o comunque molto al di sotto rispetto alla molecola-stampo originaria. Per di più, la reattività crociata di questi polimeri a memoria molecolare può risultare simile a quelle riportate per gli anticorpi monoclonali.

La natura polimerica stessa dei MIPs fornisce inoltre numerosi vantaggi rispetto agli anticorpi naturali.

Ad esempio, la resistenza fisica e chimica dei polimeri “imprintati”, permette di sterilizzare i polimeri stessi, la loro lunga durata assicura un’alta stabilità delle proprietà di riconoscimento e i costi di produzione sono notevolmente bassi. Un altro evidente vantaggio è costituito dalla possibilità di evitare l’impiego di tanti modelli animali per la produzione di anticorpi.

Sono stati prodotti polimeri per il riconoscimento del farmaco broncodilatatore “teofillina” e del tranquillante “diazepam” (Vlatakis et al., 1993). Un saggio competitivo tipo-RIA è stato utilizzato per determinare la concentrazione di teofillina nel siero dei pazienti e i risultati ottenuti mostrano una buona correlazione con quelli avuti con i kits immunoenzimatici commerciali.

I valori di reattività crociata dei polimeri stampati con teofillina e diazepam sono inoltre molto vicini a quelli riportati per gli anticorpi monoclonali e il polimero “anti-teofillina” è risultato in grado di distinguere questa molecola dalla caffeina, che differisce per un solo gruppo metile. Altre molecole di interesse biomedico utilizzate per la polimerizzazione di MIPs sono state la morfina e il neuropeptide endogeno leu-enkefalina (Andersson et al., 1995-1996).

Negli ultimi anni si è dedicata particolare attenzione allo sviluppo di nuovi sistemi che permettano il riconoscimento qualitativo e quantitativo anche di molecole di rilevanza ambientale. Allo scopo di verificare l’utilità dei MIPs in questo settore sono stati ad esempio costruiti polimeri per la triazina (molecola base degli erbicidi s-triazinici) utilizzati in sistemi di rilevazione ottica con triazina fluorescente (Piletsky et al., 1997): il saggio è di tipo competitivo tra l’erbicida libero e lo stesso coniugato ad una molecola

fluorescente e la misura viene fatta sulla fluorescenza residua nel supernatante. Sono stati anche prodotti MIPs per il riconoscimento specifico dell'atrazina la cui presenza e concentrazione viene poi rilevata con saggi di tipo competitivo tra l'erbicida libero e l'atrazina marcata, in questi casi, radioattivamente (Muldoon and Stanker, 1995; Siemann et al., 1996). Un vantaggio nella scelta dell'uso di polimeri in sostituzione agli anticorpi o ai recettori risiede, oltre che nelle già citate proprietà chimico-fisiche, nella possibilità di ottenere, facilmente e a basso costo, polimeri specifici per molecole contro le quali sarebbe artificioso e costoso produrre anticorpi monoclonali. Esempi sono le molecole a basso peso molecolare difficilmente immunogeniche quali gli apteni, che devono essere coniugati con una proteina carrier prima dell'immunizzazione o gli antibiotici come l'eritromicina o molecole immunosoppressive come le ciclosporine (Senholdt et al., 1997).

Applicazioni catalitiche e sintetiche: MIPs come sostituti di enzimi

Una delle sfide più intriganti per quanto riguarda l'uso dei polimeri a memoria molecolare è quella del loro impiego come modelli enzimatici.

Parallelamente all'eccitante lavoro portato avanti con anticorpi catalitici (abzymes), sono stati realizzati tentativi con polimeri a memoria molecolare, di ottenere attività catalitiche esercitate da siti di riconoscimento dotati appunto di memoria molecolare. Numerose differenti strategie sono state perseguite in questo ambito.

Un'applicazione interessante è rappresentata dall'uso dei MIPs come sostituti di enzimi in reazioni catalitiche. Sono state adottate diverse metodologie che prevedono l'uso come molecole-stampo di: analoghi dello stato di transizione, analoghi di coenzimi per sviluppare un sistema con una determinata attività catalitica, composti di coordinazione per mediare la reazione catalitica e infine strategie "bait and switch" per la corretta organizzazione del gruppo catalitico nel sito.

Nel primo caso, per esempio, lo stato di transizione dell'idrolisi dell'estere carbossilico può essere mimato da derivati fosfonati (Robinson e Mosbach, 1989). E' stato preparato un polimero usando come stampo il p-nitrofenilmetilfosfonato, un analogo dello stato di transizione dell'idrolisi del p-nitrofenilacetato; si è visto in effetti che il MIP ottenuto lega preferenzialmente l'analogo dello stato di transizione inducendo anche un certo

aumento del tasso di idrolisi del p-nitrofenilacetato a p-nitrofenolo e acetato. Studi più recenti si sono concentrati sull'idrolisi di esteri di aminoacidi e sulla preparazione di polimeri enantioselettivi cataliticamente attivi (Ohkubo et al., 1995; Sellergren and Shea, 1994). Nel secondo caso Andersson and Mosbach (1989) hanno provato ad usare come stampo l'analogo del complesso coenzima-substrato N-piridossil-L-fenilalanina anilide e hanno osservato che la capacità di catalizzare la formazione dell'addotto piridossale libero e fenilalanina anilide è aumentata di otto volte rispetto al controllo. Per quanto riguarda i composti di coordinazione metallica è stato eseguito un esperimento con la classe II delle aldolasi (Matsui et al., 1996). Anche in questo caso si è avuto un incremento dell'attività catalitica. Nel caso della strategia del bait-and-switch sono state fatte alcune prove (Müller et al., 1993; Beach and Shea, 1994) con la reazione di β -eliminazione coinvolta nella deidroalogenazione dei β -fluorochetoni, un sistema già utilizzato con gli anticorpi catalitici.

L'approccio più comune in questo campo è stato comunque quello dell'utilizzo di analoghi in stato di transizione (TSAs) nel protocollo tradizionale di imprinting, stabilizzando così la reazione di transizione e incrementando nello stesso tempo il tasso di formazione del prodotto.

Particolare attenzione è stata rivolta all'idrolisi di esteri attivi, usando un acido fosfonico (TSA) come molecola-stampo.

Altre strategie per ottenere polimeri cataliticamente attivi sono: l'uso di analoghi di coenzimi per garantire un utile meccanismo catalitico predeterminato, l'uso di composti di coordinazione per la mediazione di reazioni catalitiche e l'uso di strategie mirate del tipo "Bait-and -switch" per favorire una organizzazione ottimale dei gruppi catalitici nei siti di riconoscimento.

In aggiunta alla catalisi "reale" si potrà quindi parlare di procedure di sintesi laddove polimeri a memoria molecolare siano usati per guidare la formazione del prodotto, sia direttamente che indirettamente.

MIPs come elementi di riconoscimento nei sistemi biosensori

Tra le applicazioni più interessanti e recenti sviluppate nell'ambito dell'imprinting molecolare deve essere anche menzionata quella che prevede l'uso di polimeri a

memoria molecolare come elementi di riconoscimento in modelli artificiali di biosensori.

I biosensori sono dispositivi in grado di identificare da un punto di vista qualitativo e quantitativo un determinato analita presente in un campione e sono costituiti da una componente biologica, cui è deputata la specificità, in intimo contatto con un trasduttore atto alla rilevazione ed amplificazione del segnale. L'elemento biologico che può essere un enzima, un recettore o un anticorpo, costituisce la componente sensibile in grado di riconoscere selettivamente e con alta affinità la molecola target e viene posto all'interfaccia tra il sensore e il campione contenente l'analita di interesse. L'interazione della molecola target con l'elemento biologico determina un cambiamento in uno o più parametri chimico-fisici come la produzione di ioni, elettroni, gas, calore, cambiamenti di massa o luce che il trasduttore converte in un segnale elettrico che viene poi amplificato e convertito nella forma interpretabile.

Caratteristico di questi sistemi è lo stretto contatto tra la parte deputata al riconoscimento e l'elemento trasduzionale. La possibilità di sostituire elementi di riconoscimento naturali con polimeri a memoria molecolare costituisce una serie di potenziali vantaggi simili a quelli visti con i sostituti degli anticorpi precedentemente menzionati.

Quindi si può facilmente constatare come essi siano di gran lunga più stabili e possano funzionare in ambienti difficili, rappresentando l'unica alternativa in quei casi in cui non si è riusciti ad identificare alcun elemento di riconoscimento biologico. Inoltre si può cogliere una stretta interconnessione tra funzione di riconoscimento e di trasduzione.

Pertanto, dati gli evidenti vantaggi dei polimeri a memoria molecolare rispetto ai loro analoghi naturali, i primi sembrano avere tutte le carte in regola per diventare delle ottime alternative come elementi di riconoscimento ad alta resistenza.

Le caratteristiche importanti di un biosensore sono selettività, sensibilità, stabilità e possibilità di rigenerazione. La selettività è determinata dalla componente biologica deputata al riconoscimento di una determinata molecola in una miscela contenente anche eventuali altri composti con struttura chimica simile. La sensibilità dipende sia dalla componente biologica che dal trasduttore ed essendo in relazione al rapporto segnale/rumore (S/N), ulteriori passaggi di amplificazione possono incrementare la

sensibilità e abbassare il limite della minima concentrazione rilevabile. L'uso dei MIPs come sostituti delle molecole biologiche quale elemento sensibile permette di conservare le caratteristiche di specificità e selettività essendo le cavità di questi complementari in forma e funzionalità alla molecola intorno alla quale è stato realizzato il polimero. La scelta dei MIPs come alternativa alle molecole proteiche offre molti vantaggi sia per le caratteristiche chimico-fisiche proprie di questi polimeri sia per la possibilità di usare come stampo molecole contro le quali sarebbe molto difficile e costoso produrre degli anticorpi, nonché per la semplicità della procedura e il basso costo di questa tecnica.

L'approccio che più si avvicina al concetto di biosensore (con l'elemento sensibile in prossimità del trasduttore), prevede l'uso di polimeri in forma di particelle ottenute dalla macinazione del bulk o di membrane ottenute con la tecnica del sandwich ed il cambiamento che avviene nel polimero in seguito al legame dell'analita, viene rilevato dal trasduttore. Uno dei primi lavori nello sviluppo di questi nuovi sensori rientra nell'ambito dei sensori elettrochimici capacitativi (Field Effect Capacitors): membrane polimeriche realizzate con la tecnica del sandwich, contenenti siti di riconoscimento specifici per la L-fenilalanina anilide utilizzata come molecola stampo, sono accoppiate ad un sistema di trasduzione che, misurando la variazione di capacità in funzione del voltaggio applicato, rivela il legame della molecola target sotto forma di una diminuzione della capacità, applicando lo stesso range di voltaggio (Hedborg et al., 1993). Si può pensare di applicare lo stesso tipo di procedura con trasduttori field-effect transistors ed in questo caso sono interessanti anche le dimensioni ridotte, il basso costo di fabbricazione e la possibilità di integrarli nella microelettronica. Altri tipi di trasduttori elettrochimici conduttimetrici e amperometrici sono stati accoppiati con la tecnologia dell'imprinting molecolare. È stato realizzato un sensore basato su un sistema di rilevazione conduttimetrica da Kriz (Kriz et al., 1996) per un analita carico, lo ione benzyltriphenylphosphonium: il legame dell'analita carico ai siti specificamente reattivi del polimero porta ad un significativo aumento di conducibilità opportunamente rilevato. Sempre nell'ambito dei trasduttori conduttimetrici si trova il sensore per la rilevazione di atrazina (Piletsky et al., 1995); in questo caso il legame dell'atrazina provoca una diminuzione della conducibilità. Utilizzando come trasduttore un sistema amperometrico è stato sviluppato un sensore competitivo per la misura di morfina (Kriz

and Mosbach, 1995). La procedura prevede due fasi: il legame della morfina con il polimero e successivamente il distacco da questo per l'azione competitiva della codeina elettroinattiva; si misura poi elettrochimicamente la morfina tornata in soluzione.

Nell'ambito dei sensori ottici è stato realizzato un sistema a fibre ottiche in fluorescenza basato su MIPs polimerizzati in presenza del derivato di un aminoacido marcato fluorescente (Dansyl-L-fenilalanina anilide) la cui rilevazione avviene in maniera diretta (Kriz et al., 1995). Un significativo miglioramento potrebbe venire dai polimeri che mostrano contemporaneamente riconoscimento molecolare e conduttività elettrica (Kriz et al., 1995). Un esperimento in questo senso è stato eseguito preparando polimeri specifici per il riconoscimento della morfina (MIPs). Le particelle ottenute dalla macinazione del bulk sono state saturate con monomeri di pirrolo; un successivo passaggio di ossidazione in soluzione acida del pirrolo a polipirrolo ha portato a particelle dotate di memoria per la morfina e di elettroconducibilità (M-MIP-PPy), interessanti per lo sviluppo della tecnologia dei sensori elettrochimici.

Un ulteriore metodo di rilevazione che dia una risposta immediata è rappresentato dai sensori piezoelettrici, tra i quali si annoverano gli acustici, che si basano su misure del cambiamento della frequenza di risonanza del cristallo piezoelettrico come risultato di un cambiamento di massa sulla sua superficie (Okahata et al., 1994).

In un altro tipo di approccio il trasduttore è separato dalla soluzione contenente il campione da una membrana selettivamente permeabile alla molecola stampo (Piletsky et al., 1994), la cui presenza viene rilevata con misure elettrochimiche. In questo caso l'elemento di riconoscimento non si trova in prossimità del trasduttore ed è quindi più corretto parlare di sistemi di misura più che di sensori.

MIPs e Drug Delivery

Grandi risorse umane ed economiche sono state destinate negli ultimi anni alla ricerca nel campo del rilascio dei farmaci.

Un importante obiettivo della ricerca tecnologico-farmaceutica è oggi quello di ottimizzare gli effetti dei diversi principi attivi, controllandone il loro rilascio al fine di mantenere livelli di concentrazione quanto più stabili possibile, entro i limiti terapeutici e per un tempo sufficiente alla realizzazione del loro effetto farmacologico.

Altri obiettivi dei ricercatori in questo campo sono, per esempio, quello di controllare il rilascio di un farmaco in relazione alla presenza o meno di stimoli esterni o quello di orientare il farmaco verso un sito specifico dell'organismo.

La tecnologia dell'*imprinting molecolare* può contribuire senz'altro al perseguimento di tali scopi permettendo, ad esempio, la creazione di sistemi in grado di riconoscere selettivamente particolari siti biologici, così che la forma farmaceutica agisca su uno specifico "target" o, diversamente, che il principio attivo di un farmaco venga rilasciato più lentamente e/o più costantemente; ancora si possono creare dei sistemi cosiddetti "trappola", per ottenere l'allontanamento dall'organismo di substrati come glucosio, colesterolo o altri (C. J. Allender et al., 1999).

Affinchè si arrivi ad un reale miglioramento nell'efficacia e nella sicurezza delle forme farmaceutiche, i sistemi di rilascio dei farmaci o, secondo la terminologia anglo-sassone Drug Delivery Systems (DDS), devono avere la capacità di regolare la velocità di rilascio (sistemi a rilascio ritardato o prolungato) e di favorire, qualora siano stati progettati per svolgere tale funzione, il raggiungimento selettivo di un sito specifico da parte del principio attivo del farmaco.

Caratteristiche fondamentali di un efficiente sistema di rilascio di un farmaco dovrebbero essere, ad esempio, quella di consentire la regolazione della velocità di rilascio del principio attivo dalla sua forma farmaceutica, di indirizzare lo stesso principio attivo in maniera più specifica possibile verso il suo bersaglio (per es.: organo, ghiandola, ormone, cellula o altri), di prolungare - se necessario - l'azione farmacologica, di minimizzare gli effetti tossici, di ridurre quanto più possibile il numero delle somministrazioni e di migliorare quindi la *compliance* del paziente.

Il campo del Drug Delivery è oggi uno di quelli più prolifici in termini di produzione scientifica e conseguimento di nuovi risultati (M. J. Rathbone et al., 2003). In questo ambito, la progettazione e lo sviluppo di nuovi DDS è elemento focale per numerosissimi gruppi di ricerca in tutto il mondo. Una delle ragioni prevalenti di questa situazione consiste nel fatto che gli studi e le ricerche su nuovi farmaci sono tra i più costosi, per cui è preferibile rendere sempre migliore l'azione dei farmaci già a disposizione, piuttosto che cercare nuove molecole farmacologicamente attive. Il principio-guida di tale strategia di ricerca risiede nell'obiettivo di veicolare il farmaco verso il suo sito "target", evitando possibilmente ogni zona dell'organismo che non sia

direttamente interessata all'azione farmacologica e inoltre di mantenere il più a lungo possibile la concentrazione del principio attivo all'interno della finestra terapeutica. Fino ad oggi, alcuni approcci tecnologici in materia di controllo del rilascio dei farmaci (Y. W. Chien and S. Lin, 2002) sono, per esempio, il "Rate-programmed Drug Delivery", in cui il rilascio del farmaco deve seguire un profilo specifico di velocità; "Activation-modulated Drug Delivery", dove il rilascio è attivato da un processo fisico, chimico o biochimico; "Feedback-regulated Drug Delivery", in cui la velocità di rilascio è regolata dalla concentrazione del farmaco nell'organismo.

Oggi si ritiene che i polimeri a memoria molecolare possano trovare impiego nel rilascio controllato dei farmaci, possano essere in grado di riconoscere un particolare sito biologico (targeting) o funzionare come trappole molecolari per allontanare dall'organismo sostanze indesiderate.

Di grande interesse è oggi la capacità che i materiali a memoria molecolare mostrano nel mimare il funzionamento dei recettori biologici o nel riconoscere in maniera altamente specifica farmaci o sostanze d'abuso nei fluidi biologici (O. Ramstrom and R. Ansell, 1998). Tale grado di specificità è paragonabile a quello degli anticorpi monoclonali utilizzati nelle tecniche di dosaggio immunologico (K. Mosbach and O. Ramstrom, 1996).

Oggi sono numerosi i contributi scientifici che dimostrano come l'impiego di polimeri a memoria molecolare possa risultare di fondamentale importanza nel rilascio controllato dei farmaci; ciononostante, rimangono ancora da risolvere alcuni problemi, per cui fino ad oggi i Drug Delivery Systems basati su polimeri a memoria molecolare non hanno trovato alcuna applicazione in campo tecnologico-farmaceutico.

Non si può comunque, anche alla luce dei risultati finora ottenuti, non considerare le ottime potenzialità dei materiali a memoria molecolare nel campo del rilascio controllato dei farmaci (C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, 2004).

Polimeri a memoria molecolare ed estrazione in fase solida

Un'altra importante applicazione dei MIPs è quella che prevede il loro utilizzo come matrici per estrazioni in fase solida (SPE).

La metodica che vede accoppiati SPE e *molecular imprinting* è denominata

“Molecularly imprinted solid-phase extraction” (MISPE).

Se si prende in considerazione la procedura classica prevista per l'estrazione in fase solida, si dovrà effettuare il caricamento dell'analita in una colonna per SPE (solid-phase extraction), nella quale esso interagirà con la fase stazionaria e a quest'ultima si legherà.

La fase solida sarà quindi lavata con uno o più solventi al fine di rimuovere le impurità e successivamente l'analita sarà lasciato eluire attraverso la fase solida per essere analizzato avvalendosi dell'HPLC o di altre metodiche.

Ciononostante, a causa di interazioni aspecifiche, capita di frequente che alcuni agenti contaminanti vengano co-estratti e di conseguenza eluiti. Con lo scopo di aggirare questo problema si è cercato sempre più di far sì che i polimeri a memoria molecolare siano in grado di interagire in maniera altamente selettiva, riducendo così la presenza di impurezze nell'eluato. Come è stato detto a proposito di altre applicazioni, anche in questo caso tale tipologia di polimeri risulta estremamente stabile, economica nella realizzazione e veloce per quanto riguarda i tempi di preparazione.

Il primo lavoro prodotto con la metodica MISPE (Sellergren et al., 1994), illustrava la possibilità di concentrare la pentamidina da un campione di urina contaminata.

Successivamente a questa pubblicazione, numerosi gruppi di ricerca hanno presentato studi su differenti tipologie di analiti. Tra questi, usati come molecole-stampo, ricordiamo l'atrazina (P. Martin et al., 1997), il propranololo (W.M. Mullett et al., 1998) e la sameridina (K. Haupt et al., 1998).

Il principale vantaggio ottenuto grazie all'utilizzo dei MIPs nell'estrazione in fase solida è costituito dall'alta selettività della fase adsorbente, fattore quest'ultimo che garantisce un lavaggio del campione più efficace.

Lo svantaggio è invece rappresentato dall'eventualità che, durante la fase di *imprinting* e nella successiva di lavaggio, rimangano nel polimero tracce della molecola di template (stampo) e vengano pertanto eluite nel corso dell'estrazione in fase solida, falsando così i dati quantitativi (L. I. Andersson et al., 1997).

Una possibile risoluzione di questo problema potrebbe consistere nell'impiego di analoghi strutturali dell'analita come molecole-stampo.

Protocollo della metodologia “MISPE” (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction)

La metodica MISPE, di cui qui di seguito si descriveranno nei dettagli le fasi operative, prevede l'utilizzo di una tecnica di estrazione (Solid Phase Extraction), accoppiata ad un sistema che permette la costruzione e l'utilizzo di siti di riconoscimento molecolare artificiali, altamente selettivi e caratterizzati da una grande versatilità (Molecular Imprinting).

Essa consta di diverse fasi che vanno dalla sintesi del polimero a memoria molecolare, il quale deve essere ridotto in particelle dell'ordine dei micrometri perché queste possano essere utilizzate per il riempimento delle colonne per estrazione in fase solida, all'analisi dell'eluato concentrato, ottenuto in seguito all'estrazione, mediante HPLC.

Qui di seguito, come detto sopra, saranno descritte nei dettagli tutte le fasi necessarie per lo sviluppo della metodologia in questione.

Il primo obiettivo da realizzare è quello della sintesi di un polimero dotato di memoria molecolare.

Per la “costruzione” di tale polimero sono indispensabili i seguenti composti e solventi:

- a) molecola-stampo (templante);
- b) monomero/i funzionale/i (acido metacrilico, 4-vinilpiridina, altri);
- c) reticolante (per esempio etilen-glicole di metacrilato, ovvero EGDMA);
- d) solvente di polimerizzazione (cloroformio, acetonitrile, altri);
- e) iniziatore di polimerizzazione radicalica (per esempio 2,2'-azo-bis-isobutyrylnitrile, ovvero AIBN).

I rapporti stechiometrici relativi alla molecola-stampo, al monomero funzionale ed all'agente reticolante sono generalmente:

- | | |
|------------------------|-----|
| a) templante | 1; |
| b) monomero funzionale | 4; |
| c) reticolante | 20. |

La sintesi del polimero viene condotta secondo il metodo della polimerizzazione in “bulk” (Caro et al., 2002).

Il tipo di approccio più versatile dal punto di vista della reversibilità dei legami tra il polimero a memoria molecolare (MIP) e il substrato da riconoscere è quello

dell'imprinting “non covalente” il quale, rispetto al metodo “covalente”, ha delle cinetiche di reazione più veloci; quest'ultimo infatti comporta cinetiche lente per via dei tempi più lunghi necessari per la rottura e la ri-formazione dei legami covalenti.

La soluzione composta da templante, monomero/i funzionale/i, reticolante, iniziatore e solvente di polimerizzazione viene sottoposta a corrente d'azoto, quindi fatta sonicare per dieci minuti. In seguito viene incubata in atmosfera d'azoto a 68°C per 24 ore.

Il risultante grossolano polimero rigido viene macinato fino a diventare polvere, quindi setacciato in un setaccio d'acciaio inossidabile con maglie di dimensioni di 63 micron.

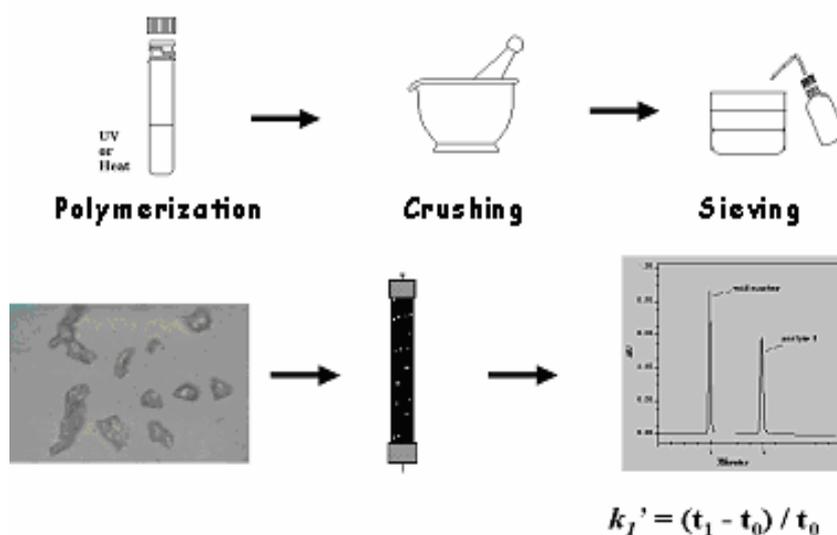


Figura 8. Fasi di preparazione del polimero per la colonna MISPE

Il materiale polimerico così ottenuto viene raccolto e le particelle sotto forma di polvere sono sottoposte ad alcune sospensioni in acetone; la soluzione supernatante (contenente le particelle più piccole) viene scartata.

I microgranuli di polimero sono subito dopo sottoposti ad estrazione “Soxhlet” con 200 ml. di una soluzione acido acetico:metanolo (1:1) per circa 48 ore e successivamente ad una ulteriore estrazione con 200 ml. di metanolo per altre 48 ore.

Uno schema riassuntivo riguardante le principali fasi di costruzione del polimero a memoria molecolare da utilizzare per l'estrazione in fase solida è fornito in figura 8.

Il materiale polimerico estratto viene lasciato a seccare in un forno alla temperatura di 60°C per tutta la notte.

La polvere del MIP (Molecularly Imprinted Polymer) così trattata si analizza mediante HPLC per assicurarsi che questa sia libera da composti indesiderati.

Solitamente, per questo tipo di analisi, si è soliti sintetizzare un secondo polimero da utilizzare come “controllo”, che serva cioè come standard di riferimento per confrontare il comportamento di un polimero dotato di memoria molecolare per un dato substrato, con quello di un polimero privo di tale memoria.

Tale polimero “bianco”, chiamato NIP (Non Imprinted Polymer), si prepara seguendo la medesima procedura ed utilizzando i medesimi composti, solventi, concentrazioni, volumi, rispetto alla sintesi del MIP, tranne che per il “controllo” (NIP) non viene aggiunta alla soluzione contenente tutti i componenti della polimerizzazione la molecola del template.

