

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

"Metodologie per lo sviluppo di molecole di interesse farmacologico"

XX Ciclo

CHIM/09

**Sintesi di biomateriali a base di cellulosa
derivatizzata**

Supervisore

Dott.ssa Rita MUZZALUPO

Rita Muzzalupo

Dottoranda

Ermelinda BLOISE

Ermelinda Bloise

Coordinatore

Prof. Bartolo GABRIELE

Bartolo Gabriele

Anno Accademico 2007/2008

Indice

Premessa	1
Capitolo 1 - La cellulosa: struttura e reattività	4
Introduzione	4
1.1 Struttura della cellulosa	4
1.1.1 Struttura molecolare	4
1.1.2 Struttura supramolecolare	6
1.1.3 Struttura morfologica	8
1.2 Proprietà macroscopiche della cellulosa	9
1.3 Modificazioni chimica della cellulosa	10
1.4 Attivazione e dissoluzione della cellulosa	11
Bibliografia	14
Capitolo 2 – Le fibre vegetali: composizione ed applicazioni	15
Introduzione	15
2.1 Composizione chimica delle fibre vegetali	16
2.2 La fibra di ginestra	16
2.3 Materiali compositi a base di fibre naturali	17
Bibliografia	19
Capitolo 3 - Preparazione e caratterizzazione di derivati della cellulosa da fibra di ginestra	21
Introduzione	21
3.1 Funzionalizzazione della cellulosa da fibra di ginestra	22
3.1.1 Sintesi del trifluoroacetato di fibra di ginestra	24
3.1.2 Sintesi dell'epptafluorobutirrato di fibra di ginestra	24
3.1.3 Sintesi dell'acrilato di fibra di ginestra	24
3.1.4 Sintesi del vinilbenzoato di fibra di ginestra	25
3.1.5 Sintesi del vinilbenzil etere di fibra di ginestra	25
3.1.6 Sintesi del coniugato fibra ossidata- amminometilstirene	25
3.2 Analisi quantitativa dei gruppi esterei	28
3.3 Determinazione del contenuto dei gruppi vinilbenzilico e amminometilstirene	29

3.4	Copolimerizzazione delle fibre di ginestra	29
3.5	Microscopia ottica ad alta risoluzione e microscopia a scansione elettronica (SEM)	30
3.6	Analisi termogravimetrica dei derivati	32
3.7	Conclusioni	33
	Bibliografia	35
 Capitolo 4- Sistemi polimerici per rilascio di farmaci: i profarmaci		37
	Introduzione	37
4.1	Drug Delivery Systems (DDS)	37
4.2	Profarmaci	39
4.3	Profarmaci polimerici	40
	Bibliografia	43
 Capitolo 5 - Sintesi e caratterizzazione di un profarmaco a base di cellulosa		45
	Introduzione	45
5.1	Profarmaco a base di cellulosa	46
5.1.1	Sintesi della 6-carbossicellulosa	47
5.1.2	Sintesi del coniugato cellulosa- spaziatore benzilico	47
5.2	Conclusioni	49
	Bibliografia	50
 Capitolo 6 – Attività degli antiossidanti		52
	Introduzione	52
6.1	I radicali liberi	53
6.2	Radicali liberi di interesse biologico	55
6.3	Gli antiossidanti	57
6.4	Classificazione degli antiossidanti	57
6.4.1	Agenti chelanti	58
6.4.2	Radicali liberi relativamente stabili	60
6.4.3	Agenti riducenti	60
6.4.4	Stabilizzanti di radicali liberi	61
6.5	Antiossidanti naturali	62
6.5.1	Polifenoli	62

6.5.2	Vitamina C (acido ascorbico)	63
6.5.3	Vitamina E (tocoferolo)	64
6.5.4	Betacaroteni e Vitamina A (retinolo)	65
6.5.5	Selenio	66
6.5.6	Rame	67
6.5.7	Zinco	67
6.5.8	Glutazione	68
6.5.9	Coenzima Q10	69
6.5.10	Melatonina	69
	Bibliografia	71

**Capitolo 7 - Sintesi e caratterizzazione di derivati cellulosici
con attività antiossidante**

		72
	Introduzione	72
7.1	Pretrattamento della cellulosa	75
7.2	Funzionalizzazione della cellulosa	75
7.2.1	Sintesi omogenea di MC-FA	75
7.2.2	Sintesi eterogenea di MC-FA	76
7.2.3	Sintesi di MC-LA	76
7.2.4	Sintesi di MC-T	76
7.3	Analisi quantitativa dei gruppi esterei	77
7.4	Caratterizzazione spettroscopica FT-IR e ¹³C-NMR	78
7.5	Preparazione della sospensione microsomiale	80
7.6	Addizione di MC-FA, MC-LA e MC-T ai microsomi	80
7.7	Formazione della malondialdeide (MDA)	80
7.8	Proprietà antiossidanti dei derivati cellulosici MC-FA, MC-LA e MC-T	81
7.9	Conclusioni	84
	Bibliografia	86

Capitolo 8 - Sistemi polimerici per rilascio di farmaci: gli idrogel

		88
	Introduzione	88
8.1	Idrogel: definizione, classificazione e proprietà	88
8.2	Idrogel come DDS	91
8.2.1	Idrogel termo-sensibili	93

8.2.2	Idrogel sensibili agli enzimi	94
8.2.3	Idrogel sensibili agli antigeni	94
8.2.4	Idrogel pH sensibili	95
8.3	Meccanismi e andamento di rilascio del farmaco	96
8.4	Idrogel polisaccaridici nel rilascio modificato di farmaci	98
	Bibliografia	99
	Capitolo 9 - Idrogel cellulose con attività antiossidante	101
	Introduzione	101
9.1	Sintesi dell'acrilcellulosa	103
9.2	Sintesi degli idrogel cellulose	103
9.3	Studio di rigonfiamento degli idrogel cellulose	104
9.4	Sintesi dell'idrogel cellulose contenente acido trans-ferulico	106
9.5	Determinazione del contenuto dei residui ferulici nell'idrogel ferulato	106
9.6	Attività scavenging dell'idrogel ferulico	107
9.7	Proprietà antiossidante dell'idrogel ferulico	108
9.8	Conclusioni	110
	Bibliografia	111

Premessa

Negli ultimi anni, la ricerca ha focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di nuovi biomateriali a base di polimeri, naturali e sintetici, che siano fundamentalmente biocompatibili e contengano siti funzionali che possano essere sfruttati per modificarne la struttura e, quindi, le caratteristiche in base alle applicazioni richieste.

Il programma di questo lavoro di ricerca ha previsto l'utilizzo della cellulosa, il polimero più abbondante in natura i cui derivati sono non tossici, biocompatibili con tessuti e sangue ed ottenibili ad un costo relativamente basso.

Mediante varie funzionalizzazioni della cellulosa, sono stati sviluppati quattro diversi argomenti che hanno permesso di sintetizzare biomateriali applicabili in vari campi (farmaceutico, biomedico, cosmetico, agricolo ed alimentare).

In particolare, sono state funzionalizzate le unità monomeriche glucosidiche della cellulosa della fibra di ginestra, ottenuta dalle biomasse mediante un progressivo impoverimento delle pareti cellulari.

Gruppi alogenati e gruppi polimerizzabili sono stati ancorati sulla fibra di ginestra mediante legami covalenti, allo scopo di realizzare materiali compositi scarsamente infiammabili ed aumentare la resistenza delle fibre migliorando l'adesione con la matrice polimerica in cui sono inserite. Questi nuovi materiali, interamente ottenuti da fonti rinnovabili, potrebbero essere utilizzati in agricoltura, nella realizzazione di cordame o imballaggio (*packaging*) di prodotti naturali, oppure rimpiazzare i contenitori a base di alluminio usati nella conservazione dei cibi (*food packaging*).

Un approccio farmaceutico è stato sviluppato realizzando un modello di profarmaco a base di cellulosa in cui l'attivazione del farmaco ancorato al polimero avviene mediante un modello che prevede una 1,4- oppure 1,6- benzil eliminazione. Il polimero e il farmaco sono legati mediante uno spaziatore, un idrossibenzilalcol che, per idrolisi enzimatica o chimica del legame con il polimero, libera il farmaco mediante una veloce decomposizione molecolare. Dallo studio preliminare di questo *carrier* polimerico, ci proponiamo di studiare e progettare sistemi analoghi che abbiano una determinata velocità di idrolisi variando la natura del legame polimero-spaziatore ed usando spaziatori benzilici con maggiore ingombro sterico. Questo

approccio offre un grande vantaggio nella sperimentazione e realizzazione di *Drug Delivery Systems* (DDS) che siano in grado di rilasciare una gran varietà di farmaci tramite una farmacocinetica ottimale.

Poiché negli ultimi anni la ricerca ha focalizzato molta attenzione sull'attività di molecole antiossidanti, che prevengono la formazione di radicali liberi responsabili dello stress ossidativo, sono stati preparati derivati della cellulosa legando covalentemente molecole antiossidanti sulla catena polimerica. Gli antiossidanti presentano un breve tempo di azione dovuto ad un veloce metabolismo e un eccessivo assorbimento che produce effetti tossici. Il legame covalente della molecola antiossidante ad un polimero ne migliora il trasporto e la stabilità. Inoltre, aumentando il peso molecolare di questi sistemi, ne viene impedito il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica che può danneggiare le membrane cellulari.

I sistemi cellulosa-antiossidante realizzati possono essere applicati in campo biomedico, per esempio per la preparazione di membrane per emodialisi che sono principalmente costituite da cellulosa e da suoi derivati. Infatti, nei pazienti emodializzati molti problemi derivano dallo stress ossidativo dovuto ad uno squilibrio tra radicali liberi prodotti e sistema antiossidante di autodifesa. L'idea di legare covalentemente gli antiossidanti alla cellulosa, permette di realizzare membrane dove il sangue viene a contatto con agenti antiossidanti che lo proteggono dallo stress ossidativo.

La cellulosa è stata funzionalizzata con acido trans-ferulico e acido α -lipoico mediante reazione di esterificazione, e con α -tocoferolo (vitamina E) partendo dalla 6-carbossicellulosa. Dagli studi dell'efficienza antiossidante dei derivati sintetizzati, valutata mediante l'inibizione della perossidazione lipidica nelle membrane microsomiali di fegato di ratto, è stato dedotto che questi sistemi preservano l'attività antiossidante dei substrati liberi, e sono più efficienti nel contrastare la formazione di alcossi-radicali liberi indotti dal tert-BOOH.

Un secondo approccio ai sistemi polimerici che veicolano e rilasciano i farmaci (DDS), ha riguardato la realizzazione di idrogel a base di cellulosa contenenti

molecole di acido *trans*-ferulico, il quale conferisce all'idrogel una buona attività antiossidante.

Sono stati inizialmente preparati diversi idrogel che hanno mostrato un'alta affinità per l'acqua ed un elevato potere rigonfiante, indipendentemente dal valore di pH del mezzo rigonfiante. Successivamente, sono stati ancorati residui di antiossidante acido *trans*-ferulico direttamente sui gruppi ossidrilici liberi dell'idrogel cellulosico, realizzando un biopolimero che potrebbe essere utilizzato in campo farmaceutico e cosmetico per ridurre sostanzialmente il danno ossidativo causato dalla formazione di radicali liberi.

La valutazione dei test eseguiti sul biomateriale per determinare le sue proprietà antiossidanti, suggeriscono che il materiale ferulato possiede un'eccellente attività *scavenger* e antiossidante e potrebbe essere utilizzato sia come *carrier* capace di proteggere, trasportare e rilasciare farmaci instabili all'esposizione prolungata di aria e luce, sia come profarmaco dell'acido *trans*-ferulico.

Capitolo 1

La cellulosa: struttura e reattività

Introduzione

La cellulosa è il polimero più abbondante in natura ed i suoi derivati risultano biocompatibili, non tossici¹ ed ottenibili ad un costo relativamente basso.

La sua struttura ha una influenza piuttosto notevole e complessa sul corso delle sue reazioni chimiche ed è inoltre responsabile delle sue proprietà macroscopiche.

1.1 Struttura della cellulosa

Al fine di dare una descrizione dettagliata di questo polimero è importante definirne i tre livelli strutturali principali:

- ☉ il livello molecolare della singola macromolecola;
- ☉ il livello supramolecolare di impacchettamento e di ordinamento delle macromolecole;
- ☉ il livello morfologico riguardante l'architettura delle entità complesse.

1.1.1 Struttura molecolare

La cellulosa è un omopolimero sindiotattico lineare, composto da unità di D-anidroglicopiranosio (AGU), legate tra loro da legami glicosidici $\beta(1\rightarrow4)$. Assumendo come unità base il dimero cellobiosio, la cellulosa può essere considerata come un polimero isotattico del cellobiosio (figura 1.1).

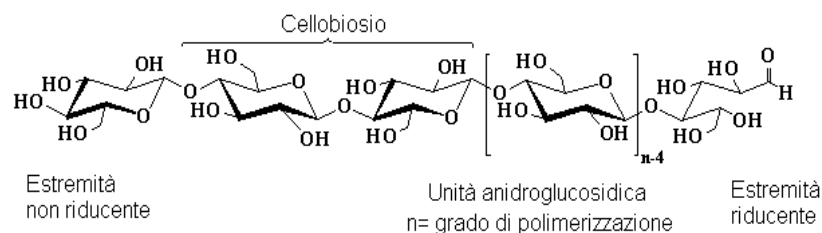


Fig. 1.1. Struttura chimica della cellulosa

Il D-glucosio si può ricavare dalla cellulosa con una resa quasi quantitativa dopo un trattamento idrolitico con acidi acquosi.

Ciascuna unità AGU possiede gruppi ossidrilici al C-2, C-3 e C-6 capaci di subire le reazioni tipiche note per gli alcoli primari e secondari.

I gruppi ossidrilici secondari vicinali rappresentano una tipica struttura glicolica.

I gruppi ossidrilici ai lati terminali della catena della cellulosa hanno un comportamento differente: il C-1 terminale ha proprietà riducenti, mentre il glucosio terminale con un C-4 libero, è non riducente. L'atomo di ossigeno dell'anello e quello impegnato nel legame sono coinvolti in interazioni intra- e intermolecolari, soprattutto legami a idrogeno, e nelle reazioni di degradazione.

La conformazione di una unità AGU nella catena cellulosica è generalmente una conformazione a sedia, come deriva dall'analisi ai raggi-X e da misure NMR. In questa conformazione i gruppi ossidrilici liberi sono posizionati nel piano dell'anello (equatoriale), mentre gli atomi di idrogeno sono in posizione verticale (assiale).

Nel passaggio dal monomero "glucosio" al polimero "cellulosa", la solubilità in acqua decresce. Le differenze tra monomero e polimero sono messe in evidenza attraverso gli spettri ^{13}C -NMR., riportati nella figura 1.2. Gli spettri sono simili, ma in quello relativo alla cellulosa mancano i segnali di splitting dovuti all'equilibrio degli α - e dei β -anomeri, visibili invece per il glucosio e il cellobiosio.²

Lo spettro della cellulosa non sostituita presenta sei segnali corrispondenti ai sei atomi di C dell'unità anidroglicosica. Questo spettro presenta alcune deviazioni nel caso di campioni naturali che vengono sottoposti a diversi trattamenti, come ad esempio l'estrazione di cellulosa da cotone o da polpa di legno, dovute alla presenza di gruppi carbossilici o carbonilici. La quantità di gruppi carbossilici viene stimata mediante titolazione della forma acida o attraverso un processo di scambio-ionico con un campione opportuno.