La seconda fase della metodica MISPE è rappresentata dalla preparazione delle colonne per estrazione in fase solida (SPE).

Per cominciare, una aliquota di 500 mg. di particelle di polimero portate a secchezza, deve essere impaccata in una colonna da SPE in polipropilene da 6.0 ml (figura 9).

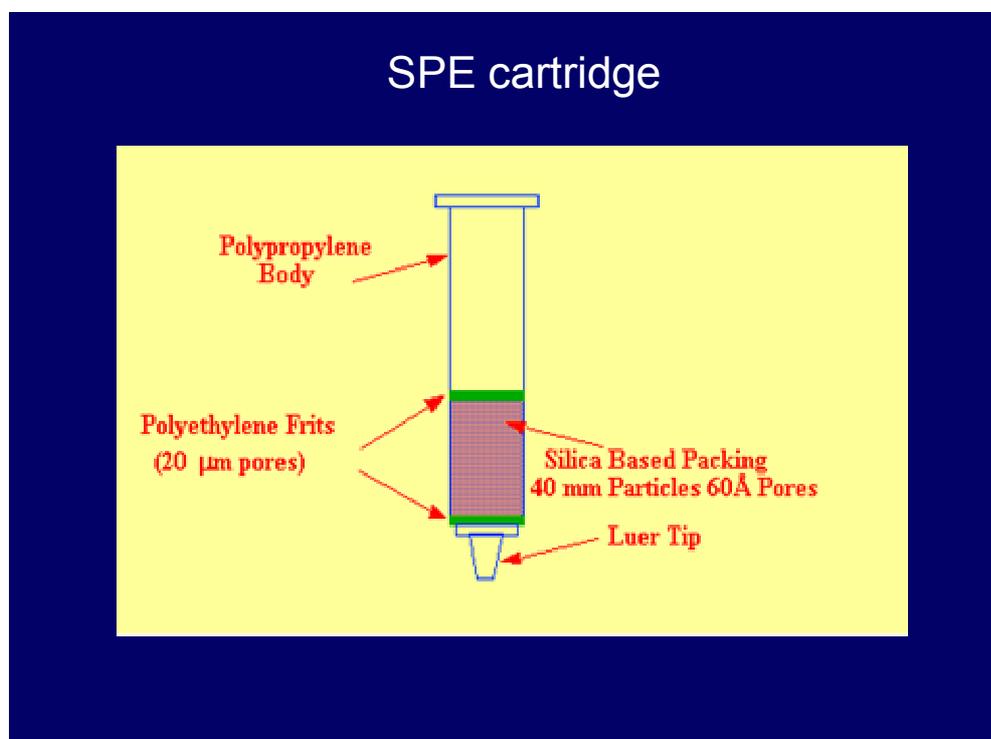


Figura 9

All'interno di tale colonna vengono applicati due filtri in polietilene, di cui uno all'estremità superiore e l'altro a quella inferiore; essa viene a questo punto collegata all'estrattore in fase solida (figura 10) attraverso una valvola.

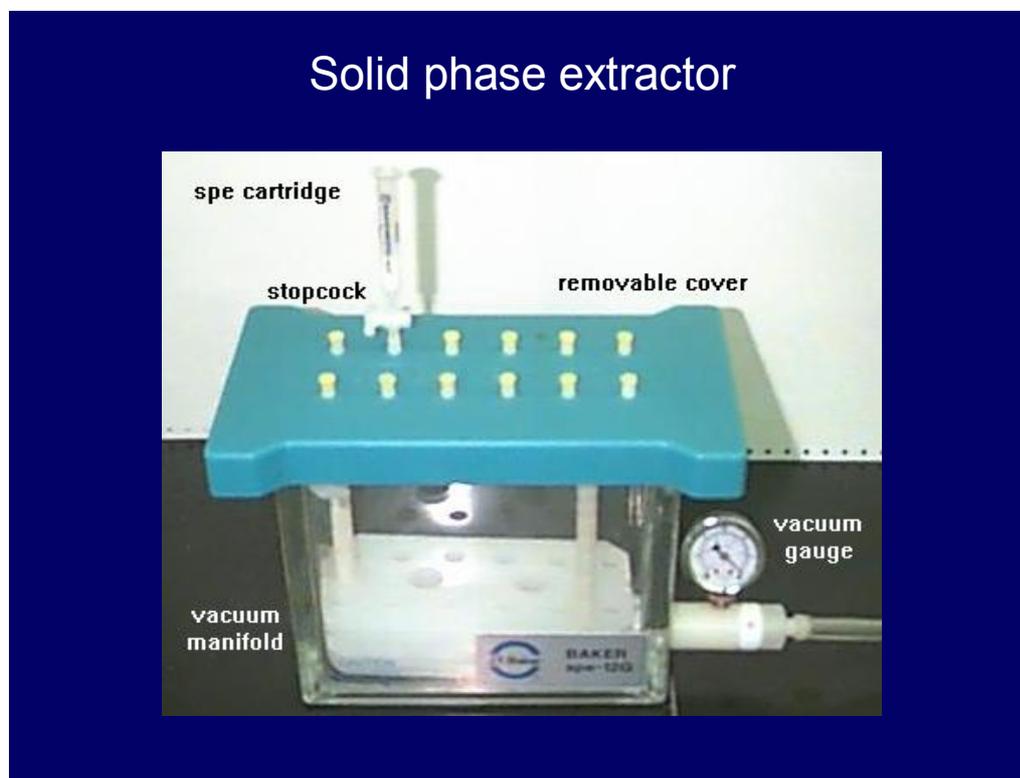


Figura 10

Il polimero, ora impaccato nella colonna SPE, viene sottoposto ad un primo lavaggio con metanolo e ad un successivo con cloroformio (ove necessario tali lavaggi, precedenti la fase di condizionamento, possono essere effettuati con solventi diversi e per più volte).

La colonna contenente il MIP, dopo essere stata portata a secco, viene sottoposta a condizionamento con un volume noto di acetonitrile (o con un solvente diverso adeguato al caso) e successivamente caricata (figura 11) con un opportuno volume di una soluzione standard, a molarità nota, costituita dal template disciolto in un adatto solvente.

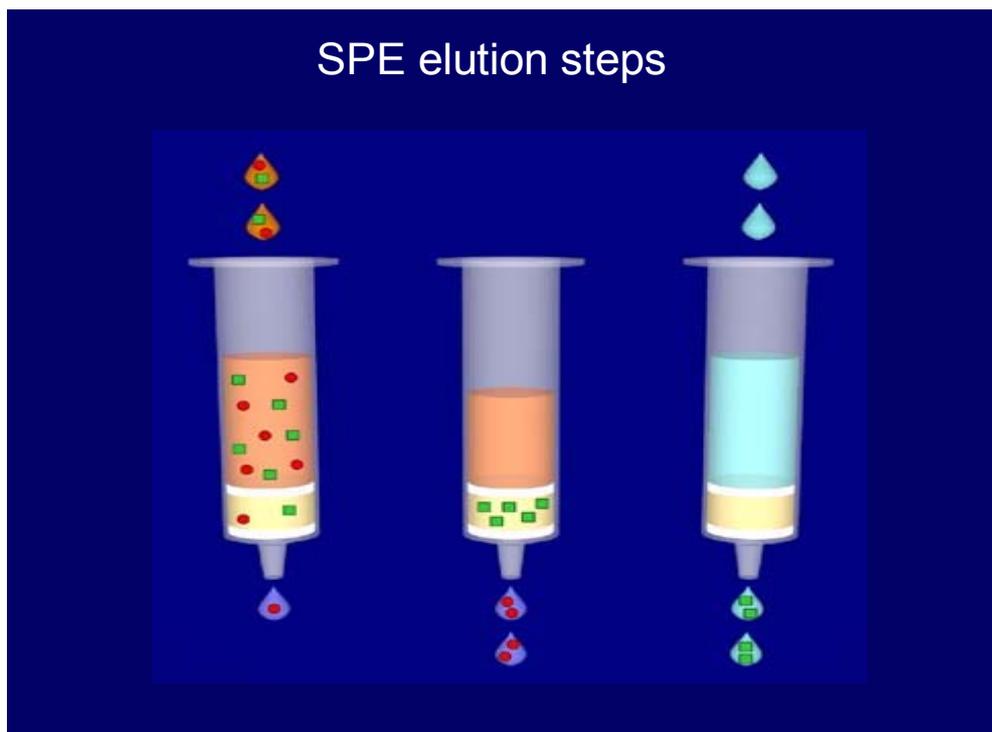


Figura 11

È importante che l'ammontare complessivo dell'analita caricato nella colonna sia sempre noto ed uguale per tutti i campioni.

Dopo aver fatto asciugare la colonna è necessario effettuare altri lavaggi (o, se si ritiene sufficiente, anche un solo lavaggio) con opportuni solventi (per esempio esano, metanolo ed acido acetico, altri) per poter portare a termine la completa estrazione dell'analita.

La procedura SPE risulta molto efficace per la concentrazione del composto-substrato; l'eluato concentrato è a questo punto pronto per essere analizzato.

Si passa quindi al terzo stadio della procedura in questione, ovvero quello relativo all'analisi mediante HPLC delle aliquote di eluato.

Si va così a valutare la capacità delle colonne MISPE (riempite rispettivamente col polimero a memoria molecolare e col polimero di controllo) di trattenere selettivamente il substrato-templante.

Per poter verificare il funzionamento delle colonne MISPE, si mettono a confronto le frazioni di eluato della colonna contenente il MIP e di quella contenente il NIP, analizzandole con HPLC e confrontando le aree dei relativi cromatogrammi.

Proprio dai cromatogrammi si avrà infatti la conferma o la smentita dell'”effetto-imprinting” delle colonne progettate e realizzate secondo la metodica proposta.

Caratteristiche dei MIPs

Oltre alle ovvie e già illustrate proprietà di riconoscimento dei polimeri a memoria molecolare, risultano molto interessanti le loro caratteristiche fisiche e chimiche.

Questi materiali hanno dimostrato di avere un'alta resistenza fisica e chimica nei confronti di diversi agenti degradanti esterni.

Inoltre, i polimeri a memoria molecolare sono notevolmente resistenti allo stress meccanico, ad elevate temperature ed alte pressioni, resistenti ai trattamenti con acidi, basi o ioni metallici e stabili in un gran numero di solventi.

I tempi di conservazione dei polimeri sono anche molto alti: la conservazione, anche per molti anni, a temperatura ambiente, sembra non determinare alcuna diminuzione delle loro rese.

I polimeri possono inoltre essere utilizzati ripetutamente, anche oltre cento volte in lassi di tempo di anni, senza che perdano il loro effetto-memoria.

Se confrontati con i siti di riconoscimento naturali dei diversi sistemi biologici, costituiti spesso da proteine, si nota come tali caratteristiche possono rivelarsi estremamente vantaggiose.

Prospettive sul futuro del *Molecular Imprinting*

L'idea di utilizzare i MIPs come elemento di riconoscimento per lo sviluppo di nuovi sensori, ha stimolato molti gruppi di ricerca ed è l'obiettivo intorno al quale è stato concepito il progetto europeo MIMICS (Molecularly Imprinted Materials for Integrated Chemical Sensors), al quale partecipano centri e istituti di ricerca di chiara e riconosciuta fama tecnico-scientifica a livello internazionale, non solo in questo settore. Al fine di realizzare un sensore chimico innovativo per misure “real time” sono stati prodotti, con la tecnologia dei *Molecularly Imprinted Materials*, polimeri, in forma di bulk, specifici per determinati analiti di interesse ambientale. Per la realizzazione del prototipo finale sono attualmente in corso attività di ricerca finalizzate allo sviluppo di

un metodo per la produzione di MIPs sotto forma di film sottili.

Moltissime risorse sono oggi destinate a migliorare le metodologie che prevedono l'uso dei MIPs in acqua, fino a questo momento l'ambiente più difficile per il loro funzionamento; è facilmente comprensibile come il raggiungimento di questo traguardo potrebbe rappresentare una crescita esponenziale delle possibilità di utilizzo di materiali a memoria molecolare, mettendo questi ultimi a servizio dell'ambiente e dell'uomo stesso, ad esempio per il monitoraggio e la rimozione di sostanze inquinanti nel primo e per l'identificazione di sostanze d'abuso nel secondo. In entrambi i settori, comunque, le possibilità di impiego non si limitano di certo a queste qui citate come esempi, ma si capisce che potrebbero essere innumerevoli, date le caratteristiche di adattabilità di questi materiali e la relativa semplicità della loro realizzazione.

Oltre alle applicazioni dei polimeri a memoria molecolare che ormai già da anni si conoscono e si sperimentano con incoraggianti risultati, di cui si è cercato di dare fin qui un quadro esaustivo di carattere generale, risulta ormai fin troppo evidente che tantissimi altri sono i campi in cui i MIPs sono potenzialmente impiegabili, per tutti i vantaggi che il loro uso comporta tra cui, forse i più importanti, la loro estrema versatilità e i minimi costi che la loro produzione comporta.

Capitolo II

“Ambiente e strategie per l'identificazione di sostanze di rilevanza tossicologica”

La crisi del rapporto uomo/ambiente

L'uomo ha inseguito per lungo tempo il mito di un progresso illimitato, convinto dell'inesauribilità delle risorse o della possibilità di uno sconfinamento dei limiti nella utilizzazione delle potenzialità naturali mediante le crescenti conoscenze scientifiche e tecnologiche.

Oggi questo convincimento è stato messo in discussione.

Negli ultimi decenni l'avvertita possibilità di una catastrofe ecologica, ha costretto l'opinione pubblica a prendere coscienza dell'errato comportamento umano nei riguardi dell'ambiente e della necessità di una saggia gestione ambientale. È maturata la consapevolezza dell'impossibilità di uno sviluppo costante della società in un contesto di risorse esauribili e non rinnovabili e della conseguente urgenza di adeguare i consumi ai vincoli costituiti dalle leggi empiriche che regolano l'equilibrio ambientale del pianeta, eliminando sprechi inutili e usi inefficienti (Nebbia G., 2000).

La determinazione delle modalità e dei problemi legati all'uso razionale e responsabile delle risorse naturali è stata posta, in questi ultimi anni, al centro di molti dibattiti politici ed economici. C'è però da osservare che la salvaguardia dell'ambiente non è soltanto una problematica di ordine politico ed economico; ancor prima essa costituisce una problematica di tipo morale. Infatti la crisi ecologica richiede una riflessione preventiva sul ruolo e sul valore della realtà fisica in una prospettiva di etica ambientale. Ponendosi in tale ottica, numerosi studiosi si sono impegnati in un dibattito filosofico incentrato sulla necessità di rinnovare radicalmente il rapporto uomo-ambiente e basato altresì sui quesiti morali che questa interazione solleva. In particolare il dibattito riguarda interrogativi quali l'esistenza di vincoli morali o responsabilità nei confronti dell'ambiente indipendentemente dai doveri verso gli altri uomini. L'etica ambientale riflette principalmente sull'esigenza di una estensione della sfera morale oltre i tradizionali confini delle relazioni tra esseri umani; essa pone in discussione anche il sistema di valori e le credenze che hanno orientato l'azione fino ad ora.

Non è sufficiente riconsiderare le modalità di sfruttamento delle risorse nello sforzo di eliminare gli sprechi e gli usi inefficienti.

È al contempo importante considerare che la ricchezza della natura va al di là del suo semplice valore economico. Inoltre un reale cambiamento di atteggiamento non può scaturire unicamente dal crescente sentimento di paura delle conseguenze di una scorretta azione sull'ambiente (Porco S., 2005).

È estremamente importante per l'uomo rivedere la sua attuale concezione del mondo e soprattutto il ruolo che gli compete in tale ambito: è necessario che la considerazione di interrogativi morali connessi alla relazione uomo-natura trovi uno spazio adeguato nel dibattito sull'ambiente.

Verso lo Sviluppo Sostenibile

Non c'è alcuna differenza, ma al contrario una stretta interdipendenza, tra gli obiettivi della politica dello sviluppo ed un'appropriata tutela ambientale; entrambe devono essere progettate per migliorare la qualità della vita. I costi per la conservazione dell'ambiente influenzano il sistema economico in quanto l'ambiente è fonte di risorse naturali necessarie allo svolgimento del processo economico; queste risorse comportano un problema economico di sfruttamento eccessivo quando si supera il limite delle capacità naturali di rigenerazione, con effetti irreversibili sull'ambiente e con costi sociali rilevanti. I danni ambientali si presentano come rischi correlati, poiché gli effetti del degrado incidono simultaneamente su più persone e il più delle volte in maniera non tangibile o dopo un lungo periodo di tempo; quanto più sono alti i danni ambientali irreversibili, tanto minori sono le possibilità di uno sviluppo futuro con limitate opportunità per le generazioni successive (Alfieri L. M., 1995).

In particolare i sistemi economici incidono sull'ambiente nella misura in cui ne utilizzano risorse, producono materiali di scarto che vengono ricevuti dall'ambiente, cambiano le funzioni estetiche dell'ambiente naturale e modificano i sistemi globali di regolazione del mantenimento della vita da cui tutti dipendiamo (Frey M., 1995).

Sempre più economisti e scienziati di tutto il mondo sostengono che occorre perseguire l'obiettivo di uno "sviluppo sostenibile" con riconversione ecologica dell'economia. Gradualmente il dibattito politico e culturale sull'emergenza ambientale ha assunto

dimensioni globali e fin dal 1972 il rapporto del M.I.T. (Massachusetts Institute of Technology) sui "limiti dello sviluppo", ha espresso timori in merito al degrado ambientale della terra.

Questo rapporto costituisce una vera pietra miliare nell'evoluzione delle istanze ambientaliste; accanto al problema dell'inquinamento, che fino ad allora aveva costituito la preoccupazione principale, come del resto aveva dimostrato la Conferenza di Stoccolma del 1972, si afferma la questione del depauperamento delle risorse del pianeta, la cui rilevanza sarà poi enormemente amplificata dalla crisi petrolifera del 1973. Per una corretta comprensione dei complessi rapporti fra ambiente ed economia, viene criticato il concetto dell'identificazione dello sviluppo con le prospettive di una mera crescita economica nel solo aspetto quantitativo, senza considerare le implicazioni in termini di qualità della vita dei processi di produzione e di consumo. In tal modo, viene posta in primo piano la tesi di uno sviluppo più armonico e equilibrato che privilegi il carattere della sostenibilità. Il rapporto del M.I.T. è stato largamente criticato per le sue fosche e irrealizzate previsioni, basate su un'extrapolazione lineare di tendenze, sottovalutando gli effetti potenziali del cambiamento tecnologico, della sostituzione di nuove risorse e dei meccanismi dei prezzi. Esso ha avuto comunque il grande merito di aver attirato l'attenzione su problemi tuttora irrisolti, dando risonanza internazionale alla questione dell'esistenza dei limiti alla crescita e della necessità di uno sviluppo sostenibile.

Fattori limitanti la qualità della vita umana

L'ambiente, secondo la definizione data dal Consiglio delle Comunità Europee nel 1973, è "l'insieme degli elementi che, nella complessità delle loro relazioni, costituiscono il quadro, l'habitat e le condizioni di vita dell'uomo, quali sono in realtà o quali sono percepiti".

Come per tutti gli organismi viventi, l'uomo ha un suo "range" e un suo optimum di condizioni ambientali favorevoli, ma a causa della sua evoluzione culturale e dell'enorme sviluppo delle sue attività cerebrali, a differenza di ogni altro animale presenta, oltre appunto alle sue esigenze primarie (sostanzialmente esigenze di cibo, spazio e habitat), anche esigenze secondarie di carattere culturale (abiti sofisticati,

abitazioni sempre più confortevoli, automobili e tanto altro) che lo aiutino ad appagare le esigenze stimolate dalle sue speculazioni mentali.

Così, oltre al fabbisogno di energia basale (energia contenuta nel cibo in grado di fornire all'incirca 2000-3000 kcal/giorno), l'homo sapiens dell'era tecnologica richiede una quantità di energia e di materiali centinaia di volte superiori alle sue esigenze primarie.

In questi termini appare chiaro che, per soddisfare tali esigenze, la quantità di energia disponibile può a buon diritto dirsi un fattore limitante la qualità della vita (Frey M., 1995).

Nel tentare di compilare un elenco di questi fattori dobbiamo però riconoscere un ordine di priorità dovuto al grado di essenzialità di alcune di queste esigenze: ancora prima di parlare di qualità, esistono ambiti prioritari ove è proprio la quantità vitale che manca.

Prima di parlare della qualità della vita occorre forse fare una breve digressione sulla quantità della vita, cioè sulla durata della vita stessa. Si è infatti ormai abituati a considerare normale una durata media di vita intorno ai 70 anni, ma se ciò è possibile lo dobbiamo al progresso della scienza, della tecnica, della evoluzione politica e sociale degli ultimi 50 anni. Solo 100 anni fa infatti l'aspettativa di vita alla nascita era circa la metà di quella di oggi. Non si può oggi ritenere un eccesso l'affermare che le esigenze di qualità che compromettono l'entità fisiologica dell'uomo sono senz'altro primarie rispetto a quelle ambientali in senso più lato. Come è inoltre logico certe esigenze (in termini di bisogni), sorgono dal divario tra domanda e offerta e viene spontaneo supporre che i bisogni di qualità ambientale intervengano dopo che siano state soddisfatte esigenze minime più importanti, quali il cibo e i servizi sanitari (Frey M., 1998).

È evidente che popolazioni umane con tenore di vita molto differente subiranno l'influenza di fattori diversi le une dalle altre.

Nelle nazioni economicamente sottosviluppate costituiscono fattori limitanti la mancanza di cibo, energia, risorse, una carente igiene dei rifiuti ed escrementi umani ed animali, la quale provoca frequenti eventi epidemici.

Nelle nazioni industrializzate l'indice più grave consiste nella qualità della vita negli agglomerati urbani, i danni dell'inquinamento dell'aria, dell'acqua, dei cibi, degli ambienti di lavoro, oltre a pericoli più invisibili come i rumori di fondo delle città, le

psicosi derivanti da una vita con ritmi innaturali e le malattie gastroenteriche provocate da alimentazione disordinata.

Per contro, nei paesi più sviluppati vanno scomparendo le malattie infettive (tifo, difterite, tubercolosi, etc.) a causa di una migliore igiene nella raccolta, evacuazione e igienizzazione dei rifiuti e degli escrementi, ma sono in aumento le malattie dell'apparato respiratorio e il cancro in genere.

Altri fattori limitanti, come ad esempio la densità di popolazione e la carenza di spazio e molti altri ancora non sono estendibili a tutta la popolazione umana, ma sono semplicemente un problema di cattiva distribuzione e suddivisione tra uomini, spazio e risorse (Filho W. L., 2001).

Per quanto attiene il nostro paese, l'Europa e gli USA in genere, le problematiche più importanti riguardano l'inquinamento dell'aria, dell'acqua, del suolo, dei cibi, la qualità dell'abitato e dell'ambiente di lavoro.

Questo problema è tanto più sentito a causa del deficit di conoscenza della capacità di modificazione della qualità della vita dei paesi molto industrializzati e la corrispondente potenzialità previsionale dell'effetto di tali modifiche, deficit che va sempre più aumentando nel tempo.

Questo non significa ovviamente che sia auspicabile il blocco di ogni attività di progresso, ma solo che è necessario fare più attenzione a imporre nuove modifiche al tipo di vita e spingere verso il risanamento degli scompensi causati dalla attuale condizione (Viola F., 2002).

Conseguenze del deterioramento della ecosfera

Gli effetti dell'inquinamento possono essere distinti in effetti diretti sulla risorsa o indiretti (che ricadono su altre risorse, uomini o animali).

Tra gli effetti diretti annoveriamo la preclusione all'utilizzo di certe funzioni per cui la risorsa era utilizzata.

Gli effetti indiretti possono esercitarsi su altre risorse (danni alle strutture edili, corrosione metallica, danni ai monumenti) o su organismi viventi, uomo compreso.

I comparti abiotici inquinati come acqua, aria, suolo, sono in effetti intercomunicanti, come del resto prevedibile conoscendo i principi dei cicli biogeochimici propri

dell'ecologia classica (Odum E.P., 2000). Infatti, per il fenomeno del fall-out, dall'aria si può avere il passaggio dell'inquinamento all'acqua e al suolo tramite la pioggia e inversamente l'acqua può inquinare i suoli e anche l'aria (ad esempio se l'acqua è maleodorante o contiene solventi volatili). Il suolo inquinato a sua volta può contaminare le acque superficiali a causa delle piogge e del trasporto di inquinanti con il fenomeno del "ruscellamento"; oppure può contaminare le acque sotterranee a causa del trasporto degli inquinanti a seguito del percolamento (Butter G.C., 2000).

Gli effetti diretti sugli organismi viventi possono anche essere non immediati, rivelarsi cioè a lungo termine, ma con esito altrettanto disastroso. È questo il caso degli effetti sub-letali sulle generazioni come l'incapacità di riprodursi, effetti mutageni svantaggiosi che possono determinare la scomparsa di una specie.

Tra gli effetti indiretti sul comparto biotico, ugualmente disastrosi (e insidiosi perché difficili da prevedere), annoveriamo l'effetto immediato di mortalità.

Un caso particolare di inquinamento di primaria importanza, anche rispetto ad altri, è relativo alla qualità dei cibi. Trattasi in questo caso di inquinamento dovuto a errori o superficialità nell'uso di additivi o di tecniche industriali di manipolazione dei cibi.

Questo settore merita una grandissima attenzione perché i rischi che ne derivano sono enormemente elevati, almeno pari a quelli di inquinamento dell'aria e dell'acqua potabile, in quanto le sostanze dannose vengono ingerite in maniera continua e non saltuaria.

Strategie di controllo dell'inquinamento

Non è detto che l'unica strategia per combattere l'inquinamento sia costituita dalle tecnologie di depurazione. Per i motivi prima elencati, queste tecnologie sono di costo accettabile fino a certi livelli di depurazione, oltre i quali i costi diventano insostenibili. Vi sono inoltre molte sostanze presenti in quantità minori nell'ambiente (dette "microinquinanti"), ma di larga diffusione, caratterizzate da emissioni non puntiformi per cui difficilmente controllabili, per le quali non vi sono tecnologie di depurazione economiche e affidabili (vedi il caso dei pesticidi, detersivi, fertilizzanti, disinfettanti, solventi clorurati, etc.).

Si impone allora una strategia che l'OECD (Organization for Economic Cooperation and

Development) definisce "a barriere multiple", che interviene sui tre momenti fondamentali della vita delle sostanze e dei prodotti, ovvero:

- produzione;
- uso;
- smaltimento.