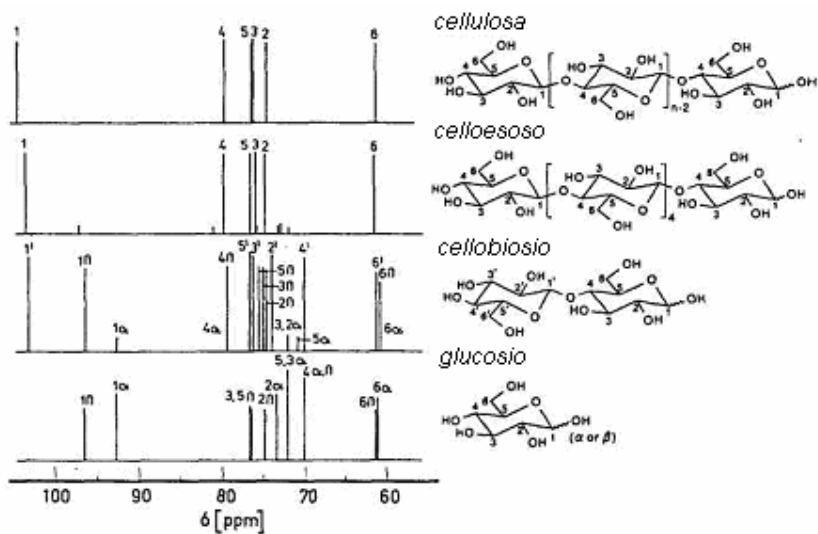


Fig. 1.2. Spettri ^{13}C NMR del glucosio, oligoglucosio e cellulosa

La grandezza molecolare della cellulosa può essere definita dal suo grado medio di polimerizzazione (DP). La massa molecolare media è data dal prodotto tra il DP e la massa molecolare dell'unità ripetitiva AGU.

Il valore del DP della cellulosa, che viene determinato attraverso misure viscosimetriche dopo dissoluzione del campione in solventi acquosi complessati, dipende dall'origine del campione e dal pretrattamento: la cellulosa isolata da fonti naturali è sempre polidispersa e si presenta come una miscela di macromolecole aventi catene di lunghezza diversa, per cui non è sempre facile determinarne il DP.

1.1.2 Struttura supramolecolare

Le catene cellulosiche hanno una forte tendenza ad aggregarsi in entità strutturali altamente ordinate dovute alla loro costituzione chimica e alla loro conformazione spaziale.

La conformazione strutturale della catena è determinata dagli angoli di legame, dalla lunghezza del legame dell'ossigeno nel ponte glicosidico e dalla torsione degli angoli di questo ponte.

Generalmente si assume una conformazione strutturale piegata e, sia per la cellulosa nativa che per quella rigenerata, si esclude l'esistenza di una

conformazione ordinata. Il C-6 può assumere una conformazione trans-gauche o gauche-trans, permettendo la formazione di legami idrogeno intramolecolare e intermolecolare, dando origine alle due più comuni strutture allomorfe.³

In particolare, la presenza dei legami idrogeno intramolecolari tra O-3 e O-5' e tra O-2 e O-6' di unità glucopiranosiche adiacenti, rendono rigida la conformazione di una singola catena e stabilizzano quella a doppia elica della cellulosa cristallina, mentre i legami idrogeno intermolecolari sono i responsabili della coesione intercatena (figura 1.3). Tale coesione è favorita dalla alta regolarità spaziale del legame idrogeno e dal coinvolgimento di tutti e tre i gruppi ossidrilici nella rete dei legami idrogeno.

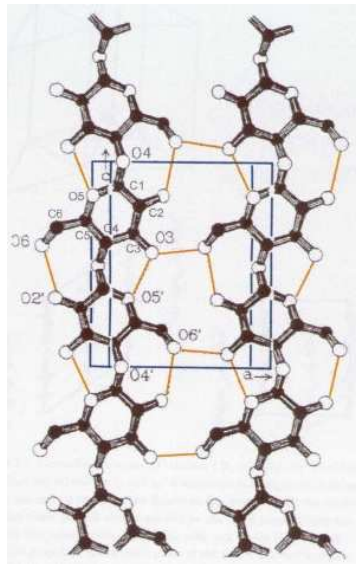


Fig. 1.3. Legami ad idrogeno inter- e intra-molecolari nella cellulosa.⁴

L'ordine delle macromolecole nelle fibre cellulosiche non è uniforme nell'intera struttura, nella quale si individuano delle regioni di basso ordine (regioni amorfe) e di alto ordine (regioni cristalline), trascurando una quantità piuttosto piccola di materia con uno stato di ordine intermedio.⁵

La quantità di polimero nella regione altamente ordinata viene definito grado di cristallinità ed esso dipende dall'origine del campione e dal suo pretrattamento. Inoltre esistono diverse modificazioni cristalline, le cui differenze vanno ricercate nelle dimensioni della cella elementare e nella polarità della catena.

Meyer, Mark e Misch^{6,7} proposero per la cellulosa nativa una cella elementare del reticolo cristallino che è valida ancora oggi per scopi pratici. Questo modello contempla una cella elementare monoclinica con un gruppo spaziale $P-2_1$ con due segmenti di catena di cellobiosio antiparalleli che corrono in direzioni opposte lungo l'asse della fibra.

1.1.3 Struttura morfologica

Morfologicamente la cellulosa può essere descritta come un polimero con una struttura ben organizzata di elementi fibrillari formati a loro volta da entità più piccole dette microfibrille (figura 1.4).

Nel caso della cellulosa naturale le fibrille sono disposte in modo ordinato, generalmente organizzate in strati, mentre nella cellulosa rigenerata sono presenti networks fibrillari.

La morfologia della struttura è investigata con tecniche microscopiche elettroniche (microscopia elettronica a scansione e a trasmissione, figura 1.4) , ma anche con il microscopio ottico, impiegato nella prima metà del secolo, che è ancora oggi uno strumento indispensabile per uno studio preliminare.

Come detto, la fibrilla elementare è l'unità morfologica più piccola ^{8,9} , la cui lunghezza può raggiungere i micrometri e alla quale si attribuiva un diametro di circa 3.5 nm ¹⁰, ma oggi, grazie a nuovi metodi di investigazione microscopica elettronica, le dimensioni del diametro, che dipendono dalla fonte cellulosica, sono comprese tra 3-20 nm ^{11,12}.

Le microfibrille si aggregano in entità più grandi chiamate macrofibrille, il cui diametro è compreso tra 10-50 nm ¹³.

Le micro- e le macrofibrille rappresentano le unità costitutive delle parete cellulare della fibra di cellulosa. La morfologia di questa parete cellulare, caratterizzata da differenti strati nella tessitura della fibra, viene illustrata nelle figure seguenti relative alla fibra di ginestra.

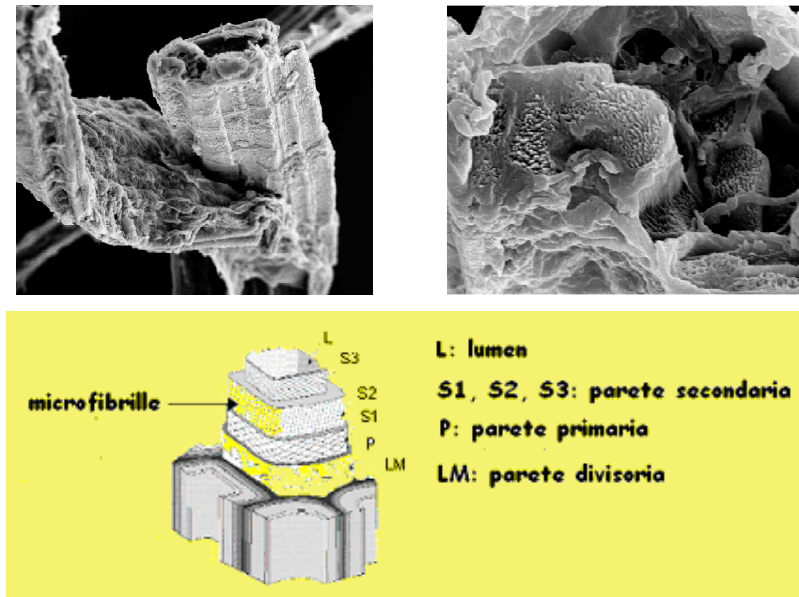


Fig. 1.4. Morfologia della fibra di cellulosa

Insieme alla struttura fibrillare, nella parete cellulare è presente un sistema di pori, di capillari, di vuoti e di interstizi.

I pori non sono uniformi nella dimensione e nella forma e le informazioni riguardo il loro volume totale, la grandezza media, la distribuzione sono fondamentali per comprendere le reazioni chimiche eterogenee della cellulosa. Il volume totale e la distribuzione dei pori è sensibile ai trattamenti di rigonfiamento e di essiccazione del campione esaminato: l'essiccamento della cellulosa comporta una riduzione irreversibile del volume dei pori, dovuta ad un fenomeno definito ornificazione, consistente in una salda coesione degli elementi fibrillari; il rigonfiamento, invece, può avvenire in acqua, etanolo ed ammina e determina un aumento del volume dei pori che può essere conservato utilizzando opportune tecniche, come la liofilizzazione o lo scambio di solvente.

L'area superficiale interna delle fibre cellulosiche gioca un ruolo cruciale per ciò che concerne l'accessibilità e la reattività in quelli che sono i processi di dissoluzione e di derivatizzazione del polimero.

1.2 Proprietà macroscopiche della cellulosa

La cellulosa è un polimero solido, inodore, incolore e non tossico. È insolubile nell'acqua e nei comuni solventi organici e si rigonfia in molti liquidi polari

protici e aprotici. A causa della forte coesione tra le macromolecole dovuta alle forze intermolecolari, soprattutto alla rete dei legami idrogeno, essa non può essere trasformata nello stato liquido. Inoltre, per le sue catene polimeriche lineari, l'alto ordine supramolecolare, la morfologia fibrillare e la forte coesione tra le macromolecole è considerato un polimero fibroso ideale, che manifesta una buona resistenza alla rottura e all'elongazione. Per esempio la cellulosa seccata in forno, che ha una forte igroscopicità, è molto fragile, poiché l'acqua esercita sulle fibre della cellulosa un'azione di ammorbidimento interagendo con il sistema dei legami idrogeno. La cellulosa seccata all'aria, invece, è resistente all'impatto meccanico e occorre spendere energia per demolire la struttura macroscopica e microscopica.

Ancora, la cellulosa dry è un buon isolante con una resistività specifica di corrente diretta (dc) di circa $10^{18} \Omega \text{ cm}$ ed è stata utilizzata in forma di fibre o di fogli come carta isolante nei condensatori elettrici; la resistività decresce con l'aumentare del contenuto di acqua e aumenta con il contenuto di ioni o siti ionici. Tra le tante proprietà di questo polimero deve essere annoverata anche una buona stabilità termica: la sua struttura e le sue proprietà meccaniche rimangono inalterate fino ad una temperatura di 200°C , al di sopra di questa soglia inizia la decomposizione termica.¹⁴

Essa, come molti altri polimeri organici, è inerte, quindi, può essere combinata con altre classi di materiali, come per esempio poliacrilonitrile, poliuretani e poliammidi.

1.3 Modificazione chimica della cellulosa

La cellulosa può subire diversi tipi di degradazione: notevole rilevanza assumono la degradazione chimica, meccanica, termica e radioattiva.

Le reazioni chimiche che interessano la cellulosa possono essere classificate in due categorie, in base alle modificazioni che apportano al polimero: modificazione dello scheletro della cellulosa (ossidazione dei legami glicolici e ossidazione della funzione alcolica primaria) e modificazione dei gruppi ossidrilici.

I siti interessati alla funzionalizzazione, quindi, sono esclusivamente i gruppi ossidrilici in ciascuna unità AGU.

Le trasformazioni chimiche relativamente al C-1 e al C-4 riguardano invece i processi degradativi e la chimica degli oligomeri cellulosici, questo per quanto concerne i gruppi terminali riducenti.

L'atomo di ossigeno dell'anello e quello impegnato nel legame glicosidico giocano un ruolo fondamentale nell'interazione intermolecolare ma non nella derivatizzazione covalente. Il gruppo ossidrilico primario al C-6 e i gruppi ossidrilici secondari al C-2 e al C-3 danno luogo alle tipiche reazioni note per gli alcoli quali esterificazioni, eterificazioni e ossidazioni. Ma possono anche agire da ligandi nella formazione dei complessi metallici, come per esempio nei complessi cuproammoniacali.^{15,16,17}

Tali gruppi possono dare anche composti di addizione con gli acidi e le basi. Inoltre essi hanno una forte tendenza a formare legami idrogeno che nella cellulosa, come già detto, ne influenzano la struttura supramolecolare e danno anche origine a composti di addizione intermolecolari con ammoniaca, ammine alifatiche e altre sostanze appropriate.

La completa funzionalizzazione di tutti i gruppi ossidrilici è l'eccezione e non la regola, infatti la maggior parte dei prodotti manifatturati su scala commerciale sono composti cellulosici parzialmente modificati contenenti ancora gruppi ossidrilici liberi.

Le reazioni sono caratterizzate da un grado di sostituzione (DS) ossia dal numero medio di gruppi ossidrilici modificati per AGU, che è generalmente compreso nel range tra 0 e 3.

1.4 Attivazione e dissoluzione della cellulosa

Per poter funzionalizzare opportunamente la cellulosa sono necessari dei trattamenti che permettono di aumentare l'accessibilità dei gruppi ossidrilici e di contrastare le forze intermolecolari tra le macromolecole portando ad un indebolimento o ad una completa eliminazione della struttura supramolecolare.

Questo scopo può essere raggiunto attraverso il rigonfiamento o la dissoluzione del campione in esame. Senza il rigonfiamento, nell'ambiente di reazione, sarebbe

disponibile soltanto lo strato superficiale: esso non modifica in modo irreversibile la parte caratteristica delle particelle o delle fibre, come invece avviene nella dissoluzione che porta alla distruzione della struttura supramolecolare.

Tra i metodi di rigonfiamento sono annoverati l'immersione del polimero in una soluzione acida per un minuto seguita da filtrazione ed essiccamento del campione a 40° C; questo trattamento porta all'idrocellulosa di Girare¹⁸, una cellulosa parzialmente idrolizzata.

Ancora, un altro metodo è l'immersione del campione in una soluzione di ammoniaca per un'ora¹⁹ allo scopo di purificarlo ed eliminare gli acetati che potrebbero esterificarlo. Inoltre, anche la mercerizzazione della cellulosa in una soluzione di idrossido di sodio al 18% da luogo al rigonfiamento della stessa.²⁰

Per ciò che concerne la dissoluzione della cellulosa si individuano due categorie di solventi: solventi derivatizzanti e solventi non derivatizzanti.

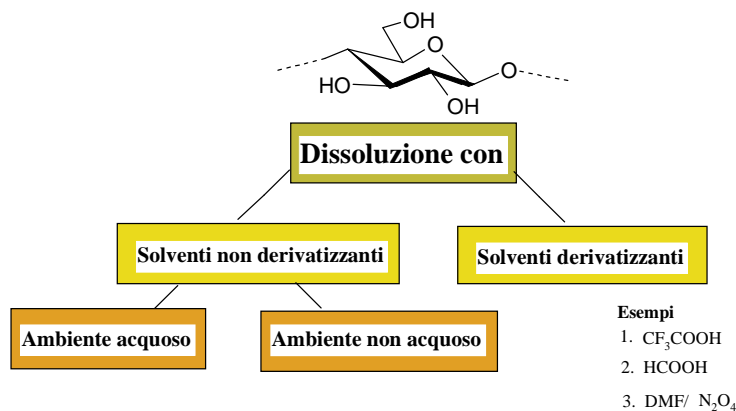
Impiegando solventi derivatizzanti è possibile formare intermedi di reazione in situ introducendo nuovi gruppi funzionali mediante legami covalenti, soprattutto esteri che hanno una stabilità idrolitica piuttosto bassa. Inoltre, è possibile isolare questi intermedi o sintetizzare composti simili e, successivamente, condurre modificazioni omogenee partendo da polimeri dissolti in solventi organici inerti.²¹

Un esempio è rappresentato dalla cellulosa trifluoroacetato dove la reazione tra la cellulosa ed il sistema acido trifluoro acetico/ anidride trifluoro acetica produce un composto solubile che può essere isolato e ridisciolto nei comuni solventi organici.

I solventi non derivatizzanti includono sia sistemi mono che multicomponenti e, sebbene in questi ultimi anni ne sono stati indicati diversi, soltanto alcuni hanno dimostrato buone potenzialità per la funzionalizzazione controllata ed omogenea dei polisaccaridi.