Il controllo prima della produzione (caso tipico è la limitazione al contenuto di fosforo nei detersivi o la proibizione alla produzione e all'uso del DDT) è volto ad evitare di immettere nell'ambiente sostanze di elevata dannosità il cui controllo allo smaltimento sarebbe impossibile o difficoltoso e comunque troppo oneroso.

Analoga restrizione viene adottata per la proibizione all'importazione di certe sostanze.

Uno strumento di prevenzione interessante, che entra in gioco ancora prima della produzione è costituito dalla "VIA" (Valutazione di Impatto Ambientale), procedura di valutazione che ha l'ambizione di prevedere i futuri impatti ambientali di nuove attività o modificazioni dell'uso del territorio e delle risorse.

La più efficace barriera contro l'inquinamento a livello di produzione consiste nel cosiddetto "nuovo modo di produrre" e precisamente nella riduzione dell'inquinamento in fase di produzione tramite:

- il rinnovamento, il ripensamento, la riprogettazione dei sistemi di produzione aventi per obiettivo la minimizzazione delle emissioni di inquinanti;
- la produzione di beni e prodotti di cui siano noti e previsti in fase di progettazione sistemi economici e sicuri di smaltimento, ma soprattutto elevate possibilità di riutilizzo e recupero.

La barriera relativa all'uso delle sostanze è volta ad educare gli utenti circa i rischi di uno scorretto uso o dell'abuso delle stesse.

La barriera relativa allo smaltimento passa attraverso una regolamentazione dello stesso, per consentire che ogni prodotto venga trattato e smaltito nella maniera che è più idonea viste le sue caratteristiche di pericolosità.

Una serie concatenata di standards di qualità all'emissione, nell'ambiente e nell'organismo umano, consentirà di effettuare un continuo controllo analitico, senza il quale ogni sforzo economico mirato a risolvere il problema dell'inquinamento si tradurrebbe in un enorme spreco di denaro senza alcun guadagno per l'ambiente (Calabrese E.J., 2001).

In tutte le fasi che abbiamo indicato, le azioni che l'organismo pubblico intraprende (legislazione, raccomandazioni, regolamenti, fissazione di standard, autorizzazioni, etc.) per minimizzare gli effetti degli inquinanti, non avranno alcun successo se non saranno sostenute da un attivo sistema di controllo (ispezioni, analisi, monitoraggio, penalizzazioni) che tali azioni vengano attuate. Il controllo diventa quindi uno dei supporti indispensabili a tutta la strategia.

Criteria e standard di qualità ambientale

Una moderna visione della gestione della qualità dell'ambiente esige una chiara definizione qualitativa dello stesso. È evidente che una definizione della qualità dell'ambiente globale non ha alcun senso, ma è possibile definire standards di qualità per grandi settori o comparti ambientali quali aria, acqua, alimenti, suolo agricolo.

È importante chiarire che ogni comparto può avere diversi standards di qualità in funzione dei diversi usi e che è quindi l'uso a determinare i criteri su cui si basano gli standards, nonché gli standards stessi.

Esistono ad esempio standards differenti per le acque adibite ad uso alimentare, agricolo, balneare, per l'itticoltura e per differenti usi industriali. Lo stesso dicasi per l'aria dell'ambiente esterno, degli ambienti di lavoro o di altre tipologie di ambiente.

Generalmente l'uso fisiologico umano della risorsa richiede lo standard più limitativo rispetto agli altri usi, ma esistono industrie, ad esempio quella elettronica, che richiedono standards qualitativi di aria e acqua molto più rigorosi di quelli fisiologici.

I criteri su cui si basa la definizione degli standards per un comparto o sottocomparto ambientale, relativo ad un certo uso, sono molteplici:

- studi epidemiologici sul più grande campione possibile di esposti;
- studi di laboratorio di tipo tossicologico per rilevare i rapporti dose/effetto o concentrazione/effetto a breve e lungo termine;
- definizione ed individuazione di un livello fisiologico o ecologico minimo che non provochi effetti indesiderati né in laboratorio né in studi epidemiologici;
- riferimento al livello di esposizione naturale (media e range) in ambienti non antropizzati;
- accettazione sociale dell'adozione di tale livello e delle conseguenze sociali ed

economiche che esso comporta.

L'aspetto scientifico del problema è rappresentato dall'esigenza di codificare una metodologia standardizzata per singoli sottocomparti ambientali, onde arrivare a stime sempre più accurate, affidabili, veloci e previsionali della dose o concentrazione di non-effetto. Il secondo aspetto importante - e forse mai completamente risolvibile - è costituito dalla ricerca di una definizione accettata concordemente da tutte le parti in causa (scientifiche, imprenditoriali, politiche, sociali), di cosa si debba intendere per soglia di livello di dose, o concentrazione, che non dia alcun effetto indesiderato. Se è già infatti difficile stabilire tale soglia sulla base dei soli effetti sanitari sull'uomo, specie considerando quelli secondari, a lungo termine e generazionali, appare una impresa miracolistica il tener conto di tali effetti anche sull'ambiente biotico globale (effetti fisiologici su altri organismi viventi). Ciò nonostante, la politica e la scienza dell'ambiente si muovono coraggiosamente in questa direzione, pur mantenendo sempre come standards prioritari e maggiormente vincolanti quelli per la salute umana.

I problemi si complicano poi ulteriormente se occorre tenere conto (e in alcuni casi occorre farlo) degli effetti sociali indesiderati, ad esempio effetti economici, strategici, estetici o tradizionali, ritenuti socialmente o politicamente di rilevante importanza.

Risulta immediatamente evidente che la formulazione di uno standard richiede una quantità di informazioni che deve essere la più estesa possibile, che si ottiene:

- con il monitoraggio continuo e parallelo sia della qualità ambientale che della salute umana;
- con un adeguato supporto di ricerca applicata di laboratorio.

Il primo compito è affidato istituzionalmente alle unità sanitarie periferiche (Legge 833/78, art. 20) e il secondo agli organi sanitari centrali (Ministero della Sanità - Istituto Superiore di Sanità) e alle università.

L'uso degli indicatori nel monitoraggio della catena alimentare

Il primo momento operativo di una politica di risanamento ambientale è rappresentato dunque da una importante fase conoscitiva, con implicazioni di attività di ricerca scientifica e di raccolta di informazioni ambientali e sanitarie. Le attività di ricerca sono indirizzate alla definizione dei criteri di qualità ambientali e sanitari, un aspetto

scientifico che ha per obiettivo la definizione e la proposizione di indici chimici, fisici e biologici, di facile controllo e monitoraggio sia a livello di fonti di emissione che a livello ambientale e biologico e che siano chiaramente correlabili con uno o più indici di salute umana, anch'essi monitorabili dal servizio sanitario nazionale.

La differenza sostanziale tra indici chimici, fisici, biologici e indici sanitari, risiede nell'immediata e continua disponibilità dei primi anche in assenza di eventi indesiderati (morti, malattie, etc.), mentre la reperibilità dei secondi, essendo prevalentemente di tipo epidemiologico, è basata su statistiche di eventi indesiderati già verificatisi.

Occorre tenere presente, inoltre, che fino a oggi gli indici di tipo fisico e chimico sono quelli più facilmente ripetibili, più economicamente rilevabili e monitorabili automaticamente rispetto a quelli di tipo biologico. Per questo motivo, i controlli dei sistemi di produzione e di trattamento delle emissioni utilizzano, dal punto di vista normativo, soprattutto indici chimici e fisici. È logico pertanto affermare come la gran parte del lavoro di controllo e monitoraggio venga affidato a questi tipi di indici.

D'altra parte, è altrettanto importante evidenziare come questi indici perdano di significato qualora non vengano correlati agli indici biologici e agli effetti ambientali o sanitari, dei quali costituiscono un segnale sintomatico.

Ecco perchè la rilevazione dello stato dell'ambiente deve necessariamente avvalersi di un minimo di indici biologici ad elevato contenuto informativo.

Una metodologia di questo tipo trova la sua ragion d'essere in una serie di procedure finalizzate ad evitare l'enorme accumulo di dati inutili o di scarso significato.

I risultati di queste procedure consistono in una valutazione e comparazione quantitativa di una serie minima di indici di informazione ambientale e sanitaria, nonché di correlazione ambiente/salute.

Un altro importante aspetto della fase di ricerca consiste nella proposizione di valori quantitativi dei suddetti indici chimici, fisici e biologici, che corrispondono ad una desiderata qualità della salute e dell'ambiente quantificabile dagli indici sanitari. Si tratta cioè di proporre criteri di qualità (scientifici) o standards di qualità (normativi), che possano costituire, a vari livelli, delle barriere di controllo di tipo preventivo.

Poiché è possibile generalizzare il meccanismo di azione di un agente dannoso (chimico, fisico o biologico) attraverso la sua emissione da una data fonte, il trasporto e la trasformazione nell'ambiente sia abiotico che biotico, il raggiungimento di un

organismo o organo-bersaglio, sarebbe bene programmare delle barriere preventive di controllo qualitativo e quantitativo a tutti e tre i livelli, tramite la proposizione di standards biologici e/o sanitari, cui corrispondano standards ambientali, riconducibili a loro volta alle fonti di emissione.

La ricerca di un criterio di qualità ambientale o biologico è l'aspetto più difficoltoso e discusso della ricerca ecologica applicata.

Da un lato, la sperimentazione di tipo tossicologico si propone di individuare la minima dose o concentrazione di trascurabile effetto, misurando l'intensità di una disfunzione fisiologica o ecologica al variare dell'intensità dello stimolo nocivo.

Da un altro lato, l'indagine di tipo epidemiologico cerca di individuare le popolazioni a rischio, effettivamente esposte a un certo grado di stimolo nocivo, nonché l'influenza di fattori predisponenti.

La ricerca di un criterio di qualità ha come obiettivo l'individuazione dell'effetto biologico di interesse sanitario o ecologico, che deve essere prevenuto.

Ovviamente, i criteri di qualità o le proposte di standards formulati dal mondo scientifico, prima di divenire standards ufficializzati, devono in ogni caso subire un iter di valutazione politica in merito alle priorità rispetto ad altri standards settoriali, al costo economico, all'accettazione sociale delle conseguenze, alla verifica di coerenza con altri standards settoriali e con le direttive CEE, nonché la decisione di scadenze temporali e l'adozione graduale di standards provvisori.

Quanto appena detto è valido sia per gli standards ambientali che per quelli che attengono le caratteristiche degli alimenti che vengono quotidianamente destinati al consumo umano.

In effetti, l'evoluzione di alcuni fattori relativi alla crescita qualitativa dell'umanità, come la globalizzazione dei gusti e la realizzazione del libero scambio ha innescato, nel corso degli anni, una serie di processi che hanno, inevitabilmente, fatto sì che la sicurezza alimentare non ricevesse la dovuta attenzione e che, di conseguenza, aumentasse il numero delle patologie associate alla contaminazione degli alimenti, nonché il peso del loro impatto economico.

Di fronte ad una siffatta tendenza, il crescente generale interesse nel settore verso la salubrità ha indotto, sulla scia di quanto avviato a livello internazionale, la Commissione Europea e sul piano nazionale il Ministero della Salute a considerare

come priorità strategica il raggiungimento di standards, quanto più elevati possibile, di sicurezza alimentare.

Senza dubbio, la strada da percorrere in tale direzione deve, necessariamente, prevedere le seguenti tappe :

- a) l'applicazione di un nuovo quadro giuridico che rifletta una politica che abbia come obiettivo principale il monitoraggio dell'intera catena alimentare;
- b) l'attribuzione all'industria alimentare della responsabilità primaria di una produzione alimentare sicura che in quanto tale possa, allo stesso tempo, rappresentare una promozione sostenibile dei prodotti di nicchia;
- c) l'esecuzione di appropriati controlli ufficiali;
- d) la capacità di attuare rapide ed efficaci misure di salvaguardia di fronte ad emergenze sanitarie che si manifestino in qualsiasi punto della catena alimentare;
- e) l'attenzione verso nuove problematiche emergenti;
- f) il dovere di comunicare costantemente con i consumatori i quali devono essere adeguatamente informati sull'attività degli organismi istituzionalmente preposti all'assicurazione della salubrità degli alimenti, sulle nuove preoccupazioni in materia di sicurezza alimentare, sui rischi che alcuni alimenti possono presentare, sulle ripercussioni a livello sanitario di un regime alimentare inappropriato.

Alla luce di quanto detto risulta chiaro, quindi, come l'applicazione di un modello di gestione della qualità, come le ISO (International Organization for Standardization) 9000, all'intera filiera alimentare, che prevede il Metodo HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) come implementazione nell'attività del controllo del processo di produzione, sia determinante nel migliorare notevolmente la qualità dei prodotti che possono così diventare competitivi a livello mondiale, in quanto dotati di standards di sicurezza globalmente riconoscibili.

Negli ultimi anni, di fronte alla necessità di avviare monitoraggi finalizzati al contemporaneo testaggio di indici ed indicatori, è infatti aumentata considerevolmente la richiesta di dati, con particolare riguardo alle indagini sui livelli di concentrazione di un numero sempre crescente di inquinanti nelle diverse matrici ambientali ed alimentari.

Ovviamente queste attività di monitoraggio richiedono sempre più la disponibilità di dispositivi analitici affidabili, di facile impiego, di costo relativamente contenuto, automatizzabili, utilizzabili sul campo lungo tutta la catena alimentare.

A tal proposito, la ricerca nel campo dei biosensori ha proposto diversi “dispositivi analitici” per la determinazione di analiti importanti per la stima della qualità dell’ambiente e degli alimenti.

Per biosensore si intende un dispositivo analitico che incorpora un elemento biologicamente attivo (anche vivente), immobilizzato secondo particolari procedure ed accoppiato ad idonei trasduttori di segnale per la determinazione selettiva e reversibile della concentrazione o dell’attività di specie chimiche in un campione (Buck R. P., 1991).

Il meccanismo di funzionamento di un biosensore è relativamente semplice : il mediatore biologico immobilizzato sulla superficie del sensore prende parte ad uno o più processi che determinano la variazione di un parametro chimico o fisico che viene prontamente rilevato dal trasduttore che lo converte in un segnale elettrico (Rogers K. R. and Williams R. L., 1995).

I biosensori vengono classificati sia in base alla natura del mediatore biologico che al tipo di traduzione impiegata. In base al primo criterio i biosensori possono essere :

- biocatalitici o sensori enzimatici;
- chemorecettoriali;
- immunosensori, ovvero basati sulle interazioni antigene-anticorpo.

In base invece al tipo di trasduttore di segnale si può operare una distinzione tra :

- biosensori elettrochimici o bioelettrici;
- biosensori ottici o bio-optrodi;
- biosensori calorimetrici o biotermistori;
- biosensori acustici.

Sono numerose le tecniche di immobilizzazione dei mediatori biologici per realizzare l’accoppiamento con il trasduttore. La tecnica utilizzata è scelta in base alle caratteristiche del biomediatore, per evitarne la modifica strutturale e quindi delle caratteristiche e del comportamento catalitico, con conseguente riduzione o perdita dell’attività. A questo scopo sono a disposizione numerose tecniche di immobilizzazione fisica, in cui il mediatore biologico è semplicemente trattenuto dal

supporto e chimica, in cui esso è legato covalentemente alla superficie del trasduttore o di un supporto (membrana). Con l'immobilizzazione chimica il biomediatore ha spesso una maggiore stabilità nel tempo (Vadgama P. and Crump P. W., 1992).

La ricerca sui biosensori, che è relativamente giovane, sta crescendo in modo esponenziale nel nostro paese così come nella comunità globale.

Fino a poco tempo fa il numero dei ricercatori che si dedicava allo studio dei biosensori era decisamente limitato. Attualmente, invece, si assiste in tutto il mondo ad un incremento dell'interesse per questa linea di ricerca, insieme alla dilatazione della complessità e della varietà dei temi ed alla diversificazione delle tecnologie applicate.

I biosensori vengono oggi adottati nell'ambito di numerosi progetti di ricerca attinenti diverse aree (biotecnologie, medicina, ambiente, tecnologie alimentari) per risolvere problemi analitici di sicurezza, di monitoraggio e controllo di processo.

Nonostante la gran mole delle ricerche compiute e dei risultati acquisiti a livello accademico, ancora i biosensori stentano a trovare sbocchi in campo industriale.

Due ampie aree di applicazione in cui i biosensori sembrano particolarmente efficaci e per le quali è possibile prevedere nel medio periodo prospettive di mercato interessanti sono:

- monitoraggio dei pazienti in diagnostica medica (glucose pen, per esempio);
- indicatori on-line, *in situ*, immediati, nelle industrie alimentari, nel monitoraggio ambientale e in altri processi industriali.

Nel passato, al momento del passaggio dalla sperimentazione alla produzione su vasta scala di dispositivi che in laboratorio sembravano promettenti, si sono spesso incontrate una serie di difficoltà legate al fatto che il mercato prevede elevati volumi di produzione per realizzare l'abbassamento dei costi, laddove per i biosensori erano una volta necessari processi di fabbricazione manuali ed individuali.

Negli ultimi anni la disponibilità di tecnologie che consentono invece la produzione su vasta scala ha contribuito notevolmente ad abbassare il costo di produzione dei biosensori raggiungendo, in alcuni casi, l'obiettivo del biosensore monouso.

Nelle aree non medicali (ambiente ed industria alimentare principalmente) il mercato risulta ancora in embrione: nel medio e nel lungo termine questi settori sono destinati ad acquisire sempre più importanza non solo nel campo dei biosensori, quanto delle biotecnologie in genere.

Le caratteristiche fondamentali di un buon biosensore per misure in campo ambientale ed alimentare sono prioritariamente di tipo analitico, come l'accuratezza, la precisione, la specificità e/o la selettività, il limite di rilevabilità e la sensibilità adeguati alle normative, ma anche altri requisiti come l'economicità, i tempi ridotti di analisi e l'utilizzabilità "sul campo" giocano un ruolo di notevole importanza.

Anche se non sono presenti contemporaneamente tutte queste caratteristiche, un biosensore può comunque offrire reali benefici anche quando sussistono solo alcune di esse.

Considerando in termini generali il livello di sviluppo attuale dei biosensori, questi sono oggi in molti casi proponibili per analisi di "screening" sul campo (avendo verificato prioritariamente la possibilità di escludere risultati "falsi negativi"). Questo utilizzo, che consente di ridurre sensibilmente il numero di campioni da sottoporre alla necessaria verifica in laboratorio, con procedure analitiche standard che richiedono strumentazione spesso complessa e costosa, oltre a personale esperto, è particolarmente indicato per la gestione di emergenze ambientali e/o alimentari come quella, ad esempio, indotta dal "Sudan I".

Nel 2005 gli agenti del Corpo Forestale dello Stato di Modena hanno sequestrato alcune confezioni di cibi pronti surgelati (Kraft, Star, Cirio, Del Monte, Barilla, ecc.) contenenti peperoncino trattato con questo colorante, nonostante il suo uso fosse ormai proibito da un paio d'anni.

Il Sudan (I, II, III, IV) è un colorante usato normalmente nelle industrie che lavorano materiale tessile, plastico e altri materiali sintetici per tingere solventi, oli, cere, pellami e detergenti per pavimenti.

La legislazione europea lo esclude dalla lista positiva dei coloranti autorizzati e pertanto la sua presenza negli alimenti viene considerata fraudolenta. È considerato cancerogeno e genotossico, ovvero capace di danneggiare il DNA e per questo è stato bandito dagli alimenti in tutti i paesi dell'Unione Europea.

Lo scandalo sanitario della polvere piccante tinta con l'additivo cancerogeno, scoppiato qualche anno fa in Francia, ha attraversato l'intera Europa e ha spinto l'esecutivo di Bruxelles a vietare l'importazione ed il commercio della spezia tossica in tutti i paesi dell'UE già dal 20 giugno 2003.

In Italia l'allarme è partito in ritardo di qualche mese ed è stato gestito dalle autorità

sanitarie con superficialità e lentezza. L'industria alimentare non è stata informata per tempo ed in modo circostanziato del reale rischio sanitario legato a questo ingrediente e - cosa ancora più grave - i cittadini sono stati tenuti disinformati sul pericolo e nulla hanno saputo circa le misure prese per fronteggiare l'emergenza, in evidente contrasto con quanto prevede la legge europea (Regolamento 178/2002).

Nel caso di richiami di alimenti contaminati o quando il nome e il numero di lotto dei prodotti inquinati sono disponibili, bisognerebbe quindi procedere con una comunicazione pubblica.

Nonostante gli innumerevoli campioni risultati positivi alla prova del Sudan, in Italia i sequestri ordinati dalle ASL sono stati episodi isolati, gli allerta sanitari non hanno funzionato e molto spesso sono stati tardivi e pertanto inefficaci.

Il risultato è stato che il peperoncino al Sudan entrato nel nostro paese prima del divieto comunitario è spesso sfuggito ai controlli ed è stato utilizzato dai trasformatori, ma anche da ristoratori ed altre categorie, nell'indifferenza di tutti gli organi di vigilanza.

A seguito dei risultati ottenuti con i controlli di cui alla Decisione 2003/460/CE, la Commissione ha ritenuto utile pubblicare la Decisione 2004/92/CE. In tal modo le autorità ufficiali si sono orientate ad effettuare indagini su altre tipologie di alimenti e ad evidenziare il colorante, oltre che nei cibi al peperoncino, nella polvere di curry, nella curcuma, nel sumac e in altri prodotti alimentari analoghi quali ad esempio l'olio di palma.

In seguito la Commissione ha pubblicato una nuova Decisione 2005/402/CE dove esplicito è l'invito alle autorità ufficiali di programmare un monitoraggio capillare finalizzato alla segnalazione tempestiva al sistema di allerta dei prodotti contaminati per i quali è necessario adottare adeguati ed immediati provvedimenti.

Capitolo III

“*Imprinting* Molecolare in campo alimentare”

Introduzione

Sono sempre maggiori, nel mondo scientifico moderno, le risorse umane ed economiche destinate all'individuazione di sostanze additive adoperate spesso illegalmente nell'industria alimentare.

Per tale scopo sono necessarie tecnologie sempre più efficaci e raffinate, che permettano di rivelare la presenza di agenti adulteranti di cui comunque è molto importante, per la salute pubblica, riscontrare la presenza in cibi e congeneri anche se soltanto in minime tracce.

Da queste ed altre considerazioni di carattere puramente scientifico è nato tale progetto di ricerca, finalizzato alla realizzazione di una nuova metodica che permetta di individuare sostanze tossiche in alimenti destinati all'uomo.

La scelta del substrato analitico per il presente lavoro è nata dalla circostanza che, al momento in cui tale ricerca veniva intrapresa, il colorante azoico noto col nome commerciale di Sudan I era stato da poco dichiarato illegale come additivo nei cibi, in seguito ad una decisione della Commissione che in seno alla Comunità Europea dispone in materia di questioni di salute pubblica; tale provvedimento veniva emanato nel mese di giugno del 2003.

Il progetto era basato sull'impiego di polimeri in campo salutistico-ambientale e la linea di ricerca era focalizzata sulla sintesi e lo sviluppo di polimeri a memoria molecolare da impiegare per il riconoscimento di substrati tossicologicamente attivi o di analiti che rappresentassero indicatori di rilievo per la salute dell'uomo.

Fino a quel momento le metodiche a disposizione per il rilevamento di Sudan I in matrici alimentari ruotavano per lo più intorno alla spettrometria di massa, essendo perciò notevolmente costose.

Nacque così l'idea di mettere a punto un protocollo che si avvallesse dell'*imprinting* molecolare e dell'estrazione in fase solida, utilizzando come substrato proprio il Sudan I, nel tentativo di fornire un contributo in termini di strategie analitiche per il suo

rilevamento in matrici alimentari, ma anche con l'intento di mettere a disposizione del mondo scientifico (e non solo) una valida alternativa per lo *screening* di tale sostanza, sicuramente più economica rispetto a quella che si avvaleva della spettrometria di massa.

Si decise pertanto di intraprendere un lavoro che, a partire dalla sintesi di polimeri aventi memoria molecolare per il Sudan I, si prefiggeva come obiettivo finale l'identificazione qualitativa di tracce anche minime dell'additivo illegale in matrici alimentari di diversa natura.

MISPE (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction) e “Sudan I”

Obiettivo del nostro lavoro è stato la creazione di un polimero a memoria molecolare del “Sudan I”, utilizzabile per l'estrazione in fase solida (MISPE) e la valutazione della sua funzionalità ad un potenziale impiego analitico, finalizzato al monitoraggio dell'uso illegale del composto in questione.

Il “Sudan I” (1-fenilazo-2-naftolo, CAS 842-07-09) è un colorante azoico sintetico, usato in diversi settori come quello dell'industria tessile, come colorante di vernici e di detergenti di vario genere (figura 12).

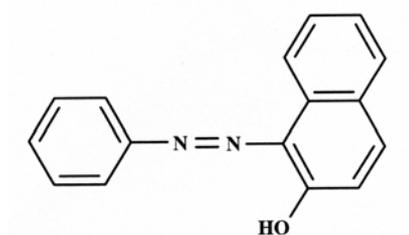


Figura 12. Sudan I

Per molti anni esso è stato largamente impiegato come additivo nei cibi, particolarmente in quelli contenenti polveri di spezie piccanti, a causa della sua intensa colorazione rosso-arancio (Capitàn, Capitàn-Vallvey, Fernàdez, De Orbe and Avidad, 1996); esso è stato ritrovato in salse e condimenti pronti ed anche in diverse specie di insaccati (<http://www.foodstandards.gov.uk/safereating/sudanI>).

Oggi la Comunità Europea ha proibito l'uso di Sudan I come additivo nei cibi poiché è stata dimostrata la sua cancerogenicità (Commission Decision (E.C.) n. 460/2003, 20 June 2003).

Diverse metodiche (HPLC, GC/MS) sono state messe a punto per il rilevamento della presenza di tale composto (Chen, Mou, Hou, Riviello, & Ni, 1998; http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_268420.html).

Comunque, quando il Sudan I si trova miscelato nei cibi ed è quindi presente solo in piccole quantità, per poter rivelarne la presenza sono necessarie apparecchiature (LC/MS/MS) molto costose (Tateo & Bononi, 2004).

Noi proponiamo una nuova metodica che permette di concentrare, purificare e quindi di rilevare "Sudan I" con uno strumento non costoso come i precedenti, ovvero l'HPLC.

La nostra ricerca si è sviluppata a partire dalla sintesi di un polimero a memoria molecolare utilizzato per l'estrazione in fase solida (MISPE), avente come molecola-templante il Sudan I.

Abbiamo utilizzato la tecnica dell'approccio non-covalente, che prevede la disposizione di monomeri funzionali intorno ad un ligando templante (molecola-stampo).