Le limitazioni sono dovute all'alta tossicità e reattività dei solventi, che portano a prodotti di reazione collaterali indesiderati e, ancora, alla perdita della solubilità nel corso delle reazioni, rendendo le condizioni non omogenee a causa della formazione di gel e paste che a stento possono essere miscelate.

Nello schema seguente sono raggruppati i solventi che comunemente vengono utilizzati per dissolvere la cellulosa.



Esempi

1. Complessi acquosi Inorganici
2. Basi acquose (es. NaOH 10%)
3. Acidi minerali
4. Sali inorganici idrati Fusi

Esempi

1. Solvente organico/ Sali inorganici (es. DMA/ LiCl)
2. Solvente organico/ ammina/ SO_2 (es. $\text{DMSO/Et}_3\text{N/SO}_2$)
3. Ammoniaca/Sali di Ammonio (es. $\text{NH}_3/ \text{NH}_4\text{SCN}$)

In particolare consideriamo il sistema a due componenti costituito da cloruro di litio (LiCl) e N,N-dimetilacetammide (DMA) che permette di ottenere una soluzione omogenea della cellulosa. Esso si comporta come un solvente complessante: il litio permette di rompere i legami idrogeno, che irrigidiscono la struttura del polimero impedendone la dissoluzione, attraverso la complessazione degli ossidrili (figura. 1.5). La DMA permette la solvatazione del complesso cellulosa- LiCl ^{22,23} limitando la degradazione del polimero. ²⁴

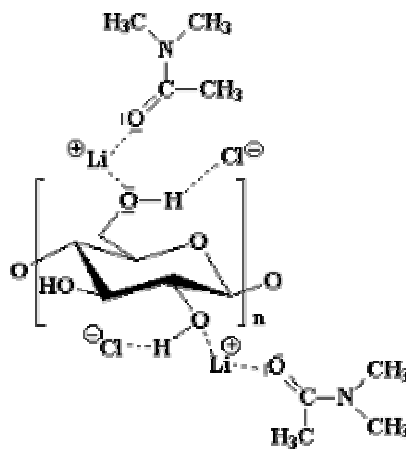


Fig. 1. 5. Solvatazione della cellulosa in DMA/LiCl

Bibliografia

- ¹ D.A. Alderman. *Int. J. Pharm. Technol. Prod. Manufact.* 5, 1984, 1.
- ² Nehls, I.; Wagenkecht, W.; Phillip, B.; Stscherbina, D., *Prog. Polym. Sci.* 1994, 19, 29-78.
- ³ Gardner, K. H.; Blackwell, J., *Biopolymers* 1974, 13, 1975-2001.
- ⁴ Kroon-Batenburg, L. M. J.; Kroon, J.; Nordholt, M. G., *Polym. Commun.* 1986, 27, 290-292.
- ⁵ Hearle, J. W. S., *J. Polym. Sci.* 1958, 28, 432.
- ⁶ Meyer, K. H.; Mark, H. F., *Z. Phys. Chem.* 1929, B2, 115.
- ⁷ Meyer, K. H.; Misch, L., *Helv. Chim. Acta* 1937, 20, 232.
- ⁸ Muhlethaler, K., in *Cellulose Ultrastructure of Woody Plants*, Cote, W. A. (Ed.), Syracuse: Syracuse University Press, 1965, pp. 191-198.
- ⁹ Heyn, A. N. J., *J. Cell. Biol.* 1966, 29, 181-197.
- ¹⁰ Fengel, D.; Wegener, G., *Wood*, Berlin: de Gruyter & Co., 1989.
- ¹¹ Chanzy, H.; Henrissat, B.; Vuong, R.; Revol, J.-F., *Holzforschung* 1986, 40, 25-30.
- ¹² Fink, H.-P.; Walenta, E., *Papier (Darmstadt)* 1994, 48, 739-748.
- ¹³ Krassig, H. A., in *Cellulose – Structure, Accessibility and Reactivity*, Krassig, H. A. (Ed.), Yverdon: Gordon and Breach Sci. Publ. S. A., 1993.
- ¹⁴ Grobe, A., in *Polymer Handbook*, 3rd Edn.; Brandrup, J.; Immergut, E. H. (Eds.), New York: John Wiley, 1989, pp. V117-V170.
- ¹⁵ Baugh, P. J.; Hinojosa, O.; Arthur, Jr., J. C.; Mares, T., *J. Appl. Polym. Sci.* 1968, 12(2), 249-265.
- ¹⁶ Burchardt, W.; Habbermann, N.; Klufers, P.; Seger, B.; Wilhelm, U., *Angew. Chem.* 1994, 106, 936-939.
- ¹⁷ Kettenbach, G.; Klufers, P.; Mayer, P., *Macromol. Symp.* 1997, 120, 291-302.
- ¹⁸ Ibrahim, M. ; Glasser, W. G. , *Bioresource Technol.*, 1999, 70, 181-192
- ¹⁹ Morgenstern, B. ; Berger, W. , *Acta Polymer.* , 1993, 44, 100-102
- ²⁰ Kwatra, H. S. ; Caruthers, J.M. ; Tao, B.Y. , *Ind. Eng. Chem. Res.* 1992, 31, 2647-2651
- ²¹ Whistler, R. L. ; Feather, M.S. , *Methods Carbohydr. Chem.* , 1965, 5, 144-145
- ²² Dawsey, T.R. ; McCormick, C.L. , *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* , 1990, C30, 405-440
- ²³ Morgenstern, B. ; Kammer, H. W. , *Trends Polym. Sci.*, 1996, 4, 87-92
- ²⁴ Sjöholm, E. ; Gustafsson, K. ; Eriksson, B. ; Brown, W. ; Colmsjö, A., *Carbohydr. Polym.*, 2000, 41, 153-161

Capitolo 2

Le fibre di vegetali: composizione ed applicazioni

Introduzione

Le fibre tratte da materiali esistenti in natura e utilizzate in diverse applicazioni, mediante lavorazioni meccaniche che non ne modificano la struttura, sono di origine vegetale, animale o minerale.

Tra le fibre di origine vegetale ritroviamo il cotone, la canapa, la ginestra; tra quelle animali rientrano la lana e l'angora, mentre tra quelle minerali, l'amianto, il vetro tessile ed i fili metallici.

Le fibre naturali hanno un ruolo ancora oggi molto importante: il cotone, insieme alla fibra sintetica poliestere, è al primo posto dei consumi, mentre le altre fibre naturali che finora hanno avuto una collocazione di nicchia, stanno assumendo un'importanza strategica notevole.

Tra di esse particolare attenzione merita la ginestra, pianta cespugliosa che nei periodi primaverili colora di giallo il paesaggio mediterraneo, i cui fiori profumano intensamente.



2.1 Composizione chimica delle fibre vegetali

Le fibre vegetali sono costituite da una matrice polimerica formata da polisaccaridi, principalmente da cellulosa ed emicellulosa, da lignina e da costituenti non strutturali. Queste macromolecole non sono distribuite uniformemente nelle pareti cellulari¹ della fibra e la loro concentrazione relativa varia a seconda della posizione delle cellule nella pianta (Figura 2.1).

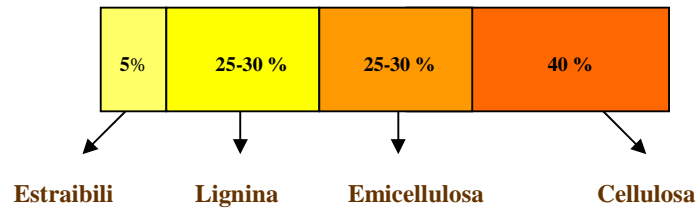


Fig. 2.1. Componenti della fibra vegetale

La cellulosa è il costituente più abbondante delle pareti cellulari vegetali, rappresentando circa il 40% del peso secco del campione e in alcuni casi anche il 90-95%, come per le fibre di cotone. Essa oltre alla funzione di sostegno delle piante, ha anche funzioni di immagazzinamento e di riserva di sostanze nutritive; si trova nelle piante come uno dei prodotti finali della sintesi clorofilliana.

La cellulosa è materia prima fondamentale perché entra nella costituzione di tutte le fibre tessili vegetali naturali e perché dalla sua lavorazione si ottengono molti prodotti di utilizzazione pratica, tra i quali la carta, le fibre tessili artificiali, gli esplosivi, il cellofan e le materie plastiche.

Uno dei primi materiali polimerici ad essere utilizzato come plastica, conosciuto con il nome “celluloide”, è stato il nitrato di cellulosa parzialmente funzionalizzato e miscelato con canfora come ammorbidente.

Esistono diversi metodi per ottenere la cellulosa dalle biomasse. L'elemento comune è il principio del progressivo impoverimento delle pareti cellulari dei vegetali, che può avvenire mediante trattamento chimico² o chimico-fisico³.

2.2 La fibra di ginestra

La ginestra è nota fin dall'antichità per il suo impiego come pianta da fibra. In passato, in molti paesi dell'Italia meridionale le famiglie si approvvigionavano di

notevoli quantità di ginestra per lavorarla e trasformarla in tessuto dal quale ricavano indumenti, tovaglie, sacchi e biancheria in genere.

Il futuro per la ginestra è invece tutto tecnologico, in quanto la tendenza generale di mercato è quella di sostituire i materiali sintetici o di origine minerale, altamente inquinanti e tossici, con le fibre di origine naturali, in particolare vegetali, per svariate applicazioni in diversi settori.

Anche i sottoprodotti ottenuti dalla lavorazione della pianta di ginestra vengono utilizzati in diverse applicazioni: le parti legnose o cellulose vengono utilizzate nell'industria pannellistica, i fiori nell'industria cosmetica per produrre essenze e coloranti, la sparteina, un alcaloide con attività diuretica, ed infine le fibre tessili innovative per l'abbigliamento e l'arredamento.

L'utilizzo di fibre vegetali, come il lino e la ginestra, è già diffuso nel settore automobilistico nella produzione di componenti realizzati con una combinazione di miscele plastiche e fibre. Infatti, questi materiali compositi "ecosostenibili" sono caratterizzati da elevate prestazioni, da basso peso specifico e costo ed, in alcuni casi, da biodegradabilità e biocompatibilità. Dunque le fibre naturali rappresentano un elemento fondamentale per la creazione di autovetture ecocompatibili⁴.

2.3 Materiali compositi a base di fibre naturali

I materiali compositi sono materiali di solito non presenti in natura e sono il risultato di una combinazione di almeno due materiali tra loro chimicamente differenti, i quali mantengono la propria identità nel composto finale senza dissolversi o fondersi completamente l'uno nell'altro. La combinazione così ottenuta vanta proprietà chimiche, fisiche e meccaniche non riscontrabili nei singoli materiali che la compongono. Si ottengono, così, materiali e strutture che trovano applicazioni vaste e sempre più numerose.

L'uso di fibre ad elevate proprietà meccaniche, come le fibre di carbonio, aramidiche o di vetro, consente di impiegare materiali polimerici in varie applicazioni (fabbricazione di aerei, automobili, imballaggi, ecc..)

La tecnologia dei materiali compositi è in continua evoluzione, ed è sempre più orientata verso l'utilizzo di biocompositi, ossia matrici polimeriche rinforzate con

fibre naturali, come fibre di canapa, juta e ginestra ^{5, 6,7}. Queste fibre, oltre ad avere un basso costo, presentano il vantaggio di possedere proprietà meccaniche altamente specifiche e, soprattutto, rappresentano un'alternativa riciclabile ai rinforzi sintetici più comuni, quali le fibre di vetro che non sono biodegradabili ^{8,9,10}. Diverse sono le fibre naturali utilizzate come rinforzo o riempimento, quali fibre di lino, cotone e juta, comunemente usate per rinforzare polimeri come polistirene ^{11,12}, poliesteri ¹³, poliolefine ^{14,15} e resine epossidiche ^{16,17}.

Anche la ginestra è una fibra che presenta molti vantaggi poiché è abbondante in natura, è biodegradabile, è a base di cellulosa e perciò non produce gas tossici quando è sottoposta a combustione. Inoltre, presenta una straordinaria resistenza alla trazione e flessibilità, e viene perciò combinata con miscele plastiche per produrre materiali compositi ¹⁸.

In generale, le fibre vegetali usate nei compositi migliorano il costo e le caratteristiche specifiche dei singoli componenti plastici utilizzati in diverse applicazioni, come nell'industria alimentare. Però, a causa della loro natura chimica, presentano anche alcuni svantaggi, come la scarsa compatibilità verso matrici polimeriche idrofobe, l'elevata affinità con l'acqua e la scarsa stabilità termica. Di conseguenza, si ha una debole interazione interfacciale tra le fibre e la matrice, che si riflette nelle scarse proprietà meccaniche dei compositi risultanti.

Poiché il materiale composito viene progettato in modo che le sue proprietà siano specifiche e volute, in molti casi è necessario inserire materiali di rinforzo, come le fibre, che devono essere modificati, allo scopo di impartire alla matrice polimerica che le contiene proprietà genericamente migliori.

Bibliografia

- ¹ Bray L. , *Plantes a fleurs d'Europe occidentale. Systematique evolutive, Diderot Multimedia*, Parigi, 2000
- ² Sun, R.C. ; Fang, J. M. ; Tomkinson, J. ; Hill, C. A. S. , *J. Wood Chem. Technol.*, 1999, **19**, 287-306
- ³ Ibrahim, M. ; Glasser, W. G., *Bioresource Technol.*, 1999, **70**, 181-192
- ⁴ Sicilia D. , *Dai tessuti ai prodotti alternativi*, Elicriso-mensile di informazione ambientale
- ⁵ Bledzki, A. K.; Gassan, J., *Prog Polym. Sci.* 1999, 24, 221-274
- ⁶ Cruz-Ramos, C. A., Mechanical properties of reinforced thermoplastic, Clegg, D. W.; Collyes A. A. (Eds), *London: Elsevier*, 1986, pp.65-81
- ⁷ Klason, C.; Kubat, J.; Stromvall, H. E., *Inter. J. Polymeric Mater.* , 1984, 10, 159-187.
- ⁸ Corbière-Nicollier, T.; Gfeller Laban, B.; Lundquist, L.; Letterrier, Y.; Manson, J.-A.E.; Jolliet, O. Life cycle assessment of biofibers replacing glass fibers as reinforcement in plastics. *Resour. Conserv. Recycl.* 2001, 33, 267-287.
- ⁹ Bledzki, A.K.; Reihmane, S.; Gassan, J. Properties and modification methods for vegetable fibers for natural fiber composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 1996, 59, 1329-1336.
- ¹⁰ Bledzki, A.K.; Gassan, J. Composites reinforced with cellulose based fibers. *Prog. Polym. Sci.* 1999, 24, 221-274.
- ¹¹ Nair, K.C.M.; Kumar, R.P.; Thomas, S.; Schit, S.C.; Ramamurthy, K. Rheological behaviour of short sisal fiber-reinforced polystyrene composites. *Composites Part A* 2000, 31, 1231-1240. 325
- ¹² Nair K.C.M.; Diwan, S.M.; Thomas, S. Sile properties of short sisal fiber-reinforced polystyrene composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 1996, 60, 1483-1497.
- ¹³ Dash, B.N.; Rana, A.K; Mishra, H.K.; Nayak, S.K.; Mishra, S.C.; Tripathy, S.S. Novel, low cost jute-polyester composites. Part 1: Processing, mechanical properties and SEM analysis. *Polym. Compos.* 1999, 20, 62-71.
- ¹⁴ Valadez-Gonzales, A.; Cervantes Uc J.M.; Holayo, R.; Herrera-Franco, P.J. Effect of fiber surface treatment on the fiber-matrix bond strength of natural fiber reinforcement composites. *Composites Part B* 1999, 30, 309-320.
- ¹⁵ Rana, A.K.; Mitra, B.C.; Banerjee, A.N. Short jute fiber-reinforced polypropylene composites: dynamic mechanical study. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999, 71, 531-539.
- ¹⁶ Gassan, J.; Gutowski, V.S. Effect of corona discharge and UV treatment on the properties of jute fibre epoxy composites. *Compos. Sci.Technol.* 2000, 60, 2857-2863.