Tale ligando è una sostanza "target" selezionata e forma un complesso di pre-polimerizzazione col monomero per mezzo di interazioni non-covalenti come ad esempio legami ad idrogeno, ionici o interazioni idrofobiche.

Il complesso così formatosi subisce successivamente co-polimerizzazione radicalica con un agente reticolante.

In seguito alla co-polimerizzazione, la molecola templante viene rimossa al fine di ottenere siti di legame liberi in grado di legare selettivamente il templante originario.

Nel lavoro sul Sudan I abbiamo sintetizzato due differenti tipi di polimero a memoria molecolare usando, rispettivamente, acido metacrilico (MAA) e 4-vinilpiridina (4-VP) come monomeri funzionali ed etilen-glicole dimetacrilato (EGDMA) come agente reticolante.

I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando i polimeri con la 4-vinilpiridina, come fase stazionaria per le colonne MISPE.

Si è valutata la capacità di queste colonne, da noi preparate, di adsorbire selettivamente il Sudan I presente in matrici alimentari. Tale procedura permette di concentrare il nostro composto. In seguito alla sua eluizione attraverso le colonne MISPE, sarà

possibile analizzare l'eluato concentrato mediante HPLC.

Discussione

Per la sintesi dei polimeri a memoria molecolare del "Sudan I" si è utilizzato il metodo della polimerizzazione in "bulk" (Caro et al., 2002).

Questa tecnica di polimerizzazione, che dà come risultato finale un monolito polimerico rigido e secco, è sicuramente la più indicata per la creazione di una fase stazionaria da utilizzare per estrazione in fase solida o per HPLC.

Infatti, quello a cui si mirava nel presente lavoro, era proprio l'ottenimento di una matrice polimerica che risultasse adatta al riempimento delle colonne che comunemente vengono usate nella tecnica dell'estrazione in fase solida.

Si tratta inoltre di una metodica relativamente semplice da attuare in quanto essa prevede che una unica soluzione di polimerizzazione contenente la molecola-stampo (templante), il monomero funzionale (o i monomeri funzionali qualora si ritenga opportuno usarne più d'uno), il reticolante, l'iniziatore ed il solvente di polimerizzazione (anche detto agente porogeno), venga sottoposta ad una incubazione in atmosfera d'azoto.

Alla fine di questo periodo di incubazione si avrà già il monolito polimerico rigido il quale, naturalmente, dovrà essere macinato fino ad ottenere particelle che siano nell'ordine dei micrometri, al fine di conseguire le caratteristiche dimensionali necessarie per l'impaccamento delle colonne per estrazione in fase solida.

Per questo lavoro sono stati sintetizzati due differenti polimeri a memoria molecolare di cui uno (MAA-MIP) che aveva l'acido metacrilico come monomero funzionale e un altro (4VP-MIP) che aveva invece come monomero funzionale la 4-vinilpiridina.

L'acido metacrilico e la 4-vinilpiridina sono quindi stati usati, rispettivamente, come monomeri funzionali per preparare i MIPs secondo il metodo dell'imprinting non covalente.

Quest'ultimo rappresenta senz'altro il tipo di approccio più versatile per quanto riguarda la reversibilità dei legami tra il polimero a memoria molecolare ed il substrato da riconoscere; esso, rispetto al metodo di imprinting covalente, ha certamente cinetiche di reazione più veloci. L'approccio di tipo covalente è caratterizzato infatti da cinetiche di

reazione più lenta in quanto necessita di tempi più lunghi per la rottura e la riformazione dei legami covalenti.

I rapporti stechiometrici adottati relativamente al template, al monomero funzionale ed al reticolante sono stati di uno:quattro:venti. Ci si è attenuti a queste proporzioni poiché in letteratura risultavano essere quelle ideali per la tecnica di polimerizzazione in “bulk” e generalmente le più utilizzate.

La scelta di creare due polimeri a memoria molecolare, di cui uno con acido metacrilico e un altro con 4-vinilpiridina come monomeri funzionali, è stata dettata dall'intenzione di confrontare l'eventuale differenza nella loro capacità di instaurare interazioni tra il gruppo idrossilico del Sudan I ed il gruppo funzionale monomero stesso.

Tale ipotesi si rivelò in seguito fondata poiché dai dati sperimentali emergeva che la 4-vinilpiridina sembrava avere stabilito col gruppo idrossilico del Sudan I un legame ad idrogeno più tenace rispetto a quello che dimostrava di avere l'acido metacrilico.

È importante ricordare che è stato sintetizzato anche un polimero di controllo (NIP, Non-Imprinted Polymer) seguendo le medesime condizioni adottate per la sintesi del MIP, tranne che per il nuovo polimero non veniva usata la molecola del template Sudan I.

Comunque, anche se il polimero con 4-vinilpiridina, come poc'anzi detto, dimostrava un legame più forte con il gruppo idrossilico del Sudan I, è necessario precisare che entrambi i polimeri (MAA-MIP e 4VP-MIP) hanno avuto una migliore ritenzione della molecola del template rispetto al polimero di controllo.

Come monomero reticolante si è deciso di usare l'EGDMA. È noto da letteratura che la scelta del reticolante deve tenere conto di alcuni importanti fattori quali ad esempio la sua solubilità nella soluzione di pre-polimerizzazione e l'alta percentuale che se ne deve usare se si intende ottenere un buon livello di specificità.

Un reticolante non è altro se non un monomero avente diversi gruppi polimerizzabili; per questo motivo esso può essere incorporato in più catene polimeriche, costituendo una struttura reticolata tra queste e conferendo così rigidità al polimero. Tale elemento risulta pertanto molto importante per la stabilità dei siti polimerici a memoria molecolare e perché siano garantite sufficiente rigidità strutturale e resistenza meccanica al materiale polimerico.

Si è ritenuto, avendo considerato tutti i fattori appena menzionati, che l'EGDMA fosse

in grado di garantire che il polimero a memoria molecolare del Sudan I avesse i requisiti necessari per una buona capacità di riconoscimento.

Come iniziatore della reazione di polimerizzazione radicalica (comunemente usata per la preparazione di polimeri a memoria molecolare) è stato adoperato l'AIBN, che è un agente iniziatore di radicali liberi.

Questi ultimi, promotori dell'innesco del processo, sono normalmente prodotti *in situ* dalla decomposizione termica o fotochimica di un iniziatore organico.

Da letteratura si sapeva che, trovandosi in una situazione in cui l'imprinting è prevalentemente guidato dal legame ad idrogeno, è preferibile lavorare a temperature non molto elevate e che gli azobisnitrili decompongono sia per via termica che per via fotochimica; alla luce di questi presupposti e avendo tenuto in considerazione le temperature che per questo esperimento sarebbero state adoperate, si è giunti alla conclusione che l'AIBN potesse garantire l'innesco della reazione di polimerizzazione radicalica.

Il solvente di polimerizzazione è stato il cloroformio. Anche nel caso della scelta del solvente è stato necessario attenersi ad alcune considerazioni emerse da un attento studio della bibliografia esistente sulla materia in questione.

Il solvente, anche detto agente porogeno in quanto responsabile della formazione delle porosità sul polimero, ha un ruolo fondamentale nella realizzazione di un processo di imprinting molecolare, soprattutto nei sistemi basati sull'auto-assemblaggio. La quantità di porogeno usata determinerà il numero e la grandezza dei pori.

Solitamente sono considerati buoni solventi per l'imprinting molecolare quelli dotati di costante dielettrica bassa e maggiormente apolari, poiché essi determinano un aumento della forza dei legami non-covalenti.

Il cloroformio pertanto, data la sua bassa costante dielettrica, ma anche perché tutti i componenti della miscela di polimerizzazione si scioglievano molto bene in esso, è stato ritenuto adatto per la nostra reazione di polimerizzazione radicalica.

Tutti i MIPs da noi preparati sono stati polimeri reticolati e i siti di riconoscimento per il "Sudan I" sono stati introdotti con successo.

Differenti estrazioni e solventi di lavaggio sono stati adottati al fine di valutare l'effetto-imprinting delle colonne MISPE da noi preparate.

I migliori risultati sono stati ottenuti lavando le colonne con diclorometano (0.3 ml.) ed

usando metanolo per eluire. È possibile notare un comportamento differente dei nostri due polimeri: quelli con l'acido metacrilico (MAA-MIPs) non dimostrano un buon effetto-imprinting, mentre quelli con la 4-vinilpiridina (4VP-MIPs) hanno una maggiore capacità di "imprinting" (figure 13 e 14).

Probabilmente questi differenti effetti dipendono dalla tenacia delle interazioni tra il gruppo idrossilico del "Sudan I" e il gruppo funzionale del monomero usato.

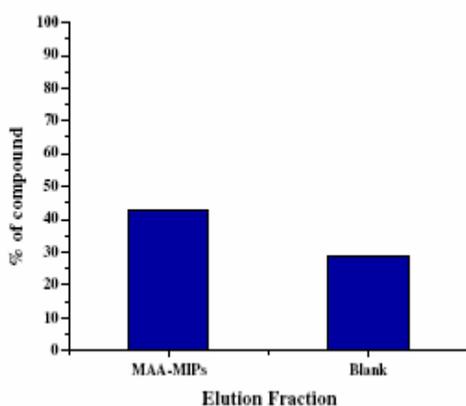


Fig. 13. Confronto tra la percentuale di Sudan I nell'eluato relativo alla colonna contenente MAA-MIP e a quella contenente il polimero "bianco", in seguito ad estrazione in fase solida con la soluzione standard di Sudan I.

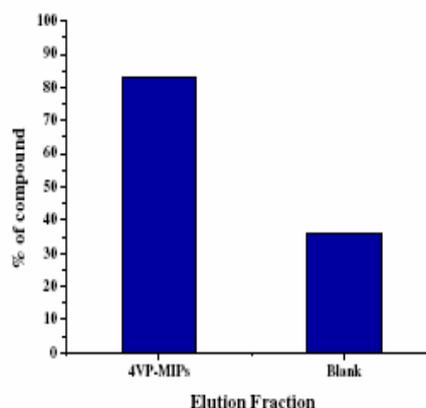


Fig. 14. Confronto tra la percentuale di Sudan I nell'eluato relativo alla colonna contenente 4VP-MIP e a quella contenente il polimero "bianco", in seguito ad estrazione in fase solida con la soluzione standard di Sudan I.

La 4-vinilpiridina sembra avere un legame ad idrogeno col gruppo idrossilico più forte rispetto all'acido metacrilico. Comunque, entrambi i polimeri dimostrano di avere una migliore ritenzione della molecola templante rispetto al polimero "bianco". Si può inoltre constatare che anche il polimero contenente acido metacrilico ha una buona interazione col Sudan I e una significativa ritenzione del composto è stata anche ottenuta dopo la fase di lavaggio.

Al fine di valutare la capacità delle nostre migliori colonne, ovvero quelle contenenti il polimero con 4-vinilpiridina, di adsorbire selettivamente il "Sudan I", è stato usato per caricare le colonne MISPE (12 ml.) un estratto in cloroformio di polvere rossa piccante adulterata con Sudan I (0.67 µg/ml).

In seguito al lavaggio con diclorometano, la quota di eluato raccolta è stata analizzata

mediante HPLC.

La stessa procedura è stata seguita per le colonne contenenti il polimero di controllo (bianco).

I cromatogrammi delle frazioni di eluato hanno dimostrato un diverso comportamento nella ritenzione selettiva di Sudan I, tra la colonna contenente il polimero “bianco” e quella contenente il “MIP” con la 4-vinilpiridina (figura 15).

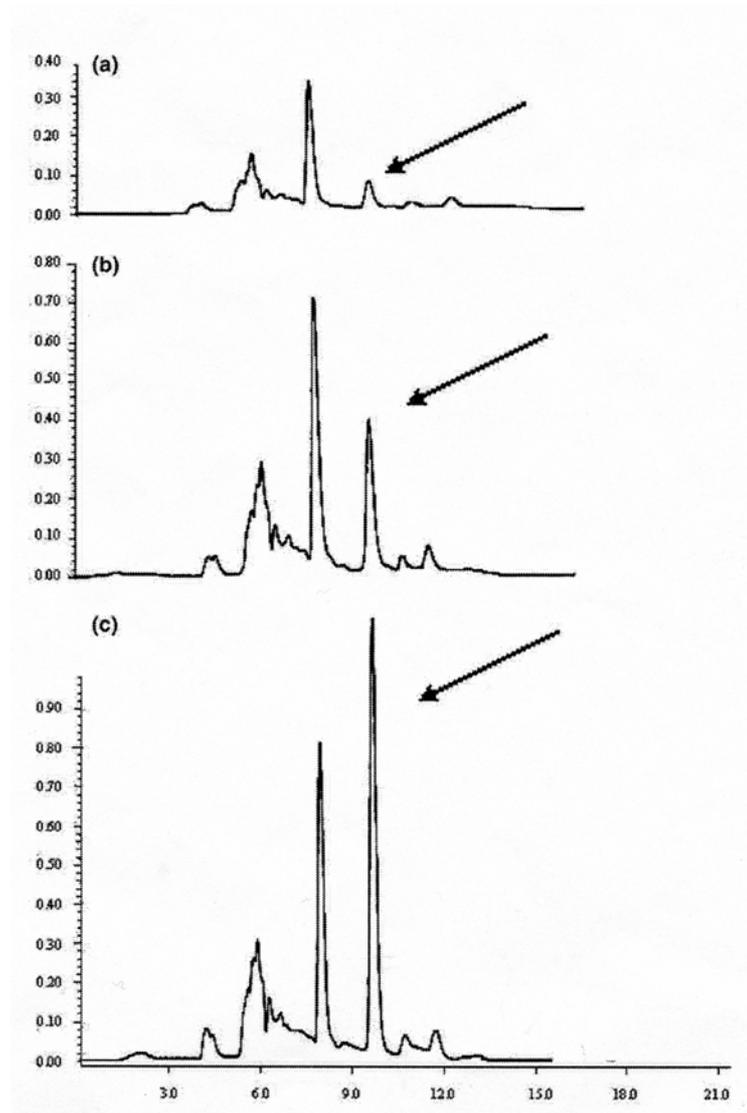


Figura 15. Cromatogrammi relativi a: soluzione di polvere di peperoncino rosso adulterata con “Sudan I” (a), colonne contenenti il polimero “bianco” (b), colonne contenenti il MIP con la 4-vinilpiridina (c). Il picco del “Sudan I” è indicato nei cromatogrammi con una freccia.

Dai cromatogrammi è possibile notare la differente intensità dei picchi del Sudan I relativi alla colonna col “bianco” e a quella col “MIP”.

La quantità delle perdita totale di Sudan I nella frazione di lavaggio ammontava rispettivamente al 10% per la colonna contenente il “MIP” ed al 18% per la colonna contenente il “bianco”.

Invece il recupero nella fase di eluizione era del 70% per la colonna contenente il “MIP” e del 30% per la colonna contenente il “bianco”.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di costruire un polimero a memoria molecolare del “Sudan I” per estrazione in fase solida (MISPE) e la valutazione di un suo possibile impiego analitico, finalizzato al monitoraggio del suo uso illegale.

I risultati su matrice alimentare suggeriscono che una adeguata purificazione può essere considerata una soluzione praticabile per la preparazione dei campioni in analisi di “routine”, quando l’ammontare complessivo delle tracce di Sudan I non è rilevabile utilizzando la sola HPLC.

Capitolo IV

“Imprinting Molecolare e ambiente”

Cenni sulla tossicologia del rotenone

Altra emergenza ambientale il cui monitoraggio può essere altresì effettuato mediante l'impiego di biosensori è quella causata dall'impiego del rotenone nell'agricoltura biologica.

L'agricoltura "biologica", conosciuta anche con i termini di "organica" e di "ecologica", è così definita dal REG.CEE 2092/91 e successive integrazioni, che ne stabiliscono le norme a livello europeo. Essa rappresenta un metodo di produzione agricola che mira ad una gestione equilibrata dell'ecosistema, mantenendo e valorizzando la biodiversità e l'attività biologica del suolo, con l'obiettivo di ridurre le forme di inquinamento dovute ad alcune pratiche colturali. È basata sulla esclusione dell'impiego di prodotti chimici di sintesi (fitofarmaci e fertilizzanti), sostituiti da prodotti naturali e sulla messa in atto di metodi che consentano una resistenza alle fitopatie. In altre parole la protezione fitosanitaria in agricoltura biologica prescinde dagli interventi fitoiatrici, che possono arrecare effetti nocivi sull'ambiente e sulla salute umana, puntando maggiormente sulla prevenzione basata sulla conoscenza delle interrelazioni suolo-pianta-ambiente-animali. Ciò determina la imprescindibile esigenza di monitorare lo stato sanitario della coltura e di conoscere l'ambiente pedoclimatico entro cui essa si svolge.

Viene richiesto, pertanto, un bagaglio di conoscenze più articolato e complesso di quello richiesto per la gestione della coltivazione convenzionale.

Una politica di incentivazione economica della U.E. ed una cultura ecologista ed igienico-salutista, recentemente instauratasi in Italia ed in altri Paesi olivicoli europei, ha mosso una notevole frazione di olivicoltori verso la coltivazione biologica.

Le superfici destinate a questa forma di coltivazione si sono enormemente ampliate in questi ultimi anni, per effetto della accresciuta domanda di prodotti di qualità e per l'aumentato interesse economico verso un tipo di produzione in grado di avvantaggiarsi del valore aggiunto del "biologico". Tale incremento delle superfici investite nel comparto olivicolo, già di notevole importanza economica in Italia (soprattutto nelle

regioni del Mezzogiorno dove rappresenta gran parte del PIL), ha interessato nell'ultimo decennio una grande quantità di aziende ed è stimabile in diverse decine di migliaia di ettari. Recenti indagini ufficiali riferiscono che ben il 10% dell'olivicoltura convenzionale ha convertito - o ha in corso la conversione - la propria produzione tradizionale nei sistemi biologici. Ma specialmente in alcuni ambienti particolarmente favorevoli allo sviluppo dei parassiti esiste un obiettivo limite alla competitività economica della olivicoltura biologica, rappresentato dalla difficoltà di combattere le avversità crittogamiche ed entomatiche. Soprattutto la lotta alla "mosca delle olive", fitofago-chiave dell'ecosistema oliveto, già di per sé problematica anche con l'impiego dei prodotti convenzionali, diventa ancor più difficile con i soli mezzi consentiti dalla normativa sulle coltivazioni biologiche. I danni che produce questo fitofago, sia sotto il profilo quantitativo che quello qualitativo della produzione, sono purtroppo ben noti. Tuttavia una più approfondita valutazione del danno, recentemente effettuata in diverse aree olivicole nazionali, ha evidenziato la possibilità di tollerare, soprattutto in relazione alle alterazioni dei parametri organolettico-commerciali dell'olio, una percentuale di infestazione leggermente più alta (15-20%) rispetto a quella precedentemente ritenuta come limite massimo (10-15%). Ciò consente una più ottimistica valutazione circa l'impiego dei mezzi alternativi rispetto a quelli chimici tradizionali.

Le norme che regolano il metodo di produzione biologica sono contenute nel citato regolamento comunitario, nel quale l'allegato II B comprende i prodotti fitosanitari che possono essere usati, a condizione che il loro impiego sia autorizzato in agricoltura generale dallo Stato-membro interessato. L'allegato II B è articolato in quattro sezioni e sottoposto a continui aggiornamenti, per effetto di modifiche che vengono proposte ed accolte dal "Comitato permanente agricoltura biologica", affinché esso venga costantemente adeguato alle esigenze, spesso contrastanti, dei vari Paesi della UE, i cui produttori biologici si trovano ad affrontare problematiche diverse per le dissimili condizioni ambientali in cui operano.

Molte sono le esperienze maturate nel corso di ricerche effettuate in questi ultimi anni sull'impiego di alcuni pesticidi naturali.

Per quanto riguarda infatti l'impiego di pesticidi naturali, che si distinguono in "biocidi", qualora essi uccidano l'insetto (piretro, rotenone ecc.), "repellenti" quando agiscono sul comportamento degli adulti (silicato di sodio, lecitina di soia) e

"fago-inibitori" quando agiscono sul comportamento alimentare o come regolatori di crescita (estratti di neem), purtroppo non è attualmente disponibile una sufficiente letteratura circa la loro efficacia di azione e mancano completamente informazioni sul loro impatto ambientale e sulla presenza di eventuali residui nel prodotto finale.

I pochi e recenti lavori esistenti riguardano infatti solo alcuni di questi fitofarmaci e si riferiscono esclusivamente a valutazioni circa la loro efficacia.

Nello specifico dell'attività dell'Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura, i primi prodotti ad essere sperimentati, negli anni 1997 e 1998, sono stati il silicato di sodio ed il piretro naturale. I risultati ottenuti con tali sostanze in un ambiente meridionale dove normalmente l'infestazione dacica risulta molto elevata non sono stati complessivamente soddisfacenti, tanto che all'epoca di raccolta il livello di infestazione risultava molto elevato.

Nelle ricerche effettuate negli anni successivi (1999 e 2000), una buona efficacia ha invece mostrato l'impiego del rotenone. Quest'ultimo principio attivo, biocida naturale estratto dalle radici di *Derris elliptica*, utilizzato in sinergia con olio minerale bianco, ha consentito un sensibile decremento della popolazione adulta infestante, dopo l'unico trattamento effettuato in settembre, a cui ha fatto riscontro un significativo contenimento dell'infestazione attiva.

In questo caso la percentuale di infestazione si è mantenuta, anche al momento della raccolta, entro limiti compatibili con l'ottenimento di un prodotto di qualità. Attualmente il rotenone è ancora in osservazione nelle ricerche in corso, insieme all'azadiractina (estratto di neem), che dai primi dati sembra fornire interessanti risultati.

I risultati ottenuti con l'impiego dei biocidi naturali, soprattutto se integrati da altre operazioni di contenimento (agronomiche, biologiche e biotecniche) con approccio multifattoriale, in molti casi possono effettivamente consentire alla olivicoltura biologica il mantenimento dell'infestazione dacica entro limiti compatibili con un prodotto di qualità.

Rimane completamente aperto invece il problema dell'impatto ambientale che anche questi prodotti possono provocare, nonché il rischio legato ad eventuale presenza di residui nell'olio.

In uno studio che conferma una relazione fra i prodotti chimici agricoli e il morbo di

Parkinson, due gruppi di ricercatori hanno trovato nuove prove che la perdita di DJ-1, un gene associato al morbo di Parkinson ereditario, induce una forte sensibilizzazione all'erbicida paraquat e all'insetticida rotenone.

Le due ricerche sono state effettuate sul moscerino della frutta *Drosophila*, un organismo modello molto usato nello studio delle malattie umane; queste hanno fornito nuove importanti informazioni sulle connessioni biologiche fra le forme ereditarie e quelle sporadiche del morbo di Parkinson.

Il rotenone, un chetone policiclico ($C_{23}H_{22}O_6$), è uno specifico inibitore del complesso mitocondriale I (MC-I), che risulta difettivo nella malattia di Parkinson.

La somministrazione di alte dosi, per un breve periodo di tempo, di rotenone produce tossicità cardiovascolare e lesioni cerebrali non specifiche.

Mentre la somministrazione di questa sostanza per 1-5 settimane provoca degenerazione dopaminergica.

Negli animali trattati con il rotenone si sono presentati i caratteristici deficit posturali e motori della malattia di Parkinson.

Gli autori ritengono che un difetto anche parziale nel complesso I sia sufficiente a riprodurre le caratteristiche comportamentali, anatomiche, neurochimiche e neuropatologiche della malattia di Parkinson.

Uno studio pubblicato lo scorso anno dimostra come il rotenone espliciti i suoi danni liberando radicali liberi dell'ossigeno, evidenziando una stretta connessione fra geni e ambiente.

Non tutti i ratti in effetti - perfino quelli consanguinei - sono ugualmente suscettibili a questo chetone.

“Alla stessa dose ci sono importanti variazioni; alcuni ratti simili, anche geneticamente, hanno una risposta non perfettamente identica.”

Alcuni ratti potrebbero per esempio avere ereditato mitocondri che resistono meglio al danno da rotenone.

Uno studio del 2002 mostra che i gatti sono protetti dagli effetti del MPTP se non hanno i geni alfa-synuclein.

Dai dati messi a disposizione da queste ricerche emerge quindi che la genetica di questo disturbo appare essere il risultato dell'interazione tra fattori di predisposizione, fattori di protezione ed esposizione a fattori ambientali tossici o precipitanti.

Polimeri a memoria molecolare per l'identificazione di "Rotenone"

Il rotenone è una molecola derivante da alcune piante tropicali della famiglia delle *Leguminosae* come la *Derris elliptica*, *Lonchocarpus nicou*, *Tephrosia vogelii*.

Esso è stato largamente utilizzato per molti anni come insetticida, prima dell'avvento degli organo-fosforici e per via della sua origine naturale, fino a dopo la metà del secolo scorso, considerato innocuo (figura 16).

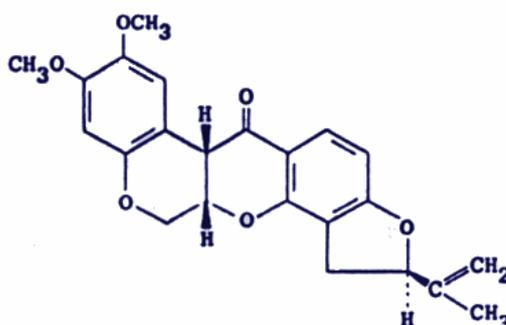


Figura 16. Rotenone

Quando alla fine degli anni sessanta, in alcuni laghi degli Stati Uniti d'America, si riscontrò un tasso di mortalità della fauna ittica molto alto, furono avviate le prime ricerche sulle possibili cause di questo fenomeno e sulle possibili conseguenze per la salute dell'uomo.

In seguito, in effetti, questa ipotesi trovò conferma in diversi studi che dimostrarono una spiccata attività anti-mitotica del Rotenone: esso, infatti, bloccando l'ATP, sembra essere in grado di privare la cellula dell'energia necessaria per la sua moltiplicazione (<http://rotenone.com>).

A causa dell'interesse sugli aspetti tossicologici del Rotenone noi abbiamo cercato di fornire un contributo in termini di tecniche disponibili atte a rilevare la presenza di tale sostanza in substrati alimentari ed ambientali.

Il metodo che noi proponiamo consiste nella "costruzione" di un polimero a "memoria molecolare" che abbia come "stampo" la molecola del rotenone; in seguito all'estrazione del template (rotenone) dalla matrice polimerica creata *ad hoc*, rimarranno nel MIP (Molecularly Imprinted Polymer) siti di legame specifici per tale substrato (Mosbach K. and Ramstrom O., 1996).

L'Imprinting Molecolare può essere considerato come una alternativa artificiale alla "serratura molecolare" per la "chiave molecolare" rappresentata dal substrato.

Il concetto di imprinting è basato sulla creazione di siti di riconoscimento molecolare durante la sintesi di un polimero reticolato.

In figura 17 sono schematizzati i passaggi fondamentali relativi alla preparazione di un polimero a memoria molecolare.

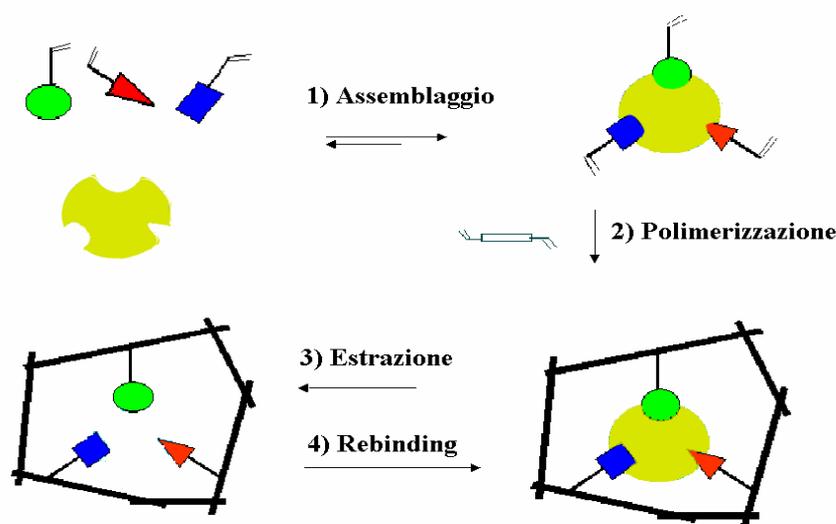


Figura 17. Fasi di costruzione di un polimero a memoria molecolare

Nell'ambito delle ricerche in campo alimentare ed ambientale (miele, olio d'oliva, acque fluviali) sono stati sviluppati metodi basati sulla spettrometria di massa e sulla cromatografia (J.J. Jiménez et al., 2000; Leonardo di Donna et al., 2004; A. Holm et al., 2003; Leonardo Di Donna et al., 2005).

Alcuni di questi hanno dimostrato notevole accuratezza, precisione e sensibilità, ma allo stesso tempo hanno alti costi poiché necessitano di apparecchiature molto dispendiose.

Il nostro metodo, sebbene sia ancora lontano dalla precisione di quelli appena menzionati, è molto economico e ha già dimostrato di avere una buona applicabilità.

I buoni risultati da noi precedentemente ottenuti ci rendono certi sui margini di miglioramento della resa totale della nostra fase sperimentale (Francesco Puoci et al., 2005).

Discussione

Anche per la preparazione dei polimeri a memoria molecolare del Rotenone si è seguita la metodica della polimerizzazione in “bulk”.

Dovendo procedere anche in questo caso alla realizzazione di particelle di polimero da utilizzare come fasi stazionarie per l'estrazione in fase solida, la polimerizzazione in bulk rappresentava senz'altro il metodo più indicato.

Infatti, il monolito rigido che si ottiene adottando questa metodica, ben si presta ad essere sottoposto a tutti quei passaggi che portano infine ad avere particelle di polimero delle dimensioni di poche decine di micron, adatte per il riempimento delle cartucce normalmente impiegate nella tecnica dell'estrazione in fase solida.

Si è già detto anche che la metodica in questione è molto semplice da mettere in atto, poiché è sufficiente che una miscela di polimerizzazione contenente templante, monomero funzionale, reticolante, iniziatore e solvente, venga posta in una provetta e tenuta in incubazione ad una data temperatura per non più di ventiquattro ore, per ottenere il polimero a memoria molecolare sotto forma di monolito.

Per l'*imprinting* molecolare del Rotenone non sono stati sintetizzati due differenti polimeri con diversi monomeri funzionali come era avvenuto per il precedente lavoro sul Sudan I, ma è stato preparato un unico tipo di polimero avente l'acido metacrilico come monomero funzionale; quest'ultimo è stato scelto poiché si è ritenuto che le sue funzionalità potessero essere compatibili con quelle del templante.

Il metodo di *imprinting* è stato sempre quello che prevede un approccio di tipo non-covalente.

È opportuno ricordare in questa sede quanto già detto in precedenza e cioè che il metodo di *imprinting* di tipo non-covalente è da preferire a quello covalente per la maggiore versatilità dovuta alla reversibilità dei legami tra polimero a memoria molecolare e substrato e quindi per le cinetiche di reazione più rapide, in quanto non vi sono in questo caso legami covalenti la cui rottura e ristabilizzazione comportano inevitabilmente tempi più lunghi.

Anche per il MIP del Rotenone il rapporto stechiometrico relativo a templante, monomero funzionale e reticolante è stato uno:quattro:venti, secondo protocolli già sperimentati in diversi lavori basati sulla medesima metodica di polimerizzazione.

Ovviamente non si poteva prescindere dalla realizzazione di un polimero di controllo (NIP), che ricordiamo viene preparato secondo la stessa procedura ed utilizzando i medesimi composti, solventi, concentrazioni, volumi, adoperati per il MIP, con l'unica differenza che nel NIP viene omissa il templante.

L'EGDMA è stato usato come agente reticolante. Anche per la scelta del reticolante si è operato come nel caso del Sudan I.

Sono stati presi in considerazione alcuni elementi emersi dalla letteratura come la percentuale di reticolante da usare e la solubilità del reticolante stesso (vedi paragrafo su "Reticolanti").

Dopo aver fatto tutte le opportune valutazioni si è ritenuto che anche per il polimero a memoria molecolare del Rotenone la scelta dovesse ricadere sull'EGDMA.

L'AIBN è stato utilizzato come agente di innesco della reazione di polimerizzazione radicalica, essendo un iniziatore di radicali liberi. Esso è ideale per questo tipo di reazioni di polimerizzazione; per la scelta dell'iniziatore sono state fatte le stesse valutazioni che erano state precedentemente prese in considerazione per il polimero a memoria molecolare del Sudan I (vedi capitolo su "Sudan I").

Il solvente scelto per la miscela di polimerizzazione è stato il cloroformio. Quest'ultimo è largamente impiegato come solvente di polimerizzazione per via della sua bassa costante dielettrica, necessaria per garantire una buona tenacia dei legami non-covalenti. Le caratteristiche che dovrebbe avere infatti un buon solvente di polimerizzazione sono la costante dielettrica bassa ed una spiccata apolarità.

Il solvente è anche detto "porogeno" perché esso determina quantità e dimensioni dei pori sul polimero.

L'utilizzo del cloroformio è stato inoltre motivato dal fatto che esso garantiva una ottimale solubilizzazione di tutti gli elementi che componevano la miscela di polimerizzazione.

Nonostante i risultati finora ottenuti ci diano buone speranze sull'efficienza del metodo da noi proposto, con il rotenone come substrato la resa totale della fase sperimentale non è ancora completamente soddisfacente (figura 18).

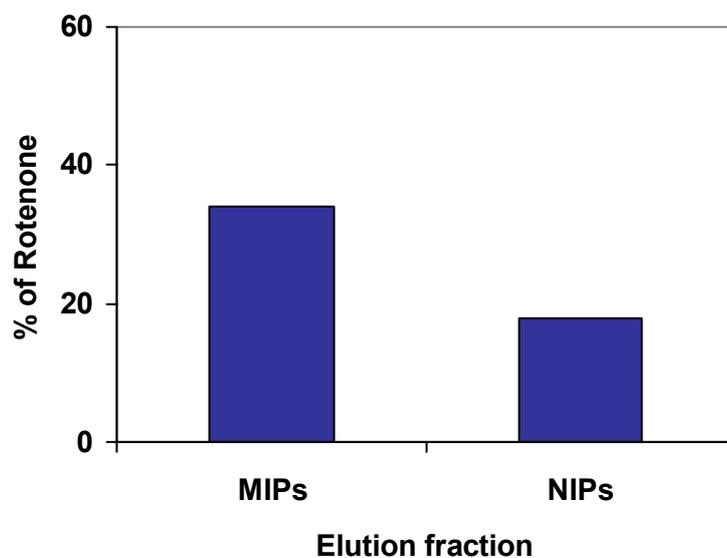


Figura 18. Confronto tra la percentuale di Rotenone riscontrata nell'eluato della colonna contenente il MIP ed in quello della colonna contenente il NIP, in seguito ad estrazione in fase solida con la soluzione standard di Rotenone.

Per questo motivo, oltre ad ottimizzare le varie fasi dell'intera procedura (variazione del solvente di polimerizzazione, incremento della concentrazione del template, etc.), stiamo cercando di mettere a punto, nell'ambito del metodo proposto, un sistema alternativo, consistente nella preparazione e nell'utilizzo di colonne per HPLC che abbiano come fase stazionaria proprio il polimero a memoria molecolare del rotenone.

Pertanto possiamo concludere che questa tecnica (MISPE), accoppiata all'analisi mediante HPLC, rappresenta un buon sistema per la concentrazione di diversi substrati e per la loro selettiva estrazione da matrici complesse, alimentari ed ambientali.

Capitolo V

“Imprinting molecolare ed amminoacidi”

Introduzione

Questo studio ha avuto come obiettivo la progettazione e la sintesi di un polimero a memoria molecolare utilizzando l'omocisteina derivatizzata come template, al fine di realizzare fasi stazionarie da usare come matrici di riconoscimento per il monitoraggio dell'iperomocisteinemia all'interno dei fluidi biologici (urine, plasma).

Questo si è reso necessario in quanto esiste l'evidenza che associa ad elevate concentrazioni di omocisteina varie patologie come alterazioni scheletriche, vascolari e del sistema nervoso centrale. Le metodologie attualmente in uso per la risoluzione del problema si avvalgono di tecniche cromatografiche che richiedono procedure lunghe, reagenti costosi e instabili.

Sulla base di tali conoscenze ci siamo avvalsi di una diversa strategia operativa rispetto a quella finora adottata. Il primo obiettivo è stato quello di funzionalizzare l'omocisteina con un composto in grado di aumentarne il carattere lipofilo e renderla capace di assorbire luce UV. Facendo riferimento a dati riportati in letteratura, abbiamo usato come agente derivatizzante il benzoil cloruro. Il passaggio successivo è stato la realizzazione del polimero, basata sulla sintesi di recettori polimerici sintetici (K. Haupt, 2000; K. Mosbach et al., 1998).

I MIPs sono dei polimeri reticolati formati dalla pre-organizzazione di monomeri funzionali intorno ad un analita (template) e successivamente polimerizzati. Dopo la rimozione del template il polimero tridimensionale rigido, reticolato, è capace di avere interazioni specifiche solo con questo analita o con molecole strutturalmente molto simili (P. Cormach and K. Haupt, 2000).

L'imprinting molecolare è utile in numerose applicazioni in cui il riconoscimento molecolare risulta di fondamentale importanza tra cui catalisi, cromatografia, intelligent drug delivery, estrazione in fase solida, biosensori, screening di librerie chimiche combinatoriali ed altre (M. Quaglia et al., 2001; F. Puoci et al., 2004).

Questa versatile tecnica ha suscitato negli ultimi anni l'interesse di molte industrie farmaceutiche quali Pfizer (R. Venn and R. J. Goody, 1999), GlaxoSmithKline (M.P. Davies et al., 2002), Astrazeneca (P. Martin, 2002) e altre sono nate proprio con lo

scopo di commercializzare tali materiali (Elipsa, MIP Technologies, etc.).

L'imprinting molecolare mostra di avere caratteristiche di interazione molecola-polimero comparabili a quelle osservate nel riconoscimento dei sistemi biologici antigene-anticorpo. I maggiori vantaggi nell'uso dei MIPs, comparati con i loro equivalenti biologici, sono relativi alla loro stabilità meccanica e chimica.

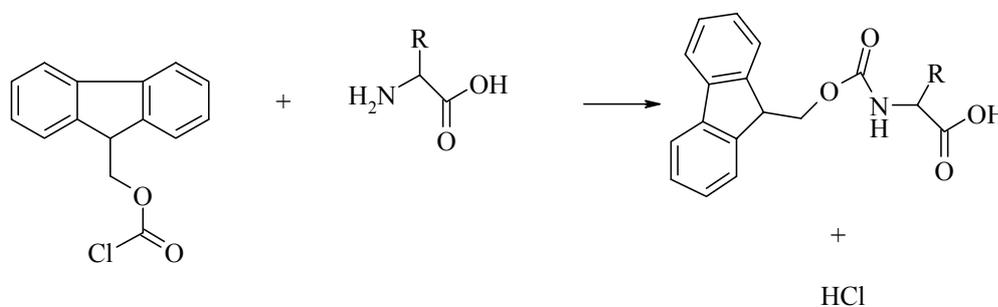
I polimeri realizzati durante il presente lavoro sono stati utilizzati come fasi stazionarie per l'estrazione in fase solida di alcune soluzioni standard di omocisteina. Tramite misure mediante HPLC è stato possibile verificare l'effetto di imprinting e determinare la quantità di omocisteina trattenuta dalla matrice polimerica.

Determinazione quantitativa degli amminoacidi

Ormai da qualche anno, data la necessità sempre crescente di effettuare dosaggi di diversi analiti e sostanze in substrati di differente natura, è emerso il bisogno di trovare una tecnica affidabile e riproducibile anche per la determinazione quantitativa degli amminoacidi e delle ammine presenti in uno stesso campione, seppure in concentrazioni considerevolmente variabili. L'analisi di tutte quelle matrici naturali (vino, formaggi, carne, pesce, tessuti, matrici biologiche umane) laddove la presenza di queste sostanze è variabile in concentrazione, richiede un metodo di riconoscimento appropriato e simultaneo. Un problema nella determinazione degli amminoacidi riguarda il loro difficile riconoscimento, legato alla loro insolubilità in solventi organici e allo scarso assorbimento nel range di lunghezza d'onda UV-visibile. L'amminoacido libero non può essere dosato per via cromatografica senza l'opportuna derivatizzazione (Cheuk-Fai Chow et al., 2002). E' necessario quindi operare un processo di derivatizzazione, capace nello stesso tempo di aumentare la lipofilità e di rendere capace di assorbire luce UV il composto così funzionalizzato. Esistono tre diverse procedure cromatografiche legate alla determinazione di amminoacidi e ammine presenti nello stesso campione : a) analisi simultanea di amminoacidi e ammine mediante un unico step (T. Bausa et al., 1995); b) determinazione separata, dopo differente derivatizzazione, applicando diverse metodologie cromatografiche (P. Lehtonen, 1996); c) quantizzazione delle sole ammine dopo separazione dagli amminoacidi (C. Buteau et al., 1984). I vantaggi e gli svantaggi di tutte e tre le possibilità sono legati al recupero, alla riproducibilità, al tempo e ai costi

del metodo impiegato. Dal punto di vista analitico la determinazione simultanea sembra essere la scelta migliore. Tuttavia trovare le condizioni migliori di reazione, comporta un'ottima conoscenza dei processi di derivatizzazione e dell'analisi cromatografica (HPLC) dei due gruppi di composti (amminoacidi e ammine). La determinazione di ammine contenute nel campione è caratterizzata da una veloce eluizione cromatografica degli amminoacidi derivatizzati (D. Kutlan and I. Molnar-Perl, 2004), seguita da una lenta eluizione e separazione delle ammine. Alcune ammine di basso peso molecolare possono essere eluite con gli amminoacidi. Lo step di derivatizzazione è eseguito usando come reagente il FMOCl (fluorenil-metil cloroformiato), che reagisce con la funzione amminica degli amminoacidi (schema 1), formando un addotto stabile che viene analizzato mediante cromatografia HPLC (rivelatore UV, $\lambda = 254$ nm).

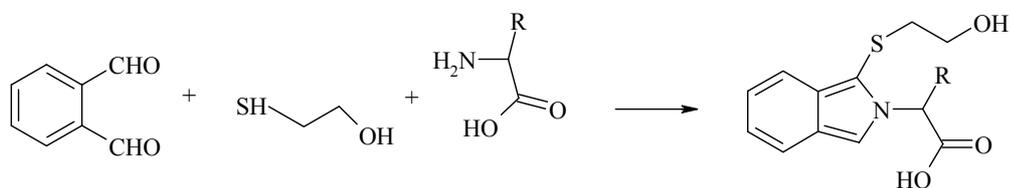
L'uso di questo composto comporta alcuni svantaggi, poiché non essendoci una buona risoluzione dei picchi nel risultante cromatogramma, l'analisi può subire qualche errore (J. Kirschbaum et al., 1994). Si è cercato di superare il problema migliorando le condizioni di reazione in modo da avere un effetto quantitativo maggiore, usando il gruppo FMOCl in buona concentrazione (circa 5 mM) e lavorando con acetone come solvente, invece che con acetonitrile.



Schema 1

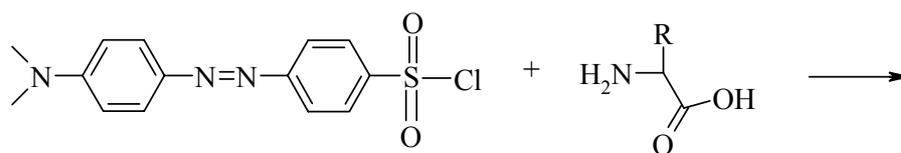
Un'applicazione di questo agente derivatizzante è consistita nella determinazione di cinque amminoacidi e otto ammine in 15 vini rossi e 15 bianchi (T. Bausa et al., 1995). Una prima analisi per HPLC per il riconoscimento di questi composti nelle urine e in alcuni estratti di tessuti è stata eseguita usando come agente derivatizzante l'OPA-ME (ortoftaldeide-2 mercaptoetanololo), avvalendosi di una identificazione di fluorescenza. Le

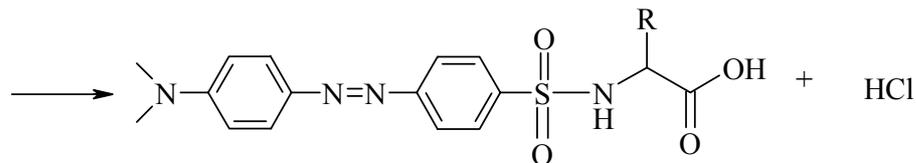
ammine primarie formano degli addotti altamente fluorescenti quando reagiscono con l'ortoftaldeide (OPA) e un mercaptano in condizioni basiche (V.R. Villanueva and R.C. Adlakha, 1978), come si può osservare nello schema 2.



Schema 2

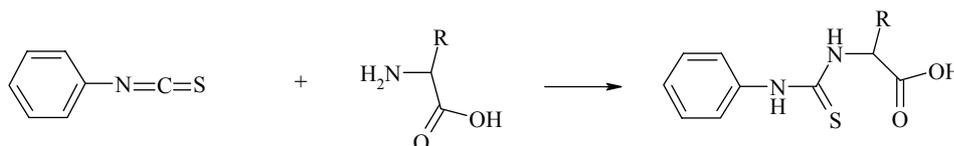
Il prodotto di questa reazione, un isoindolo sostituito, esibisce un'ottima eccitazione intorno a 330 nm, fino ad arrivare ad un'emissione massima di 465 nm. Un'idea molto vantaggiosa per la separazione è stata quella di far eluire gli aminoacidi derivatizzati con OPA-ME senza mirare alla loro quantizzazione, prima di determinare alcune ammine. Applicando un gradiente di eluizione binario, nei primi dieci minuti venivano eluiti tutti gli aminoacidi, con la successiva separazione delle quattro ammine dopo altri dieci minuti. La prima analisi simultanea avvenuta impiegando come agente derivatizzante l'OPA-ME risale al 1970 ed è stata usata per la determinazione di ventiquattro composti, mediante una cromatografia a scambio ionico (M.R. Alberto et al., 2002). Altre determinazioni sono state eseguite usando come agente derivatizzante il Dabsyl cloruro (4-dimetilamminoazobenzene-4'solfonil cloruro), usato in molte applicazioni biologiche, che assorbe a 466 nm. Si tratta di una reazione molto semplice, dove l'azoto dell'amminoacido reagisce con il gruppo solfone del Dabsyl con formazione di acido cloridrico, come da schema 3. Come solventi in genere vengono usati il DMSO, ovvero dimetilsolfossido o la DMF, ovvero dimetilformammide (L. Krause et al., 1995).





Schema 3

Un altro processo di derivatizzazione è ottenuto facendo reagire l'amminoacido libero, in condizioni basiche, con il fenilisotiocianato (L. Krause et al., 1995), un gruppo cromoforo che assorbe a 254 nm, per fornire un feniltiocarbamil-amminoacido che può essere determinato per HPLC (schema 4). L'identificazione e la successiva quantificazione degli amminoacidi con questa metodologia sono usate principalmente nell'analisi di campioni di plasma umano e di urine (A.R. Ivanov et al., 2000).



Schema 4

L'omocisteina

L'omocisteina (HCY) è un amminoacido solforato (acido-2-ammino-4-mercaptobutirrico) presente nel plasma sanguigno, sintetizzato per la prima volta nel 1932 da Du Vigneaud (J. D. Finkelstein and J.J. Matin, 2000) nel corso dei suoi studi condotti sulla chimica dello zolfo e sul metabolismo (figura 19). Come amminoacido libero esiste sia nella forma ridotta (un tiolo, RSH) che ossidata (un disolfuro, RSSR).

Nella sua forma ridotta è caratterizzata dal gruppo tiolico che si ossida in presenza di un accettore di elettroni, come l'ossigeno molecolare, per formare il disolfuro (S-S). L'omocisteina è un amminoacido molto importante che possiede un gruppo tiolico libero e come tale ha un ruolo fondamentale all'interno di matrici fisiologiche e si forma durante il metabolismo metionina-cisteina (J. Kirschbaum et al., 1994).

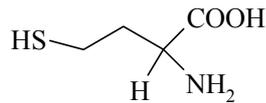


Figura 19

La metionina (figura 20), un amminoacido essenziale, è l'unica sorgente di omocisteina nel corpo umano.

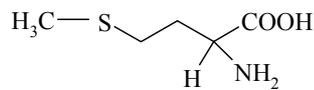


Figura 20

La distribuzione di omocisteina tra i differenti tessuti e compartimenti intracellulari rappresenta un importante fattore, dipendente dalla sua concentrazione fisiologica stessa. Nei sistemi biologici l'omocisteina è presente come omocisteina disolfuro (RSSR), come disolfuro misto con altri tioli a basso peso molecolare (RSSR') e come omocisteina disolfuro reticolata alle proteine (RSS-proteina). La distinzione tra le varie forme è importante poiché l'ossidazione dell'omocisteina dipende dalla presenza del gruppo tiolico. In individui normali la forma ridotta di omocisteina libera rappresenta meno dell'1-2% di quella totale presente nel plasma, mentre gli altri disolfuri a basso peso molecolare e i disolfuri misti sono presenti per circa il 10-30% e le proteine disolfuro legate all'omocisteina per il 70-80%. La presenza di queste proteine legate all'omocisteina costituisce una seria difficoltà nello sviluppare dei metodi sicuri e automatizzati per la sua determinazione. La concentrazione usuale di omocisteina totale riportata in alcuni studi condotti su persone in buona salute varia tra 5 e 15 μM (J. Kirschbaum et al., 1994). La determinazione dell'HCY nei corpi fluidi, specialmente nel plasma del sangue umano, in questi ultimi anni sta ricevendo molta attenzione a causa di una crescente evidenza che correla l'iperomocisteinemia (aumento del livello di HCY nel plasma) a disfunzioni cardiovascolari (A. Mansoor et al., 1992). Gli intervalli di concentrazione significativi per una valutazione primaria dell'iperomocisteinemia sono essenzialmente tre: un valore compreso tra 15-30 μM di omocisteina totale è associato

ad una moderata iperomocisteinemia, tra 30-100 μM ad una iperomocisteinemia intermedia e al di sopra di 100 μM ad una grave iperomocisteinemia (H. Refsum et al., 1998). L'HCY è tossica nei confronti delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (D. Robinson and K. Mosbach, 1989) ed elevati livelli nel plasma possono indurre a disfunzioni vascolari che possono portare all'arteriosclerosi e ad altre gravi patologie.

L'omocisteina non partecipa alla sintesi proteica e si trova nel plasma soprattutto sotto forma di disolfuri misti quali omocistina e cisteina, sia liberi che legati alle proteine. La metionina proveniente dall'alimentazione viene convertita in S-adenosilmetionina e successivamente in S-adenosilomocisteina, la quale a sua volta viene idrolizzata a omocisteina.

A questo punto l'omocisteina può seguire due strade metaboliche diverse:

- 1) può essere metilata e divenire nuovamente metionina ad opera dell'enzima 5-10-metilen-tetraidrofolato redattasi, in presenza di vitamina B₁₂ come co-fattore e di n-metil-tetraidrofolato come donatore di gruppi metilici (-CH₃);
- 2) legandosi alla serina può essere convertita prima in cistationina e poi in cisteina ad opera dell'enzima cistationina- β -sintetasi in presenza di vitamina B₆.

Quando una delle vie è impedita per deficit totale del sistema enzimatico si ha l'accumulo di omocisteina e vi possono essere due situazioni di aumento delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina:

1. soggetto affetto da deficit totale di una delle due vie;
2. soggetto affetto da deficit parziale di una delle due vie.

La iperomocisteinemia grave, da deficit totale, determina grandi accumuli di HCY ed è caratterizzata clinicamente da alterazioni oculari, scheletriche, vascolari e del sistema nervoso centrale. Inoltre esiste l'evidenza della correlazione di elevate concentrazioni di omocisteina con alcuni tipi di cancro (J. Tallova et al., 2001). La lussazione del cristallino e il ritardo mentale sono caratteristiche dell'iperomocisteinemia grave. L'incidenza di questa patologia è, secondo alcuni autori, di 1:200.000 individui della popolazione generale. In questi pazienti vi è un marcato incremento dei livelli plasmatici di HCY (fino ad oltre 400 $\mu\text{M/l}$) e a questo evento si associano malattie cardiovascolari su base arteriosclerotica ad insorgenza precoce e manifestazioni trombotiche sia arteriose che venose; sono stati pubblicati i risultati di una survey internazionale sulle manifestazioni cliniche e sulla evoluzione naturale della malattia in 629 pazienti affetti

da iperomocisteinemia da deficit di cistationina- β -sintetasi. Complicanze tromboemboliche erano presenti in 158 pazienti (25%), per un numero totale di 253 eventi trombotici così suddivisi:

- 51% di trombosi venose degli arti (complicate da embolia polmonare nel 25% dei casi);
- 32% di eventi cerebrovascolari acuti;
- 6% di ostruzioni arteriose periferiche;
- 11% di infarto del miocardio.