¹⁷ Hepwort, D.G.; Vincent, J.F.V.; Jeronimidis, G.; Bruce, D.M. The penetration of epoxy resin into plant fibre cell walls increases the stiffness of plant fibre composites. *Composites Part A* 2000, 31, 599-601.

¹⁸ Avella, M.; Casale, L.; Dell'Erba, R.; Martuscelli, E. Broom fibers as reinforcement for thermoplastic matrices. *Macromol. Symp.* 1998, 127-211.

Capitolo 3

Preparazione e caratterizzazione di derivati della cellulosa da fibra di ginestra

Introduzione

Nell'ultimo decennio l'interesse per i biopolimeri è aumentato. Diversi sono stati i tentativi di realizzare nuovi sistemi compositi legando polimeri sintetici sullo scheletro di biopolimeri. Spesso, la diversa natura chimica dei materiali che costituiscono il composito rappresenta uno svantaggio nella progettazione di un materiale che deve possedere proprietà particolari. È il caso delle fibre vegetali, in particolare le fibre di ginestra, che vengono usate come rinforzo di matrici polimeriche. Le fibre, essendo costituite principalmente da cellulosa, presentano una scarsa compatibilità con la maggior parte dei polimeri sintetici utilizzati per realizzare materiali compositi. Per questo motivo, si è pensato di legare gruppi alogenati e gruppi polimerizzabili alle fibre di ginestra mediante legami covalenti (figura 3.1), allo scopo di realizzare materiali scarsamente infiammabili, aumentare la resistenza delle fibre e migliorarne l'adesione con la matrice polimerica in cui vengono inserite.

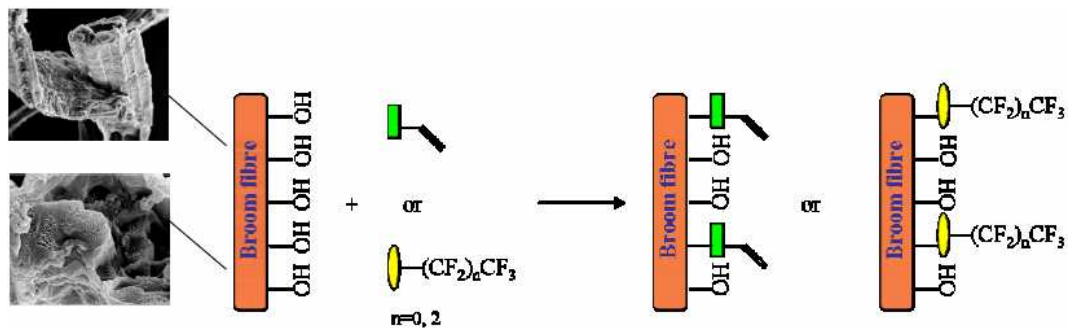


Fig. 3.1. Illustrazione schematica di derivatizzazione della fibra di ginestra

3.1 Funzionalizzazione della cellulosa da fibra di ginestra

In questo capitolo viene riportata la sintesi e la caratterizzazione di derivati della fibra di ginestra, utili a realizzare materiali compositi degradabili e resistenti al fuoco¹.

Sono state funzionalizzate le unità monomeriche glucosidiche della cellulosa, costituente principale della fibra di ginestra ottenuta dalle biomasse (figura 3.2).

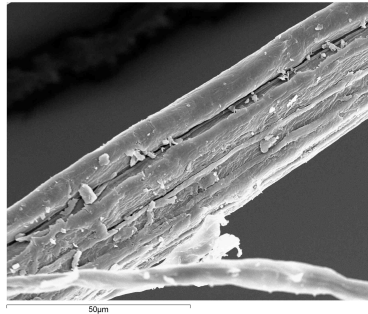


Fig. 3.2. Micrografia a scansione elettronica di fibra di ginestra

La messa a punto di tali sistemi ha previsto, in accordo con quelle che sono le reazioni tipiche dei gruppi ossidrilici delle unità glucosidiche, reazioni di esterificazioni, eterificazioni, ossidazioni ed ammidazioni.

Gli esteri della cellulosa possono essere ottenuti o facendo reagire i gruppi ossidrilici cellulosici direttamente con gli acidi carbossilici o utilizzando i classici derivati carbossilici (cloruri, anidridi). La reazione diretta porta a gradi di sostituzione (DS) della cellulosa molto bassi anche utilizzando grossi eccessi di acido carbossilico.

Relativamente all'eterificazione della cellulosa, riportata per la prima volta da Suida nel 1905, questa viene realizzata sostanzialmente attraverso due procedure sintetiche: la prima prevede la reazione dei gruppi ossidrilici con un alogenuro alchilico in accordo con la sintesi di Williamson degli eteri; la seconda consiste nell'apertura, da parte degli stessi gruppi ossidrilici, di epossidi.

Le reazioni di ossidazione della cellulosa che, in specifiche condizioni, lasciano inalterati i legami glucosidici, forniscono prodotti con nuovi gruppi funzionali, vale a dire carbossilici, aldeidici e chetonici.

In particolare, la cellulosa può essere ossidata direttamente al C-6 fornendo 6-carbossicellulosa. La procedura migliore prevede l'impiego di acido fosforico e nitrito di sodio come agente ossidante ². Il contenuto di gruppi carbossilici dipende non solo dal tempo di reazione ma anche dal grado di polimerizzazione del materiale celluloso di partenza. Sorprendentemente, la percentuale di ossidazione aumenta con l'aumentare del peso molecolare del materiale di partenza ³. Infine le ammidi della cellulosa possono essere ottenute mediante reazione della 6-carbossicellulosa con opportune ammine in presenza di dicicloesilcarbodiimmide (DCC) come agente condensante.

Le fibre di ginestra utilizzate sono state delignificate ⁴ mediante un pretrattamento in sistemi acquosi alcalini, che permette di ottenere fibre "pulite", cioè private delle emicellulose.

Dopo essiccamento a 80°C e pressione ridotta, le fibre di ginestra pretrattate sono state sottoposte a reazioni in fase eterogenea (schema 3.1) con acidi organici perfluorurati. Gli atomi di fluoro inseriti sulla fibra conferiscono al materiale una buona resistenza al fuoco ⁵, e rappresentano un'alternativa ai comuni agenti ritardanti di fiamma che sono tossici e contribuiscono alla diminuzione dello strato di ozono. Per questi derivati è stato valutato il comportamento termico mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria a scansione differenziale (DSC).

Inoltre, sulle fibre pretrattate sono stati inseriti gruppi polimerizzabili mediante reazioni di esterificazione, eterificazione e ammidazione.

Tutti i prodotti ottenuti sono stati caratterizzati mediante spettroscopia FT-IR ed il grado di sostituzione (DS) dei derivati è stato determinato mediante titolazione.

I derivati funzionalizzati con i gruppi polimerizzabili sono stati, in seguito, copolimerizzati con dimetilacrilammide e stirene, in modo da ottenere fibre ricoperte da un film polimerico. Le fibre così trattate, inserite come supporto in una matrice polimerica, mostreranno una maggiore interazione interfacciale con la matrice stessa, risultando in un materiale composito con una migliore resistenza rispetto ai compositi realizzati con le fibre non trattate.

Per tutti i materiali realizzati e per le fibre non modificate, è stata eseguita un'analisi morfologica mediante microscopio ad alta risoluzione ottica (OM) e microscopio a scansione elettronica (SEM).

3.1.1 Sintesi del trifluoroacetato di fibra di ginestra (2)

L'acido trifluoroacetico (TFA, 40 ml) e le fibre di ginestra pretrattate (1 g) sono state posti a temperatura ambiente per 20 minuti sotto agitazione. Successivamente è stata aggiunta anidride trifluoroacetica (TFAA, 20 ml) e lasciate a reagire per 4h. Si sono usate quantità in eccesso di TFA e TFAA al fine di immergere completamente la fibra nel sistema solvente-reagente e garantire un contatto omogeneo con tutta la fibra.