Le malattie vascolari occlusive e trombotiche sono la causa della morte prematura dei soggetti con valori elevati di HCY plasmatica; elevate concentrazioni di HCY sono un fattore di rischio indipendente di coronaropatia precoce nell'uomo. Recentemente è stato calcolato che un incremento di 5 μ mol/l della HCY aumenta il rischio di coronaropatia come un aumento di 20 mg/dl della colesterolemia. La iperomocisteinemia lieve da deficit parziale determina, in condizione di digiuno, un lieve aumento delle concentrazioni plasmatiche di HCY; tali concentrazioni però aumentano notevolmente quando si introducono con la dieta o con farmaci quote anche irrilevanti di metionina, poiché questa viene trasformata in omocisteina. La sua trasformazione secondo le due vie sopra descritte viene rallentata e pertanto si assisterà ad un temporaneo e consistente aumento delle concentrazioni plasmatiche di HCY. Tale condizione simula una iperomocisteinemia grave e quindi in un lasso di tempo più o meno lungo il soggetto è sottoposto ad un rilevante aumento del rischio di malattie vascolari. L'iperomocisteinemia moderata da deficit parziale è un fenomeno subdolo, potenzialmente pericoloso e notevolmente diffuso nella popolazione, essendo riscontrabile nel 5-7 % della popolazione generale e viene anch'esso classificato come fattore di rischio indipendente di malattie vascolari. Poiché è possibile tenere sotto controllo tale forma di dismetabolismo sia con farmaci come folati, vitamine B₁₂ e B₆, che con la dieta, una diagnosi precoce può essere decisiva nel contribuire ad attenuare notevolmente il rischio di danni gravi ed irreversibili nei soggetti portatori di moderata iperomocisteinemia. La similarità strutturale tra cisteina, omocisteina e metionina, comporta delle difficoltà nel riconoscimento selettivo di ogni specie mediante processi diretti, ecco perché sono stati sviluppati una serie di protocolli analitici che permettono la separazione e il successivo riconoscimento di questi composti.

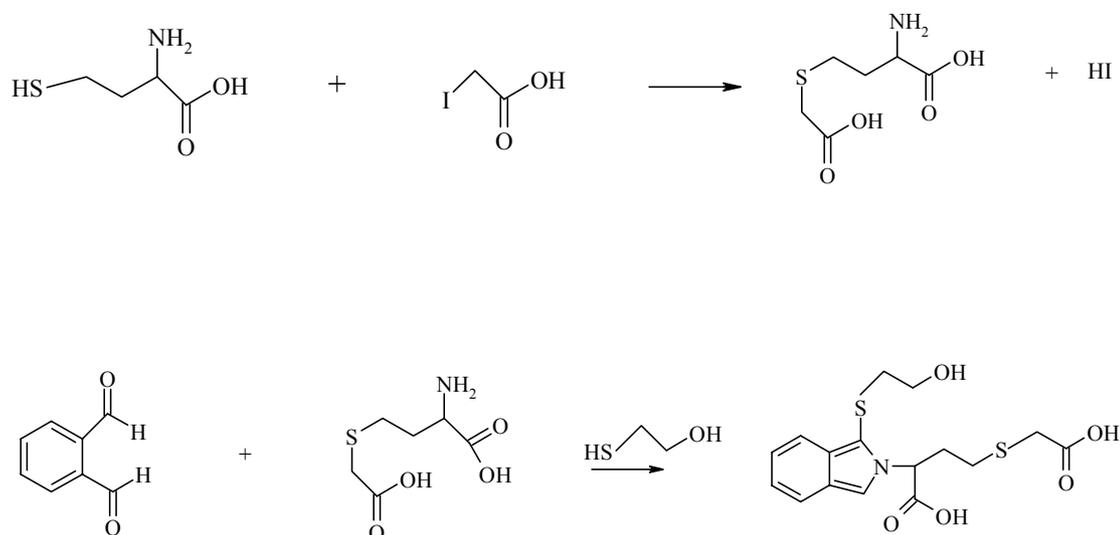
Metodi di riconoscimento

La ricerca di protocolli analitici per la determinazione dell'omocisteina è andata via via espandendosi e pertanto numerosi metodi applicabili praticamente sono stati riportati in letteratura. Nel corso degli anni le metodologie tradizionali sono state migliorate a beneficio di nuovi processi più raffinati e precisi. In generale i campioni contenenti omocisteina subiscono un pre-trattamento prima di passare alla loro identificazione. Questo è costituito da tre tappe fondamentali: a) l'omocisteina è convertita in una specie tiolica libera per riduzione del legame -S-S- ; b) le proteine presenti nella matrice del campione da analizzare sono precipitate nella soluzione; c) l'omocisteina può finalmente subire un processo di derivatizzazione opzionale che dipende dal tipo di metodologia usata per la sua identificazione. L'iniziale riduzione dell'HCY è di grande importanza e come tale essa va eseguita usando agenti riducenti opportuni (G. Minniti et al., 1998). La scelta dell'agente riducente può molto spesso indirizzare la successiva analisi cromatografica che dipende dal tipo di riconoscimento che viene utilizzato (S. Melnyk et al., 1999). La rimozione delle proteine è usualmente eseguita mediante un opportuno agente precipitante. Esempi di tali agenti sono: acido sulfosalicilico, metanolo, acido perclorico, acido tricloroacetico, acido meta-fosforico. La scelta di questi agenti dipende dalla matrice che si sta analizzando e pertanto l'uso di ognuno va fatto in maniera molto ponderata. Il passaggio finale di derivatizzazione dipende spesso dal metodo di riconoscimento che viene utilizzato. L'uso dell'HPLC come tecnica di separazione è stato spesso preferito per il riconoscimento dell'omocisteina totale, in quanto può essere facilmente automatizzato e allo stesso tempo accoppiato con altre metodologie (K. Rasmussen and J. Moller, 2000). Sono state comunque sviluppate altre tecniche di determinazione che si avvalgono di reagenti e strumentazioni diverse, ma che sono altrettanto valide per la risoluzione del problema. Il riconoscimento elettrochimico ad esempio presenta dei vantaggi rispetto alla fluorescenza e alla spettroscopia, in quanto le misure possono essere eseguite direttamente alla superficie dell'elettrodo, senza un'ulteriore derivatizzazione prima della separazione del campione (M. R. Malinov et al., 1989). L'ossidazione elettrochimica di omocisteina a omocistina alla superficie dell'elettrodo rappresenta una tecnica molto diffusa, usata per un ampio numero di composti. Al contrario della maggior parte delle metodologie di riconoscimento

elettrochimiche, la determinazione di omocisteina mediante fluorescenza è basata fortemente sulla derivatizzazione dell'amminoacido (A. R. Ivanov et al., 2000).

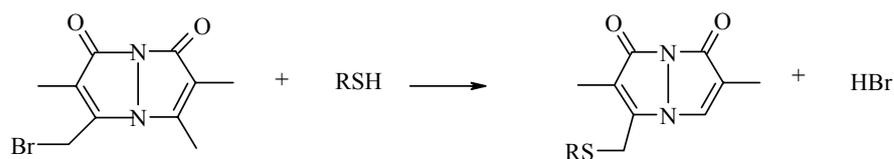
Gli agenti derivatizzanti che vengono usati sono in grado di produrre segnali di fluorescenza in presenza di agenti tiolici. L'ortoftalaldeide (OPA) produce una veloce derivatizzazione e per questa ragione viene usata per un certo numero di amminoacidi contenenti gruppi tiolici (Y.V. Tcherkas and A.D. Denisenko, 2001).

Il processo di derivatizzazione non avviene direttamente, infatti l'omocisteina viene protetta con acido iodoacetico sulla funzione tiolica, per poi essere derivatizzata con OPA in presenza del 2-mercaptoetanolio sulla funzione amminica, formando un isoindolo altamente fluorescente (schema 5), che assorbe intorno a 330 nm.



Schema 5

Un altro reagente non tiolo-specifico, ma che riesce a dare comunque un buon recupero di omocisteina è il monobromobimano, dotato di fluorescenza in quanto dà luogo a prodotti di degradazione aventi tali proprietà, i quali si vengono a formare nella fase di pre-trattamento del campione (T. Fiskerstrand et al., 1993), secondo lo schema 6.



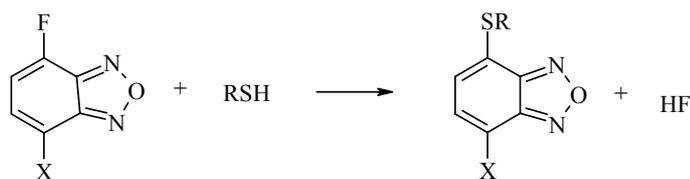
Schema 6

Quando viene usato in metanolo esso agisce simultaneamente come agente precipitante delle proteine, facendo risparmiare sui tempi di trattamento del campione (S. T. Chou et al., 2001). Questo composto è stato adoperato nella cromatografia di tipo HPLC, per la determinazione quantitativa di alcuni composti ammino-tiolicici tra cui l'omocisteina, in campioni di plasma umano.

La procedura standard richiede una serie di passaggi: 1) riduzione del ponte disolfuro con trifenilfosfina; 2) deproteinizzazione con acido sulfosalicilico; 3) derivatizzazione dell'amminoacido ridotto con monobromobimano; 4) separazione del complesso amminotiolo-analita per HPLC.

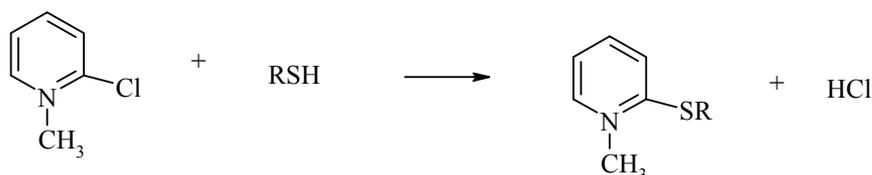
Il metodo presenta alcuni vantaggi: a) semplice procedura di preparazione del campione; b) bassa velocità di idrolisi in condizioni ottimali di pH (~ 8.5) e temperatura della reazione di derivatizzazione; c) determinazione di tutti gli ammino-tioli a basso peso molecolare presenti nel plasma; d) una fase mobile semplice e comune.

L'applicazione di questa procedura analitica dimostra che è possibile determinare HCY a concentrazioni patologiche nel plasma umano con una buona affidabilità. Il metodo descritto è stato semplificato e ottimizzato nelle procedure di riduzione e derivatizzazione per ottenere il complesso tiolo-agente derivatizzante con le massime rese. L'agente derivatizzante più usato nell'analisi dell'omocisteina è l'ammonio 7-fluoro-benzo-2-oxa-1,3-diazolo-4 solfonato, ovvero SBD-F (schema 7), che mostra segnali di fluorescenza senza formare prodotti di degradazione (J.B. Ubbink et al., 1999), al contrario del monobromobimano.



Schema 7

Esso ha il vantaggio di favorire l'eluizione del complesso con l'omocisteina dagli altri composti tiolici presenti nel campione, grazie alle sue proprietà di riconoscimento specifiche. L'uso del metodo di riconoscimento UV/vis non è generalmente riportato in letteratura; le poche procedure conosciute mostrano comunque una buona sensibilità verso la determinazione di omocisteina. Un comune reagente, il 2-cloro-1-metilpiridinio ioduro (CMPI), è stato riportato come agente derivatizzante. Esso reagisce rapidamente e specificamente in ambiente leggermente alcalino per formare composti stabili S-piridinio (E. Kaniowska et al., 1998), che possono essere misurati spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di circa 310 nm. (schema 8).



Schema 8

L'elettroforesi capillare (CE) è stata recentemente sviluppata come tecnica complementare al metodo più tradizionale, l' HPLC, in quanto si tratta di un semplice, rapido ed efficiente metodo di separazione per l'analisi biomolecolare (S. H. Kang et al., 2000). Associata ad un riconoscimento di fluorescenza laser-indotto (LIF), l'elettroforesi capillare è stata applicata per determinare amminoacidi e ammine in vari campioni come proteine, urine, plasma (H. T. Chang and E. S. Yeung, 1993). Come agenti derivatizzanti i più usati, specie per la cisteina e l'omocisteina, sono l'SBD-F e l'ABD-F (4-amminosolfonil-7-fluoro-2,1,3-benzooxadiazolo), grazie alla loro eccellente reattività, selettività e ad una buona stabilità nei confronti dei composti tiolici (R. Chien and D. S.

Burgi, 1991). L'ABD-F reagisce più velocemente e in condizioni più blande rispetto all'SBD-F. La reazione è circa trenta volte più veloce e viene completata quantitativamente in cinque minuti. Sono state riportate alcune applicazioni basate sulla cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), che forniscono un riconoscimento abbastanza sensibile, anche se i protocolli di derivatizzazione richiedono tempi lunghi e reagenti organici molto costosi. L'applicazione di questa metodologia si è avuta in alcuni pazienti con premature disfunzioni cardiovascolari, per la determinazione dell'iperomocisteinemia basata sulla misura di HCY presente nel plasma nell'arco di 2, 4 o 6 ore, dopo aver somministrato un'alta dose di metionina (0.1 g/kg). Un problema riguardante questo metodo è che esso non permette di distinguere tra HCY endogena e HCY derivata dalla somministrazione della metionina. Inoltre il metodo non può chiarire quale percorso viene danneggiato nel metabolismo metionina-omocisteina. L'uso di standard interni etichettati isotopicamente per l'analisi GC-MS offre molti vantaggi, poiché questi si comportano in modo quasi identico all'analita attraverso i passaggi di estrazione, derivatizzazione e cromatografia. Sono state scelte come standard analitico interno la [$^2\text{H}_4$] metionina e la [$^2\text{H}_4$] omocisteina opportunamente derivatizzate con quattro atomi di deuterio. Uno dei maggiori vantaggi di questa tecnica è che i composti endogeni ed esogeni aventi la stessa struttura possono essere facilmente differenziati somministrando delle quantità di metionina etichettata isotopicamente.

La determinazione quantitativa dei composti ammino-tiolicici viene realizzata confrontando i rapporti fra le aree dei picchi dei campioni incogniti con quelle ottenute dalle miscele standard etichettate isotopicamente (Y. Shinohara et al., 2001). La GC-MS è ormai considerata come un metodo accurato e specifico per la determinazione di piccole quantità di sostanze nei materiali biologici.

Discussione

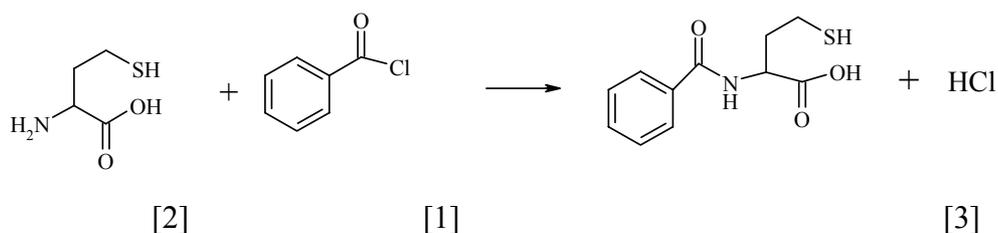
Le metodologie descritte per la determinazione dell'omocisteina, benché siano abbastanza precise, richiedono procedure analitiche lunghe e l'uso di reagenti costosi e facilmente degradabili. L'obiettivo del presente lavoro è stato pertanto quello di cercare una valida alternativa a questi metodi, che dia la possibilità di monitorare il livello di omocisteina libera, facendo uso di reagenti commercialmente disponibili a costi

accessibili. L'imprinting molecolare può certamente rappresentare una valida alternativa, date le sue selettività e versatilità. Si tratta di un processo mediante il quale monomeri funzionali e reticolante sono co-polimerizzati in presenza dell'analita, che agisce come molecola templante. La successiva rimozione dal network polimerico del templante lascia alcuni siti di legame che sono complementari all'analita. I vantaggi offerti nel riconoscimento molecolare dall'imprinting sono: a) siti recettoriali con una notevole specificità per l'analita, comparabile a quella osservata nel riconoscimento dei sistemi biologici antigene-anticorpo; b) facile realizzazione accoppiata ad elevata robustezza del polimero e ripetibilità dei saggi di rebinding.

Lo studio svolto riguarda la sintesi di un polimero dotato di memoria molecolare, ottenuto usando come molecola templante l'omocisteina opportunamente derivatizzata. Essendo infatti l'omocisteina non rilevabile mediante spettrofotometria UV-visibile, è stato necessario l'uso di un opportuno agente derivatizzante, così da renderla più lipofila e allo stesso tempo rilevabile spettrofotometricamente. La lipofilia dell'omocisteina è in questo caso indispensabile poiché la sintesi del polimero in questione avviene in solventi organici e non in acqua. La ricerca di un composto avente tali caratteristiche non è stata semplice. Bisognava infatti tenere in considerazione alcuni fattori tra cui, al primo posto, la sua disponibilità commerciale a costi accessibili. La scelta dell'agente derivatizzante da usare è ricaduta sul benzoil-cloruro, un composto disponibile a costi non elevati, stabile a temperatura ambiente, che ben si presta alle nostre esigenze. Lo "step" successivo è stata la sintesi del MIP (Molecularly Imprinted Polymer) dell'omocisteina. I polimeri sono stati realizzati in soluzione, in una miscela di solventi a 60 °C, fornendo così il monolite che, frantumato e setacciato, ha fornito le particelle polimeriche utilizzate per essere impaccate in appositi supporti per l'estrazione in fase solida, ovvero delle cartucce per MISPE (Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction). Sono stati preparati anche i polimeri senza il templante, ovvero NIPs (Non-imprinted Polymers), per comparare l'effetto di ritenzione di questi con i MIPs e quindi verificare l'ottenimento dell'effetto imprinting. Il polimero con memoria molecolare così ottenuto può essere usato come fase stazionaria per l'estrazione in fase solida e fungere da matrice di riconoscimento per l'amminoacido omocisteina. Tramite analisi HPLC è possibile determinare la quantità di omocisteina derivatizzata.

Derivatizzazione dell'omocisteina

La prima fase del lavoro svolto è consistita nel trovare un opportuno agente derivatizzante, tra i tanti presenti in letteratura (I. Molnar-Perl, 2003). Ortoftalaldeide, monobromobimano, SBD-F, CMPI, CQMT, ABD-F, sono tutti potenziali agenti derivatizzanti che però non rispondono ai requisiti ricercati nel progetto che si sta descrivendo. Infatti, oltre ad essere costosi, sono instabili a temperatura ambiente e richiedono un pre-trattamento del campione prima di essere usati. Il benzoil cloruro [1] (H. L. Holland et al., 2000), diversamente, è stabile a temperatura ambiente, dà una reazione selettiva e quantitativa con l'omocisteina [2], così da ottenere il suo benzoil-derivato [3] in acqua, a pH 10, con resa dell'85% (schema 9).



Schema 9

L'obiettivo era l'ottenimento del prodotto di monobenzoilazione, funzionalizzando l'omocisteina solo sull'azoto ed evitando la benzoilazione anche sullo zolfo. A tal proposito non è stato impiegato nessun accorgimento, come ad esempio l'uso di un gruppo protettore prima della reazione di derivatizzazione. La selettività della reazione infatti viene garantita dalla maggiore nucleofilicità dell'azoto rispetto allo zolfo, come riportato in letteratura (H. L. Holland et al., 2000). Questo può essere spiegato in termini di teoria "hard-soft", secondo la quale le interazioni tra gli atomi sono di tipo "hard-hard" o "soft-soft". L'azoto, essendo più "hard" dello zolfo, reagisce con il carbonio del derivato carbossilico avente anch'esso carattere "hard". La successiva colonna cromatografica sul prodotto di reazione ha fornito una resa del 60%.

Sintesi dei polimeri a memoria molecolare

Per la realizzazione di una fase stazionaria da usare nell'estrazione in fase solida ci si è concentrati sulla sintesi dei polimeri a memoria molecolare. La tecnica scelta per la realizzazione di tali matrici polimeriche è stata la polimerizzazione in monolito.

La matrice realizzata è costituita da un sistema polimerico altamente reticolato, contenente siti di legame caratterizzati da interazioni non covalenti, come i legami a idrogeno e le interazioni elettrostatiche. Per realizzare un polimero avente queste caratteristiche è stato necessario operare le scelte più opportune in termini di monomeri funzionali, reticolante e solvente. Da ricerche bibliografiche è emerso che un tipico monomero funzionale per l'imprinting non covalente è l'acido metacrilico (figura 21), che è stato per la prima volta proposto da Mosbach (Mosbach, 1994) ed è stato utilizzato come monomero funzionale per una varietà di templanti: peptidi, nucleotidi, farmaci, erbicidi e ioni inorganici. Questo monomero funzionale deve essere usato in eccesso poiché le interazioni presenti nel polimero sono deboli, quindi occorre aumentare la selettività dei siti di binding.

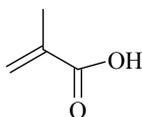


Figura 21

Un altro monomero che viene utilizzato per favorire la formazione di interazioni selettive idrofobiche con la molecola templante è la N,N-dimetil-acrilammide (figura 22).

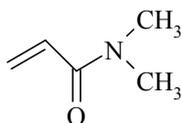


Figura 22

Un altro fattore importante nell'imprinting molecolare è costituito dal reticolante e sia la natura che la quantità di questo utilizzate sono fondamentali per ottenere un'alta affinità dei siti di binding. Anche in questo caso la scelta non è univoca, essendoci vari composti in grado di assolvere a tale ruolo. Per monomeri funzionali di tipo stirenico viene usato il divinilbenzene, che può essere vantaggioso in condizioni più estreme, dove reticolanti esterei possono subire idrolisi. Quello che però viene usato con più frequenza, come riportato in letteratura (Ester Caro et al., 2002), è l'etilenglicoldimetacrilato (figura 23), che conferisce una maggiore rigidità al polimero ed è compatibile con i monomeri funzionali più frequentemente usati.

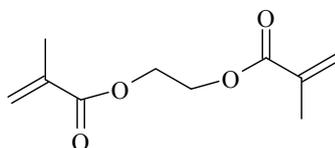


Figura 23

Il solvente funge da agente porogeno ed è pertanto fondamentale nel conferire una struttura macroporosa, così da permettere alle molecole da riconoscere un facile accesso ai siti con memoria molecolare nei processi di rebinding; esso deve essere in grado allo stesso tempo di solubilizzare con facilità i monomeri funzionali, il reticolante, l'iniziatore e l'analita durante il processo di polimerizzazione. In genere, per ottimizzare le forze di legame, i migliori solventi sono quelli aventi una bassa costante dielettrica, come il toluene e il cloroformio.

Come già detto, il fine del presente lavoro è stato la determinazione dell'omocisteina derivatizzata utilizzando polimeri a memoria molecolare.

A tal proposito sono stati realizzati tre polimeri, variando i rapporti tra monomeri funzionali e solvente.

Si è sintetizzato un polimero, MIP 1, utilizzando un solo monomero funzionale, ovvero l'acido metacrilico, in una miscela dei solventi acetonitrile/dimetilformamide in rapporto 1:1. Questa strategia è in disaccordo con quanto affermato precedentemente; la DMF infatti ha un'alta costante dielettrica e diminuisce l'efficienza dell'effetto-memoria del polimero. La giustificazione di questa scelta risiede nel fatto che, essendo la solubilità dell'omocisteina derivatizzata non elevata in acetonitrile, è stato necessario

l'uso di un co-solvente per facilitarne la solubilizzazione. Per evitare l'uso della DMF e le problematiche ad essa legate abbiamo realizzato un secondo polimero, MIP 2, utilizzando come solvente solo l'acetonitrile e due monomeri funzionali: acido metacrilico e N,N-dimetilacrilammide, con la speranza di contribuire anche con interazioni idrofobiche al processo di riconoscimento dell'amminoacido derivatizzato in questione.

Il terzo polimero, MIP 3, è stato realizzato impiegando la polimerizzazione in "bulk", senza usare alcun tipo di solvente nel tentativo di aumentare l'efficienza del polimero nel riconoscimento del template.

Per poter verificare l'effetto-imprinting sono stati realizzati anche i cosiddetti "blank polymers" (NIPs), realizzati nelle stesse condizioni dei precedenti eccetto che per l'assenza del template.

In tabella 1 sono riportati i polimeri realizzati e le diverse condizioni operative.

Polimero	Solvente	Reticolante	Monomero funzionale	Template
MIP 1	DMF-CH ₃ CN	EGDMA	MAA	Omocisteina benzoilata
NIP 1	DMF-CH ₃ CN	EGDMA	MAA	-
MIP 2	CH ₃ CN	EGDMA	DMAA : MAA	Omocisteina benzoilata
NIP 2	CH ₃ CN	EGDMA	DMAA : MAA	-
MIP 3	-	EGDMA	DMAA : MAA	Omocisteina benzoilata
NIP 3	-	EGDMA	DMAA : MAA	-

Tabella 1. Polimeri sintetizzati

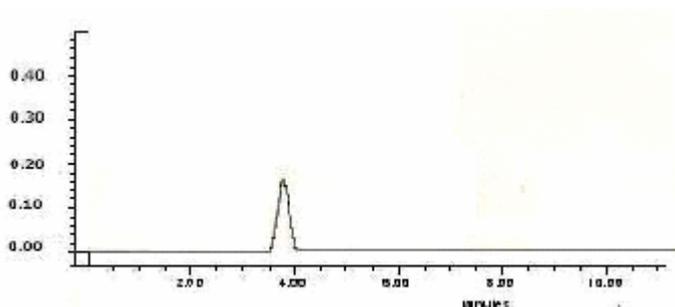
Analisi HPLC

I polimeri realizzati sono stati impaccati in appositi supporti per l'estrazione in fase solida, usandone una quantità di circa 0.5 grammi. Le colonne, condizionate con 5 ml. di acetonitrile, sono state caricate con 1 ml. (metanolo:acetonitrile 8:2) di una soluzione standard di omocisteina N-benzoilata (0.6 μ M). Quindi, dopo lavaggio con 5 ml. di una soluzione metanolo:acetonitrile (80/20), è stata eseguita l'estrazione con 5 ml. di una soluzione metanolo/acido acetico in rapporto 8:2. Gli eluati, raccolti in apposite provette, sono stati analizzati mediante HPLC per verificare l'effetto-imprinting, usando come fase eluente una miscela metanolo/acqua (1% H_3PO_4) 70:30, ad una velocità di flusso pari a 0.5 ml/min e iniettando 200 μ l di soluzione ($\lambda=254$ nm).

Analisi HPLC dell'eluato dei polimeri "MIP 1" e "NIP 1"

Dal confronto dei cromatogrammi relativi a MIP 1 e NIP 1 (figura 24) con quello della soluzione standard (figura 25) è evidente che la matrice MIP 1 mostra un buon effetto-imprinting nel riconoscimento dell'analita, avendo quasi del tutto trattenuto quest'ultimo. La figura 3.4 mostra i cromatogrammi relativi agli eluati dei lavaggi della cartuccia MISPE con una soluzione metanolo:acetonitrile (8:2), rappresentanti la quantità di omocisteina della soluzione standard non trattenuta dai polimeri MIP 1 e NIP 1.

Il "blank polymer" NIP 1, non avendo siti di interazione specifici per l'N-benzoil omocisteina, lascia passare quasi completamente l'amminoacido derivatizzato.



Cromatogramma dell'eluato metanolo : acetonitrile 80:20 "MIP 1"

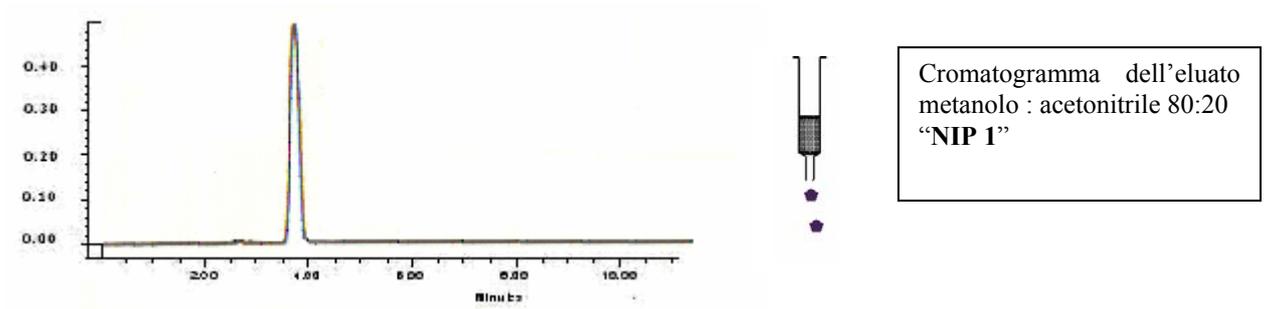


Figura 24

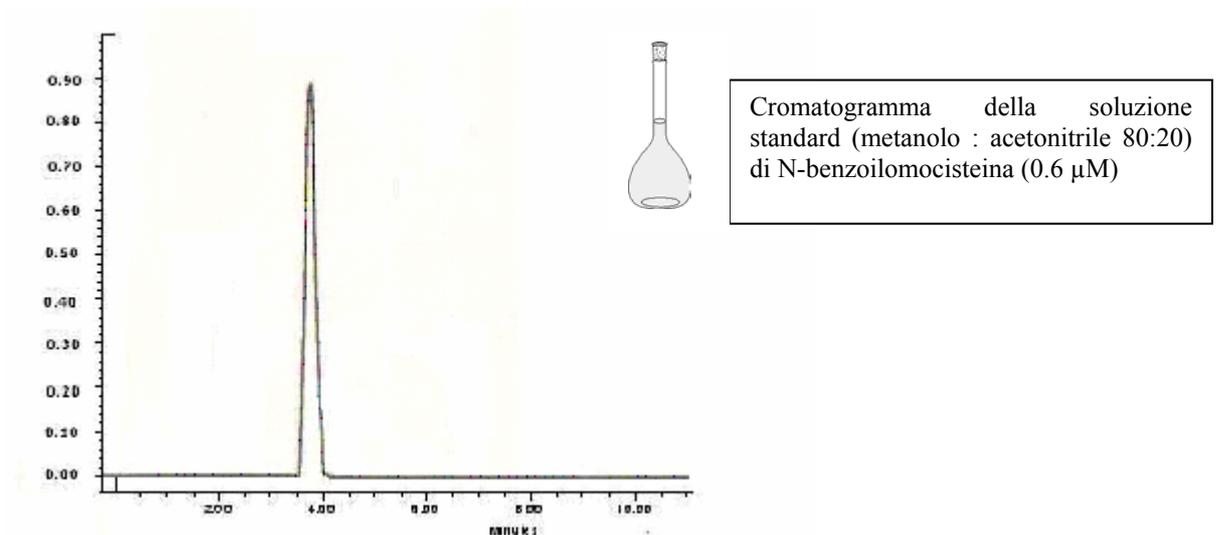
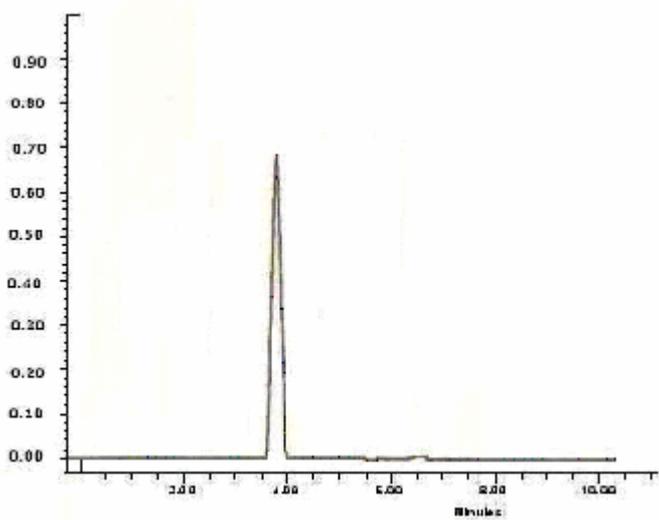


Figura 25

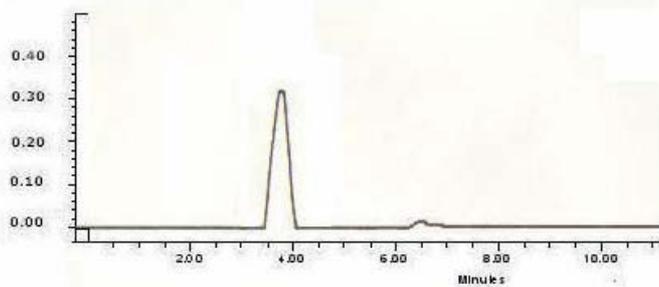
La non completa ritenzione della N-benzoil omocisteina da parte del polimero MIP 1 è da imputare alla piccola quantità di matrice polimerica impaccata nella cartuccia MISPE.

La successiva eluizione con una miscela nettamente più polare favorisce la completa rimozione dell'analita trattenuto dalla matrice MIP 1 (figura 26) e NIP 1 (figura 27).



Cromatogramma dell'eluato
metanolo : acido acetico 80/20
"MIP 1"

Figura 26



Cromatogramma dell'eluato
metanolo : acido acetico 80/20
"NIP 1"

Figura 27

Analisi HPLC dell'eluato dei polimeri "MIP 2" e "NIP 2"

Utilizzando la procedura descritta per il polimero MIP 1, l'analisi HPLC della soluzione utilizzata per il lavaggio della cartuccia MISPE ha evidenziato l'effetto-imprinting della matrice polimerica MIP 2 rispetto alla matrice NIP 2 (figura 28).

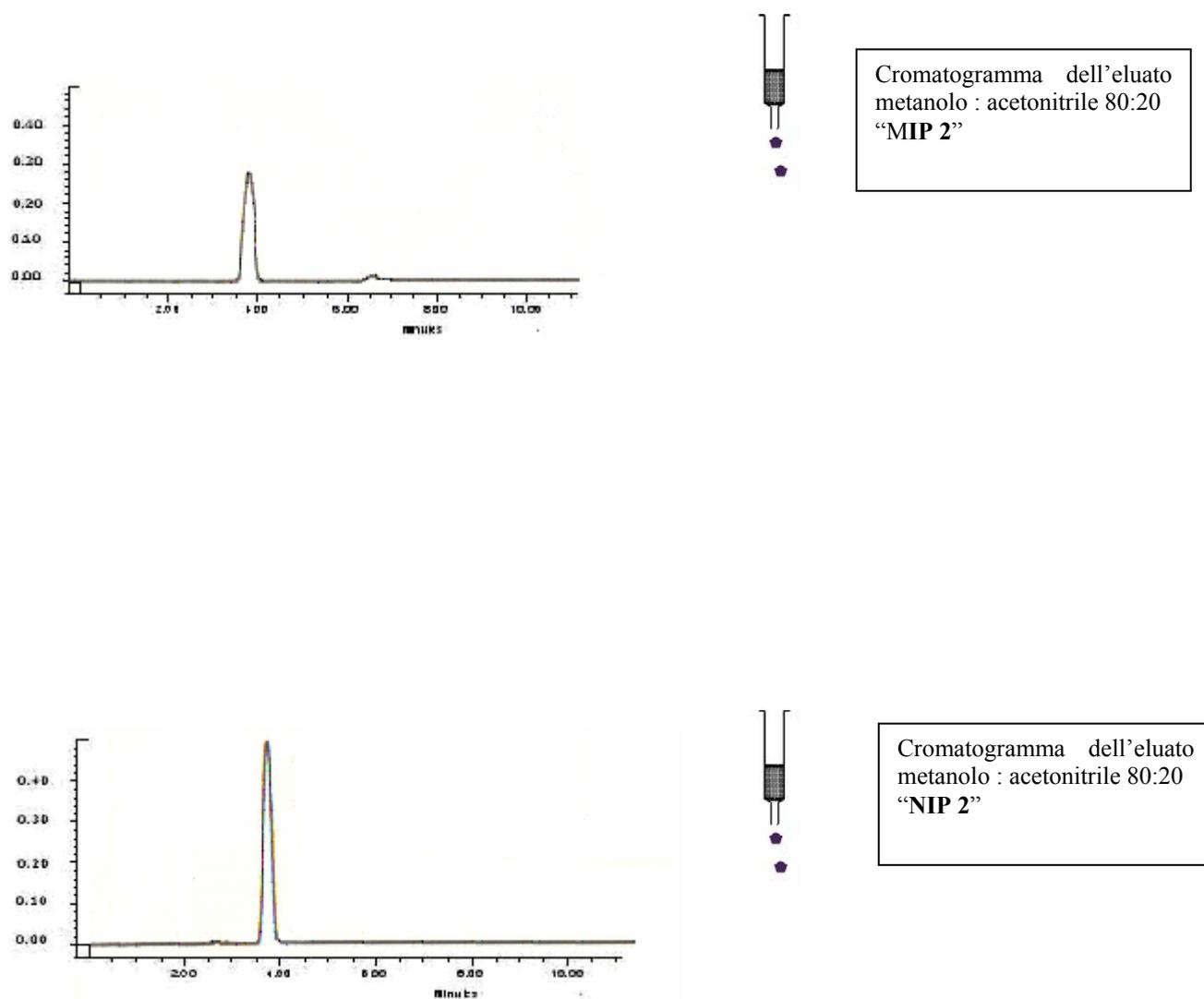


Figura 28

Come si può notare dai cromatogrammi l'entità dell'effetto imprinting in questa matrice è minore rispetto al polimero MIP 1; probabilmente la N,N'-dimetilacrilammide non contribuisce significativamente a migliorare l'effetto-memoria del polimero. Si ottiene così una minore ritenzione del templante.

In figura 29 è riportato il cromatogramma relativo alla soluzione standard di N-benzoil omocisteina (0.6 μ M).

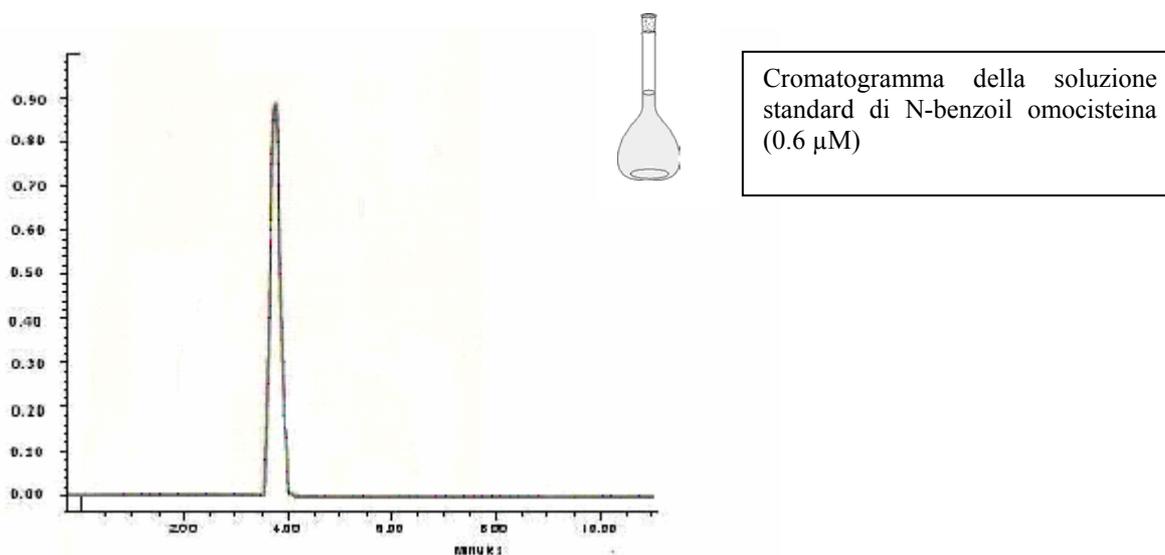
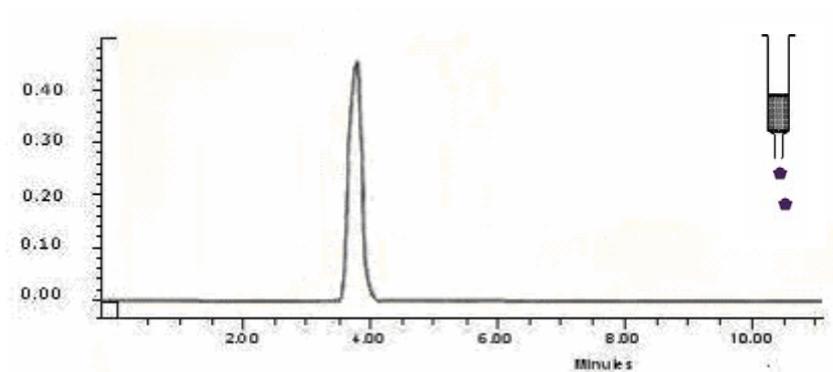


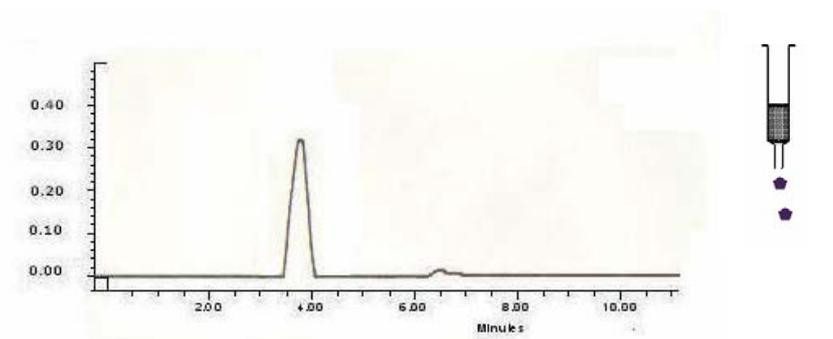
Figura 29

La successiva eluizione con una miscela nettamente più polare favorisce la completa rimozione dell'analita trattenuto dalla matrice MIP 2 (figura 30) e NIP 2 (figura 31).



Cromatogramma dell'eluato metanolo : acido acetico 80/20 "MIP 2"

Figura 30



Cromatogramma dell'eluato metanolo : acido acetico 80/20 "NIP 2"

Figura 31

Analisi HPLC dell'eluato dei polimeri "MIP 3" e "NIP 3"

Dopo aver eseguito la procedura impiegata per i primi due polimeri, il polimero a memoria molecolare ottenuto per polimerizzazione in bulk non ha dato i risultati sperati, non essendo infatti capace di trattenere l'N-benzoil omocisteina.

Dai cromatogrammi relativi al MIP 3 ed al NIP 3 (figura 32) si può osservare come il MIP 3 trattenga addirittura meno analita rispetto al suo bianco.

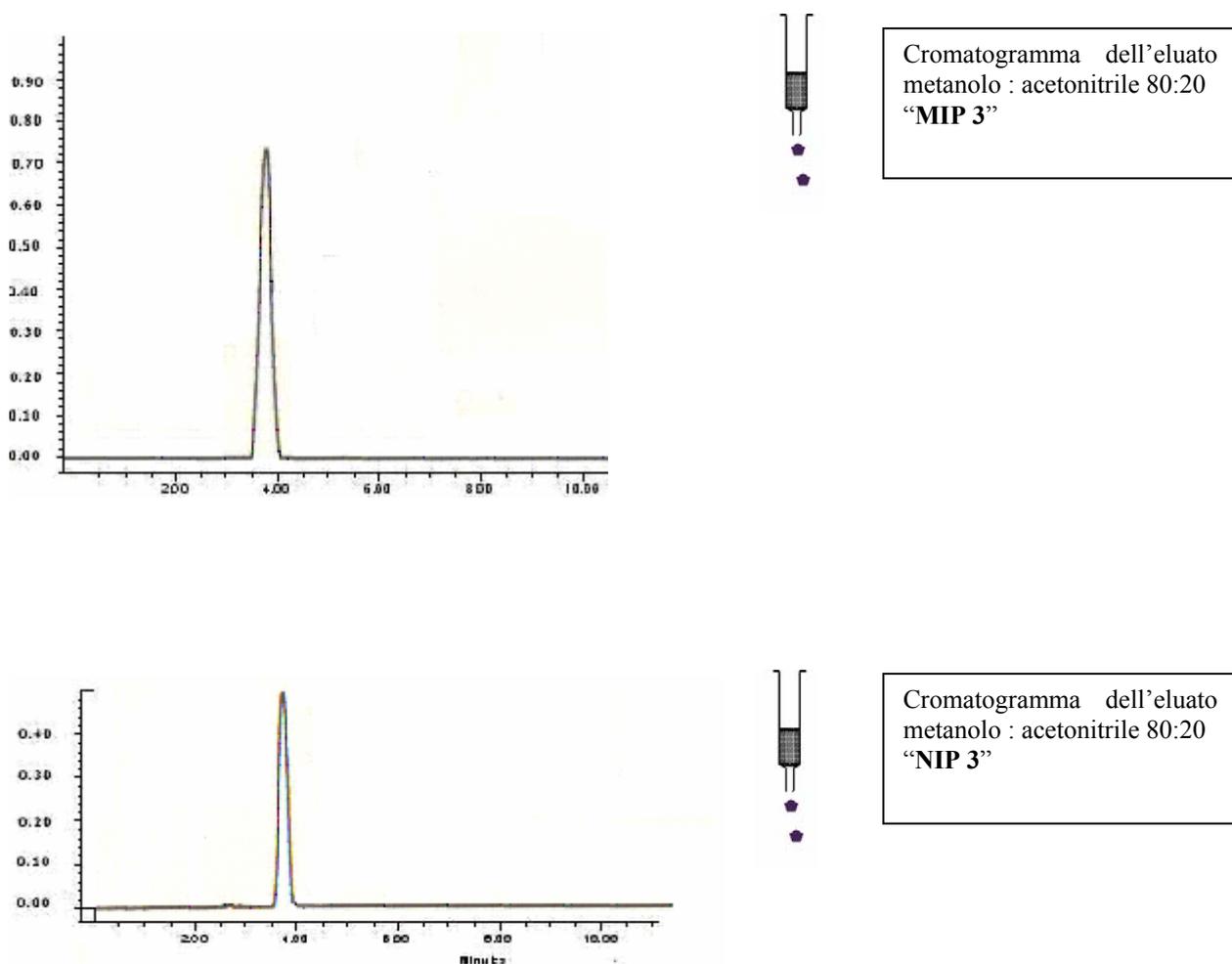


Figura 32

Estrapolazione dell'effetto-imprinting a concentrazione zero di metanolo

L'utilizzo del metanolo nella soluzione standard impiegata per valutare l'effetto imprinting è dovuto alla necessità di solubilizzare il nostro analita. Sicuramente, com'è noto da letteratura (B. Sellergren, 1999), il metanolo nei processi di riconoscimento molecolare diminuisce l'effetto-imprinting della matrice polimerica. Volendo quindi verificare quanto questa percentuale di metanolo, utilizzata nella soluzione di omocisteina e nel suo successivo lavaggio, influisce sull'interazione polimero-analita, si è deciso di testare la migliore cartuccia MISPE (MIP 1) con varie soluzioni standard contenenti la stessa quantità di N-benzoil omocisteina, ma miscele di solventi con una percentuale di metanolo sempre maggiore. Riportando su un grafico le varie assorbanze degli eluati in funzione della percentuale di metanolo nelle soluzioni standard è possibile determinare quanta N-benzoil omocisteina è trattenuta dalla matrice polimerica e quindi, tracciando una retta dei minimi quadrati estrapolata a concentrazione zero di metanolo si può valutare, almeno teoricamente, quanto questo solvente influisca sull'interazione polimero-templante (figura 33).

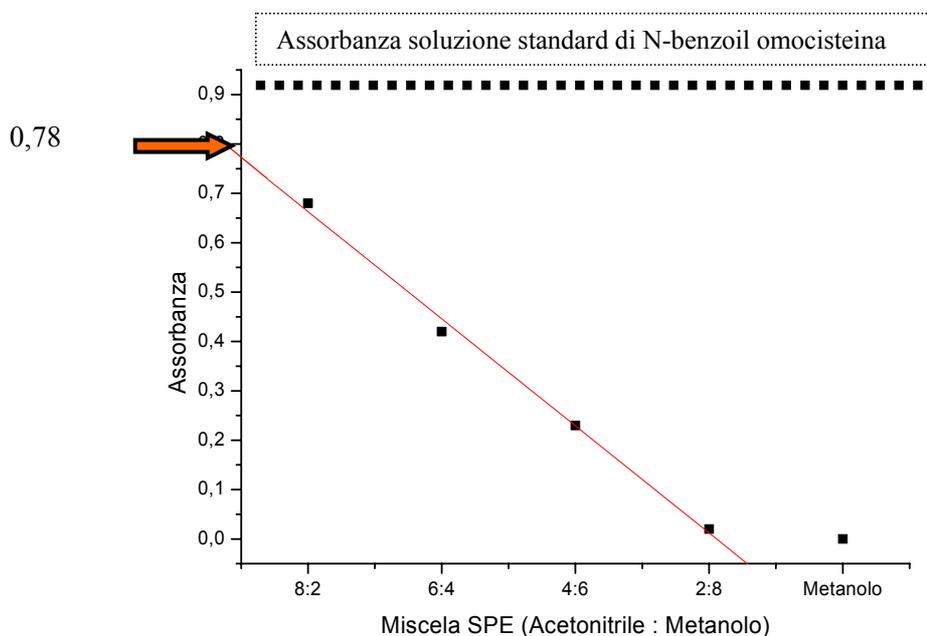


Figura 33

Come si può evincere dal grafico sembra che il metanolo a basse percentuali non influenzi significativamente l'effetto-imprinting (soluzione standard acetonitrile: metanolo 8:2). Infatti l'assorbanza è quasi paragonabile a quella estrapolata a concentrazione zero di metanolo ($A=0.78$). Aumentando la quantità di metanolo nella soluzione è possibile invece notare la perdita graduale dell'effetto-imprinting da parte del polimero.

Conclusioni

Tale ricerca ha avuto come obiettivo la realizzazione di un polimero a memoria molecolare dell'omocisteina derivatizzata, da impiegare come matrice di riconoscimento per il controllo dell'iperomocisteinemia all'interno dei fluidi biologici (plasma, urine).

Fino ad oggi le tecniche di monitoraggio utilizzate si sono avvalse di apparecchiature e reagenti costosi, nonché di metodologie laboriose.

Da queste considerazioni è sorta l'esigenza di sviluppare una nuova strategia per il riconoscimento e il successivo dosaggio dell'omocisteina che si avvallesse dell'impiego di reagenti commercialmente disponibili. La risposta a questa esigenza è stata data in primo luogo mettendo a punto la funzionalizzazione dell'omocisteina con il benzoin cloruro e successivamente realizzando la sintesi del polimero, mediante la tecnica dell'imprinting molecolare.

L'ottimizzazione del processo ha richiesto numerosi tentativi di sintesi e polimerizzazione, così da ottenere un materiale polimerico versatile e selettivo nei confronti dell'analita.

I MIPs realizzati, impiegati come fase stazionaria nell'estrazione in fase solida, si sono rilevati utili per lo screening dell'iperomocisteinemia, dimostrando attraverso l'analisi HPLC un ottimo riconoscimento molecolare e fornendo così un rilevante contributo scientifico nell'area dell'imprinting molecolare e nel settore della chimica analitica.

Capitolo VI

“Parte sperimentale”

Parte sperimentale “Sudan I”: sintesi del polimero a memoria molecolare

La fase stazionaria del MIP è stata preparata con il metodo della polimerizzazione in “bulk” (Caro et al., 2002). L’acido metacrilico e la 4-vinilpiridina sono stati usati, rispettivamente, come monomeri funzionali per preparare i MIPs secondo il metodo dell’imprinting non covalente. In breve, 2.5 mmoli di template Sudan I, 8 mmoli di acido metacrilico, 40.4 mmoli di etilen-glicole di metacrilato (EGDMA) e 103 mg. di AIBN sono stati disciolti in 4 ml. di cloroformio in una provetta di vetro con grosse pareti.

La soluzione risultante è stata sottoposta a corrente d’azoto, quindi sonicata per 10 minuti. In seguito è stata incubata in atmosfera d’azoto a 68°C per 24 ore.

Quando è stata usata la 4-vinilpiridina come monomero funzionale, le concentrazioni sono state: 2.5 mmoli di Sudan I, 8 mmoli di 4-vinilpiridina, 40.4 mmoli di etilen-glicole di metacrilato (EGDMA) e 103 mg. di AIBN; questi sono stati disciolti in 4 ml. di cloroformio.

L’EGDMA è stato usato come monomero reticolante e l’AIBN come iniziatore di radicali liberi. Il risultante grossolano polimero rigido è stato macinato fino a diventare polvere e setacciato con un setaccio d’acciaio inossidabile con maglie di 63 micron.

Il materiale polimerico del MIP così setacciato è stato raccolto e le particelle sotto forma di polvere sono state sospese in acetone; la soluzione supernatante (contenente appunto le particelle più piccole) è stata scartata.

La polvere del MIP così ottenuta è stata in seguito sottoposta ad una estrazione “Soxhlet” con 200 ml. di una soluzione acido acetico:metanolo (1:1) per circa 48 ore e successivamente ad una ulteriore estrazione con 200 ml. di metanolo per altre 48 ore.

Il materiale polimerico estratto è stato seccato in un forno alla temperatura di 60°C per tutta la notte.

La polvere del MIP così trattata è stata analizzata mediante HPLC per essere sicuri che essa fosse libera da Sudan I e da qualsiasi altro composto.

Il polimero “bianco”, da noi usato come “controllo”, è stato preparato seguendo le stesse condizioni, tranne che per il bianco (NIP) non è stata usata la molecola del template (Sudan I).

Preparazione delle colonne MISPE

Una aliquota di 500 mg. di particelle di polimero portate a secchezza è stata impaccata in una colonna da SPE in polipropilene da 6.0 ml.

Alla colonna sono stati applicati due filtri in polietilene, di cui uno all'estremità superiore e l'altro a quella inferiore; essa è stata collegata all'estrattore in fase solida attraverso una valvola. Il polimero, a questo punto, è stato lavato con metanolo e successivamente con cloroformio.

Procedura MISPE

Per valutare la funzionalità e la selettività delle colonne MISPE, il "Sudan I" è stato disciolto in cloroformio al fine di ottenere soluzioni standard con concentrazioni rispettivamente di 10, 50, 100 µg/ml. La colonna portata a secco contenente il MIP è stata a questo punto condizionata con 10 ml. di cloroformio e successivamente caricata con 1-10 ml. della soluzione standard.

L'ammontare complessivo dell'analita caricato nella colonna è stato sempre di 100 µg. Dopo aver fatto asciugare la colonna sono stati caricati 5 ml. di metanolo (solvente eluente) per portare a termine l'estrazione del "Sudan I".

MISPE in una matrice alimentare

Abbiamo deciso di determinare l'efficacia delle colonne MISPE - sempre confrontando quelle contenenti il MIP con quelle contenenti il NIP (bianco) – utilizzando una polvere rossa piccante di un comune peperoncino, adulterata con Sudan I (10 µg/g di polvere rossa piccante).

Brevemente, due grammi di tale polvere sono stati estratti con 30 ml. di cloroformio.

La soluzione ottenuta è stata filtrata e successivamente usata per caricare (12 ml.) le colonne MISPE.

Le colonne sono state in seguito lavate con 0.3 ml. di diclorometano ed infine 4 ml. di metanolo sono stati usati per l'eluizione. La quota di eluato è stata analizzata con HPLC.

Analisi HPLC

Per la cromatografia in fase liquida ci si è avvalsi di un sistema composto da “Jasco BIPI pump” e “Jasco UVDEC-100-V detector”, settato quest’ultimo ad una lunghezza d’onda di 254 nm.

È stata utilizzata una colonna “250 · 4 mm C-18 Hibar, particle size 10 µm” (Merck, Darmstadt, Germany).

La fase mobile è stata metanolo/acetonitrile (4/6, v/v) e il flusso è stato 0.5 ml/min.

Materiali

L’etilenglicole dimetacrilato (EGDMA), l’acido metacrilico (MAA), la 4-vinilpiridina (4VP) ed il 2,2'-azobis-isobutirronitrile (AIBN) sono stati acquistati dalla Aldrich.

Tutti i solventi, sia quelli analitici che quelli per HPLC, usati senza ulteriori purificazioni, sono stati forniti dalla Fluka Chemie.

Il “Sudan I” è stato comprato dalla Aldrich.

Parte sperimentale “Rotenone”: fasi di preparazione del polimero e MISPE

La fase stazionaria del MIP è stata preparata con il metodo della polimerizzazione in “bulk” (Caro et al., 2002). L’acido metacrilico è stato usato come monomero funzionale per preparare il MIP secondo il metodo dell’imprinting non covalente. In breve, 0.5 mmoli di templante rotenone, 2 mmoli di acido metacrilico, 10 mmoli di etilen-glicole dimetacrilato e 100 mg. di AIBN sono stati disciolti in 3 ml. di cloroformio in una provetta di vetro con grosse pareti.

La soluzione risultante è stata sottoposta a corrente d’azoto, quindi sonicata per 10 minuti. In seguito è stata incubata in atmosfera d’azoto a 68°C per 24 ore.

L’EGDMA è stato usato come monomero reticolante e l’AIBN come iniziatore di radicali liberi.

Il polimero così costruito, insieme ad un altro polimero “bianco”, chiamato NIP (Non Imprinted Polymer), privo della molecola-stampo (nel nostro caso il rotenone), sarà sottoposto a macinazione e setacciatura, al fine di ottenere particelle più piccole di 63 micron.

Il materiale polimerico del MIP così setacciato è stato raccolto e le particelle sotto forma di polvere sono state sospese in acetone; la soluzione supernatante (contenente appunto le particelle più piccole) è stata scartata.

La polvere del MIP così ottenuta è stata in seguito sottoposta ad una estrazione “Soxhlet” con 200 ml. di una soluzione acido acetico:metanolo (1:1) per circa 48 ore e successivamente ad una ulteriore estrazione con 200 ml. di metanolo per altre 48 ore.

Il materiale polimerico estratto è stato seccato in un forno alla temperatura di 60°C per tutta la notte.

La polvere del MIP così trattata è stata analizzata mediante HPLC per essere sicuri che essa fosse libera da rotenone e da qualsiasi altro composto.

Il polimero “bianco”, da noi usato come “controllo”, è stato preparato seguendo le stesse condizioni, tranne che per il bianco (NIP) non è stata usata la molecola del templante (rotenone).

Una aliquota di 500 mg. di particelle di polimero portate a secchezza è stata impaccata in una colonna da SPE in polipropilene da 6.0 ml.

Alla colonna sono stati applicati due filtri in polietilene, di cui uno all’estremità

superiore e l'altro a quella inferiore; essa è stata collegata all'estrattore in fase solida attraverso una valvola. Il polimero, a questo punto, è stato lavato con metanolo e successivamente con cloroformio.

Per valutare la funzionalità e la selettività delle colonne MISPE, il rotenone è stato disciolto in acetonitrile al fine di ottenere una soluzione standard 0.2 micromolare.

La colonna a secco contenente il MIP è stata a questo punto condizionata con 2.5 ml. di acetonitrile e successivamente caricata con 5 ml. della soluzione standard.

L'ammontare complessivo dell'analita caricato nella colonna è stato sempre di 100 µg.

Dopo aver fatto asciugare la colonna sono stati caricati 2 ml. di esano e successivamente 2 ml. di metanolo ed acido acetico (2%) per portare a termine l'estrazione del rotenone.

Per poter valutare il funzionamento delle colonne MISPE, abbiamo confrontato le frazioni di eluato della colonna contenente il MIP e di quella contenente il NIP, analizzando tali frazioni mediante HPLC.

Apparato HPLC

Per la cromatografia in fase liquida ci si è avvalsi di un sistema composto da "Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump" e "Jasco UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detector", settato quest'ultimo ad una lunghezza d'onda di 294 nm.

È stata utilizzata una colonna "15 × 0.46 mm. Tracer Extrasil ODS2 Teknokroma, particle size 5 µm." (Teknokroma®, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain).

La fase mobile è stata acetonitrile/acqua (7/3, v/v) e il flusso è stato 0.5 ml/min.

Materiali

L'etilenglicole dimetacrilato (EGDMA), l'acido metacrilico (MAA) ed il 2,2'-azobis-isobutirronitrile (AIBN) sono stati acquistati dalla Aldrich.

Il "Rotenone" è stato anch'esso comprato dalla Aldrich.

Tutti i solventi, sia quelli analitici che quelli per HPLC, usati senza ulteriori purificazioni, sono stati forniti dalla Fluka Chemie.

Parte sperimentale “Omocisteina”: protocollo sperimentale per la funzionalizzazione dell’omocisteina con benzoil cloruro e sintesi della N-benzoil omocisteina

0.50 grammi (0.00365 moli) di omocisteina sono stati disciolti in 10 cm³ di una soluzione di NaOH 2M precedentemente preparata e la soluzione è stata posta in un bagno di acqua e ghiaccio (0°C). Successivamente sono stati aggiunti, nell’arco di un’ora, 0.46 ml. di benzoil cloruro (0.0040 moli) in rapporto molare 1,1:1 con l’omocisteina. La soluzione è stata lasciata in agitazione per 2 ore a temperatura ambiente ed il pH della soluzione è stato controllato con una cartina al tornasole per verificare la sua basicità. Alla fine delle due ore la miscela è stata acidificata con una soluzione di HCl al 5%, ottenendo un precipitato che una volta filtrato è stato lasciato ad essiccare alla pompa da vuoto. Il grezzo, dopo cromatografia su colonna di gel di silice Merck 60 con eluente acetato di etile/metanolo 70/30, fornisce 0.866 grammi di N-benzoil omocisteina, con una resa dell’84%. IR (pasticca KBr) ν (cm⁻¹): 3326 (-OH); 3060 (-CH aromatici); 2558 (-SH); 1637 (-NHR).

Sintesi dei “Molecularly Imprinted Polymers”: procedura generale tradizionale per la sintesi del MIP (monolito)

La molecola templante, i monomeri funzionali, il reticolante e l’iniziatore sono disciolti nell’opportuno solvente in una provetta da polimerizzazione. Nella soluzione è successivamente fatto gorgogliare azoto per dieci minuti e quindi essa è lasciata polimerizzare per 24 ore a 70°C. La tabella 1 riporta i dati relativi alle polimerizzazioni eseguite.

Estrazione “soxhlet”

Si tratta di una tecnica usata in laboratorio per l’estrazione di un solido. I MIPs sintetizzati vengono inseriti, uno per volta, in un ditale di cellulosa all’interno di un sifone munito di refrigerante a ricadere, montato su un pallone da 250 ml. in cui è presente il solvente scelto per l’estrazione. Come miscela di estrazione si è scelta una

soluzione formata da 200 ml. di etanolo e 10 ml. di acido acetico glaciale. Si riscalda la soluzione mediante un isomanto fino a riflusso.

Purificazione, frantumazione e setacciatura del polimero

I monoliti ottenuti vengono frantumati in un mortaio, raccolti su filtro a setto poroso, lavati con una miscela metanolo/acido acetico 1/1, quindi con una seconda miscela composta da metanolo e acetone analitico, fatti essiccare alla pompa da vuoto e conservati.

In tabella 2 è riportato uno schema riepilogativo dei polimeri sintetizzati e dei rispettivi quantitativi dei singoli componenti della miscela di polimerizzazione.

Polimero	Solvente	Reticolante	Monomero funzionale	Templante	AIBN	H
MIP 1	DMF- CH ₃ CN 4.0 ml	EGDMA 3.0 ml	MAA 0.2 ml	Omocisteina benzoilata 10 mg	0.05 g	24
NIPs	DMF- CH ₃ CN 4.0 ml	EGDMA 3.0 ml	MAA 0.2 ml	-	0.05 g	24
MIP 2	CH ₃ CN 4.0 ml	EGDMA 2.5 ml	DMAA 200 µl MAA 300 µl	Omocisteina benzoilata 20 mg	0.05 g	24
MIP 3 (bulk)	-	EGDMA 2.5 ml	DMAA 300 µl MAA 300 µl	Omocisteina benzoilata 20 mg	0.05 g	24

Tabella 2. Polimeri realizzati

Bibliografia

- A. Holm, P. Molander, E. Lundanes, T. Greibrokk, *Journal of Chromatography A*, 2003, **983**, 43-50;
- A. Mansoor, A. M. Svardal, J. Schneede, P. M. Ueland, *Clin. Chem.*, 1992, **38**, 1316;
- A.G. Mayes, L.I. Andersson and K. Mosbach, *Analytical Biochemistry*, 1994, **222**, 483;
- A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principi di Biochimica*, Zanichelli Editore s.p.a., Bologna, 1994;
- A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L. Baratovi, *J. of Chromatography A*, 2000, **895**, 157-166;
- Alfieri L. M. - *Ambiente, Economia e Sviluppo Sostenibile* - in *Ambiente e Società: qualità dell'ambiente e qualità della vita*, Atti del Convegno, Reggio Emilia, 1995, pp. 223-230;
- B. Sellergren and KJ. Shea, *Tetrahedron Asymm.*, 1994, **5**,1403;
- B. Sellergren, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1578;
- B. Sellergren, *J. Chromatogr. A*, 1994, **673**, 133;
- B. Sellergren, *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 164;
- Buck R. P., *Electrochimica Acta*, 1991, **36 (2)**, 243-251;
- Butter G.C. – *Principles of ecotoxicology* – John Wiles & Sons, 2000;
- C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *J. of Chromatogr. B*, 2004, **804**, 231;
- C. Buteau, C. L. Duitschaever, G. C. Ashton, *J. Chromatogr.*, 1984, **284**, 201 ;
- C. J. Allender, K. R. Brain, C. M. Heard, F. D. King, A. W. Oxford, *Progress in Medicinal Chemistry*, 1999, **36**, 235;
- Calabrese E.J. – *Methodological Approaches to deriving Environmental and Occupational Health Standards* – John Wiles & Sons, 2001;
- Capitàn F., Capitàn-Vallvey L. F., Fernández M. D., De Orbe I., Avidad R., *Analytica Chimica Acta*, 1996, **331**, 141–148;
- Caro E., Masque N., Marce R. M., Borrull F., Cormack P. A. G. and Sherrington D. C., *Journal of Chromatography A*, 2002, **995**, 233;
- Caro E., Masque N., Marce R. M., Borrull F., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., *Journal of Chromatography A*, 2002, **995**, 233;
- Cavilli M., *L'olivicoltura biologica*, 2004;

- Chen Q., Mou S., Hou X., Riviello J. M., Ni Z., *Journal of Chromatography A*, 1998, **827**, 73–81;
- Cheuk-Fai Chow, Michael H. W. Lam, Mitch K. P. Leung, *Analytica Chimica Acta*, 2002, **466**, 17-30;
- Commission Decision (E.C.) n.460/2003, 20 June 2003. On emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products. *Official Journal of the European Union*, L. 154, 114;
- D. Kriz , C. Berggren Kriz, LI. Andersson and K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2636;
- D. Kriz and K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **300**, 71;
- D. Kriz, LI. Andersson, M. Khayyami, B. Danielsson, P-O. Larsson and K. Mosbach,
- D. Kriz, M. Kempe and K. Mosbach, *Sens. Actuator B*, 1996, **33**, 178;
- D. Kriz, O. Ramström, A. Svensson, and K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 2142;
- D. Kutlan, I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr.*, 2004, **1031 (1-2)**, 51-66;
- D. Robinson, K. Mosbach, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 969;
- D. Robinson, K. Mosback, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 969-970;
- E. Hedborg, F. Winqvist, I. Lundström, LI. Andersson, and K. Mosbach, *Sensor. Actuator, APhys*, 1993, **37**, 796;
- E. Kaniowska, G. Chwatko, R. Glowacki, E. Bald, *J. Chromatogr. A*, 1998, **798**, 27;
- Ester Caro, Nuria Pasque, Rosa M. Marcè, *J. of Chromatography A*, 2002, **963**, 169-178;
- F. Puoci, F. Iemma, R. Muzzalupo, U.G. Spizzirri, S. Trombino, R. Cassano, N. Picci, *Macromol. Biosci.*, 2004, **4**, 22-26;
- F.H. Dickey, *Proc. Natl. Sci. USA*, 1949, 35, 227-229;
- Filho W. L., *Management of Environmental Quality - Seminary*, Royal Institute of Technology, Stoccolma, 2001;
- Food Standard Agency. Available at:
<http://www.foodstandards.gov.uk/safereating/sudanI/>;
- F. Puoci, C. Garreffa, F. Iemma, R. Muzzalupo, U. G. Spizzirri, N. Picci, *Food Chemistry*, 2005, **93**, 349-353;
- Frey M. - *Il management ambientale* - Franco Angeli, Milano, 1995;

- Frey M. - Le trasformazioni indotte dalla sfida ambientale - Franco Angeli, Milano, 1998;
- Frey M. "Ambiente naturale", in Le parole dell'impresa - Franco Angeli, Milano, 1995;
- G. Minniti, A. Piana, U. Armani, R. Cerone, *J. Chromatogr. A*, 1998, **828**, 401;
- G. Vlatakis, LI. Andersson, R. Müller and K. Mosbach, *Nature*, 1993, **361**, 645;
- G. Wulff and J. Haarer, *Makromol. Chem.*, 1991, **192**, 1329;
- G. Wulff, A. Sahran, K. Zabrocki, *Tetrahedron Lett.* , 1973, **14**, 4329;
- G. Wulff, A. Sarthan, *Angew. Chem.*, 1972, **84**, 364;
- G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 1812-1832;
- GP. Henricksen and MT. Martin, *IVD Technol. Mag.*, 1996, **7**, 46;
- Greenamyre J.T., Betarbet R. and Sherer T.B., *Parkinsons Relat. Disord.*, 2003, **9**, 59-64.
- H. L. Holland, Peter R. Andreana, Frances M. Brown, *Monatsheft fur Chemie*, 2000, **131**, 667-672;
- H. Refsum, P. M. Ueland, O. Nygard, S. E. Volset, *Annu. Rev. Med.*, 1998, **49**, 31;
- H. T. Chang, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 2947;
- Haupt K., *Analyst*, 2001, **126(6)**, 747-756;
- I. Molnar-Perl, *J. of Chromatography A*, 2003, **987**, 291-309;
- I. Schweitz, L. Andersson, S. Nilsson, *Anal. Chem.*, 1997, **16**, 321;
- I. Schweitz, L. Andersson, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A*, 1997, **792**, 401-409;
- J. D. Finkelstein, J.J. Matin, *IJBCB*, 2000, **32**, 385;
- J. Kirschbaum, B. Luckas, W.D. Beinert, *J. Chromatogr. A*, 1994, **661**, 193;
- J. Matsui, I. Nicholls, I. Karube and K. Mosbach, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5414;
- J. Tallova, J. Tomandl, M. Bicikova, M. Simicickova, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2001, **31**, 623;
- J.B. Ubbink, R. Delport, R. Riezler, *Clin. Chem.*, 1999, **45**, 670;
- J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M. Novo, M. Higes, J. Llorente, *Journal of Chromatography A*, 2000, **871**, 67-73;
- JV. Beach and KJ. Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 379;
- K. Haupt, A. Dzgoev, K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 628;
- K. Mosbach, K. Haupt, X. Liu, P. Cormach, O. Ramstrom, *ACS Symp. Ser.*, 1998, **703**;

- K. Mosbach, O. Ramstrom, *Biotechnol.*, 1996, **14**, 163;
- K. Mosbach, *Trends Biochem.*, 1994, **19**, 9;
- K. Nilsson, J. Lindell, O. Norrlöw and B. Sellergren, *J. Chromatogr. A*, 1994, **680**, 57;
- K. Nilsson, K. Sakaguchi, P. Gemeiner and K. Mosbach, *J. Chromatogr. A*, 1995, **707**, 199;
- K. Ohkubo, Y. Urata, S. Hirota, Y. Funakoshi, T. Sagawa, S. Usui, K. Yoshinaga, *J. Mol. Catal. A*, 1995, **101**, L111;
- K. Rasmussen, J. Moller, *Ann.Clin. Biochem.*, 2000, **37**, 627;
- K.Haupt, *Analyst*, 2000, **126**, 747-756;
- L. I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, *Chromatographia*, 1997, **43**, 57;
- L. Krause, A. Bockhardt, H. Neckemann, T. Henle, H. Klostermeyer, *J. Chromatogr. A*, 1995, **715**, 67;
- L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, **62**, 2643-2657;
- L. Ye, K. Mosbach, *Reactive and Functional Polymers*, 2001, **48**, 149-151;
- L.Fischer, R. Müller, B. Ekberg and K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 9358;
- Leonardo Di Donna, Fabio Mazzotti, Giovanni Sindona and Antonio Tagarelli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 1575–1577;
- Leonardo di Donna, Giovanni Grassi, Fabio Mazzotti, Enzo Perri and Giovanni Sindona, *Journal of mass spectrometry*, 2004, **39**, 1437–1440;
- LI. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis and K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 4788;
- LI. Andersson and K. Mosbach., *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 1989, **10**, 491;
- LI. Andersson, R. Müller and K. Mosbach, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 1996, **17**, 65;
- M. Glad, O. Norrlöw, B. Sellergren, N. Siegbahn, K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, 1985, **347**, 11;
- M. J. Rathbone, J. Hadgraft, M. S. Roberts, *Modified-Release Drug Delivery Technology*, 2003;
- M. Kempe and K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, 1994, **664**, 276;
- M. Kempe and K. Mosbach, *J. Chromatogr.A*, 1995, **691**, 317;
- M. Kempe, M. Glad and K. Mosbach, *J. Mol. Recogn.*, 1995, **8**, 35;

- M. Quaglia, K. Chenon, A. J. Hall, E. De Lorenzi, B. Sellergen, *J.Am.Chem.Soc.*, 2001, **123**, 2146-2154;
- M. R. Malinov, S. S. Kang, L. M. Taylor, P. W. K. Wong, *Circulation*, 1989, **79**, 1180;
- M. Senholdt, M. Siemann, K. Mosbach and L.I. Andersson, *Anal Lett.*, 1997, **30**, 1809;
- M. Siemann, LI. Andersson and K. Mosbach, *J. Agric. Fd. Chem.*, 1996, **44**, 141;
- M. T. Muldoon and L.H. Stanker, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 803;
- M. T. Muldoon and L.H. Stanker, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1424;
- M. Whitecombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 7105-7111;
- M.P. Davies, D. Perret and V. De Biasi, *II International Workshop on Molecular Imprinting, La Grande Motte, France*, 2002;
- M.R. Alberto, M.E. Arena, M.C. Manca de Nadra, *Food Control*, 2002, **13**, 125;
- M.V. Poliakov, *Zhur. Fiz. Khim.*, 1931, 2, 799-805;
- M.V. Poliakov, *Zhur. Fiz. Khim.*, 1933, 4, 454-456;
- M.V. Poliakov, *Zhur. Fiz. Khim.*, 1937, 10, 100-112;
- Molinelli A., Weiss R., Mizaikoff B., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 1804–1808;
- Mosbach K., Ramstrom O., *Biotechnology*, 1996, **14**, 163;
- Mosbach, K. and Ramström, O., *Bio/Technology*, 1996, **14**, 163;
- Nebbia G. – Man and his environment – Masson Ed., 2000;
- O. Ramström, C. Yu and K. Mosbach, *J. Mol. Recogn.*, 1996,**9**, 691;
- O. Ramstrom, R. Ansell, *Chirality*, 1998, **10**, 195;
- O.S.H.A. (Occupational Safety and Health Administration). Chemical sampling information. Available at:
http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_268420.html;
- Odum E.P. – *Principi di ecologia* – Piccin, 2000;
- P. Cormach, K. Haupt, *Encyclopedia of Separation Science, Academic Press New York*, 2000;
- P. Lehtonen, *Am. J. Enol. Vtic.*, 1996, **47**, 127 ;

- P. Martin, I.D. Wilson, D. E. Moegan, G. R. Jones, K. Jones, *Anal. Commun.*, 1997, **34**, 45;
- P. Martin, *Molecular Imprints in Separation and Analysis*, Londra, 2002;
- Peter A. G. Cormack, A. Zurutuza Elorza, *J. of Chromatogr. B*, 2004, **804**, 173;
- Porco S. – *Igiene Ambientale* – ARACNE Editrice, 2005;
- Porco S. – *Rischio e sicurezza alimentare* – ARACNE Editrice (in press);
- Puoci F., Iemma F., Muzzalupo R., Spizzirri U. G., Trombino S., Cassano R., Picci N., *Macromolecular Bioscience*, 2004, **4**, 22–26;
- R. Arshadi, K. Mosbach, *Macromol. Chem.*, 1981, **182**, 687-692;
- R. Arshady, K. Mosbach, *Makromol. Chem.*, 1981, **182**, 687;
- R. Bruggemann, R. Freitag, M. Whitecombe, E. Vulfson, *J. Chromatogr. A*, 1997, **69**, 43-53;
- R. Chien, D. S. Burgi, *J. Chromatogr.*, 1991, **559**, 141;
- R. Müller, LI. Andersson and K. Mosbach, *Makromol. Chem., Rap. Comm.*, 1993, **14**, 637;
- R. Venn, R. J. Goody, *Chromatographia*, 1999, **50 (7,8)**, 407-414;
- Ramstrom O., Skudar K., Haines J., Patel P., Bruggemann O., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49(5)**, 2015–2114;
- Rogers K. R., Williams R. L., *Trends in analytical chemistry*, 1995, **14 (7)**, 289-294;
- S. H. Kang, W. Wei, E. S. Yeung, *J. of Chromatography B*, 2000, **744**, 149-156;
- S. Melnyk, M. Pogribna, I. Pogribny, R. J. Hine, *J. Nutr. Biochem.*, 1999, **10**, 490;
- S. T. Chou, L. E. Ko, C. S. Yang, *Anal. Chem. Acta*, 2001, **429**, 331;
- S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, R. Levi, K. Yano and I. Karube, *Anal. Lett.*, 1997, **30**, 445;
- S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A.V. Elgersma, K. Yano, I. Karube, Y.P. Parhometz, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, **10**, 959;
- S.A. Piletsky, Y.P. Parhometz, N.V. Lavryk, T.L. Panasyuk and A.V. Elskaya, *Sensor. Actuator B*, 1994, **18-19**, 629;
- Shea, K.J., *Trends Polym. Sci.*, 1994, **2(5)**, 166;
- Steinke, J., Sherrington, D. and Dunkin, I., *Adv. Polym. Sci.*, 1995, **123**, 80;
- T. Fiskerstrand, H. Renfsum, P.M. Ueland, *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 263;
- T.Bausa, A. Blaise, F. Damas, J.C. Cabanis, *J. Chromatogr. A*, 1995, **707**, 373;

- Tateo F., Bononi M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**, 655–658.
- V.R. Villanueva, R.C. Adlakha, *Anal. Biochem.*, 1978, **91**, 264;
- Vadgama P., Crump P. W., *Analyst*, 1992, **117**, 1657-1670;
- Vidyasankar, S. and Arnold, F.H., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1995, **6**(2), 218;
- Viola F. - “I principi delle scelte ambientali” - in *Territorio e Ambiente* – Piccin, 2002.
- W. M. Mullet, E. P. C. Lai, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 3636;
- Wulff, G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1812;
- Y. Okahata, K. Yasunaga, K. Ogura., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, 469;
- Y. Shinohara, H. Hasegawa, K. Tagoku, *J. of Chromatography B*, 2001, **758**, 283-288;
- Y. W. Chien, S. Lin, *Clin. Pharmacokinet.*, 2002, **41**, 1267;
- Y.V. Tcherkas, A.D. Denisenko, *J.Chromatrogr. A*, 2001, **913** (1-2), 309-313;
- Biomimetics*, 1995, **3**, 81;