Il materiale ottenuto è stato filtrato, lavato con etere etilico e essiccato sotto vuoto a temperatura ambiente per 20h. Tracce di TFA e etere etilico presenti sul prodotto vengono rimosse essiccando sotto vuoto a 150°C per 40 minuti ⁶.

Il legame estereo del derivato trifluoroacetico è confermato da analisi FT-IR (schema 3.2) con la presenza del picco caratteristico di *stretching* C=O a 1786 cm⁻¹.

3.1.2 Sintesi dell'epptafluorobutirrato di fibra di ginestra (3)

Questo derivato è stato ottenuto mediante la procedura riportata nel precedente paragrafo, impiegando acido epptafluorobutirrico (HFBA, 20 ml), anidride epptafluorobutirrica (HFBA, 10 ml) e quantità catalitiche di acido solforico.

L'analisi FT-IR conferma la presenza del legame estereo del derivato epptafluorobutirrico. Lo spettro IR non riportato ed è analogo allo spettro del derivato **2**.

3.1.3 Sintesi dell'acrilato di fibra di ginestra (4)

Ad un sistema eterogeneo di fibre di ginestra (1.1 g) in 50 ml DMA e 3.3 g di LiCl ⁷ in presenza di piridina ⁸, mantenuto in atmosfera inerte, è stato aggiunto cloruro di acrilile (5 ml) in 30 min., e lasciato sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 notte. Dopo successiva agitazione a 30°C per 6 h, il prodotto viene filtrato, lavato con metanolo e più volte con etanolo, essiccato a 50°C sotto vuoto.

L'analisi FT-IR conferma il legame estereo del derivato acrilico (schema 3.2), con la presenza del picco a 1729 cm^{-1} della vibrazione di stretching C=O dell'estere.

3.1.4 Sintesi del vinilbenzoato di fibra di ginestra (5)

Il tionilcloruro (14.6 ml) è stato aggiunto a 10.8 g di acido 4-vinilbenzoico e la miscela è stata agitata a 40°C per 2h. Il residuo di SOCl_2 è stato rimosso mediante distillazione a pressione ridotta, mentre il p-vinilbenzoilcloruro (6.2 g) è stato raccolto ad una temperatura di 81°C e pressione di 2 torr. Quindi, alla fibra di ginestra (0.8 g) posta in DMA/LiCl ⁷ (36 ml/2.4 g) e 7 ml di piridina anidra, è stato aggiunto il p-vinilbenzoilcloruro (5.2 g). Il sistema eterogeneo si lascia reagire sotto agitazione per una notte e, successivamente, per altre 6h a 30°C . Dopo aggiunta di metanolo e lavaggi con etanolo, il prodotto è stato filtrato ed essiccato a 50°C sotto vuoto. Il legame estereo del derivato è confermato da analisi FT-IR (schema 3.2) con il picco a 1722 cm^{-1} caratteristico della vibrazione del carbonile dell'estere. La presenza di picchi tra 3000 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} è assegnata alla vibrazione dei C-H aromatici.

3.1.5 Sintesi del vinilbenzil etere di fibra di ginestra (6)

La reazione di eterificazione è stata realizzata mediante trattamento della fibra (1.1 g), sospesa in una soluzione di DMA/LiCl (50 ml/3.3 g), con 8.5 ml di 4-vinilbenzilcloruro in DMA/LiCl e piridina anidra ⁹, mantenendo la miscela sotto agitazione a 25°C per 70h e a 30°C per 6h. Dopo aggiunta di metanolo e molti lavaggi con etanolo, il prodotto è stato filtrato ed essiccato a 50°C sotto vuoto. L'analisi FT-IR conferma la presenza del gruppo vinilico con il segnale di stretching a 1655 cm^{-1} (schema 3.2). La presenza di picchi tra 3000 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} è assegnata alla vibrazione dei C-H aromatici.

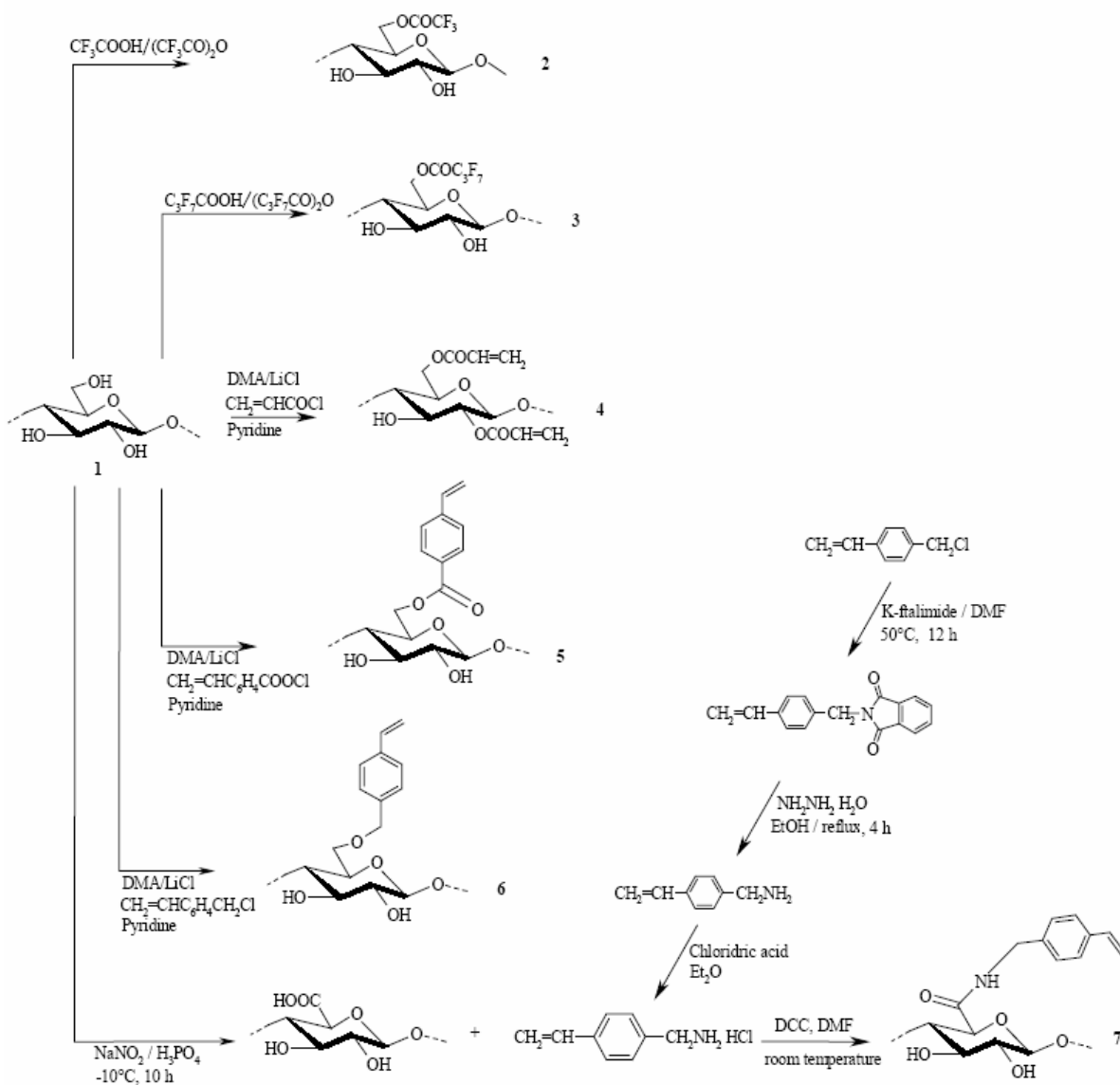
3.1.6 Sintesi del coniugato fibra ossidata- amminometilstirene (7)

La fibra di ginestra ossidata ¹⁰ (0.8 g equivalenti a 2.3 mmol/g COOH, il cui contenuto dei gruppi carbossilici è stato determinato mediante assorbimento di blu di metilene ^{11, 12}) è stata posta a reagire con 1.2 g di 4-aminometilstirene cloridrato (AMS), in presenza dell'agente condensante dicicloesilcarbodiimide (DCC, 1.6

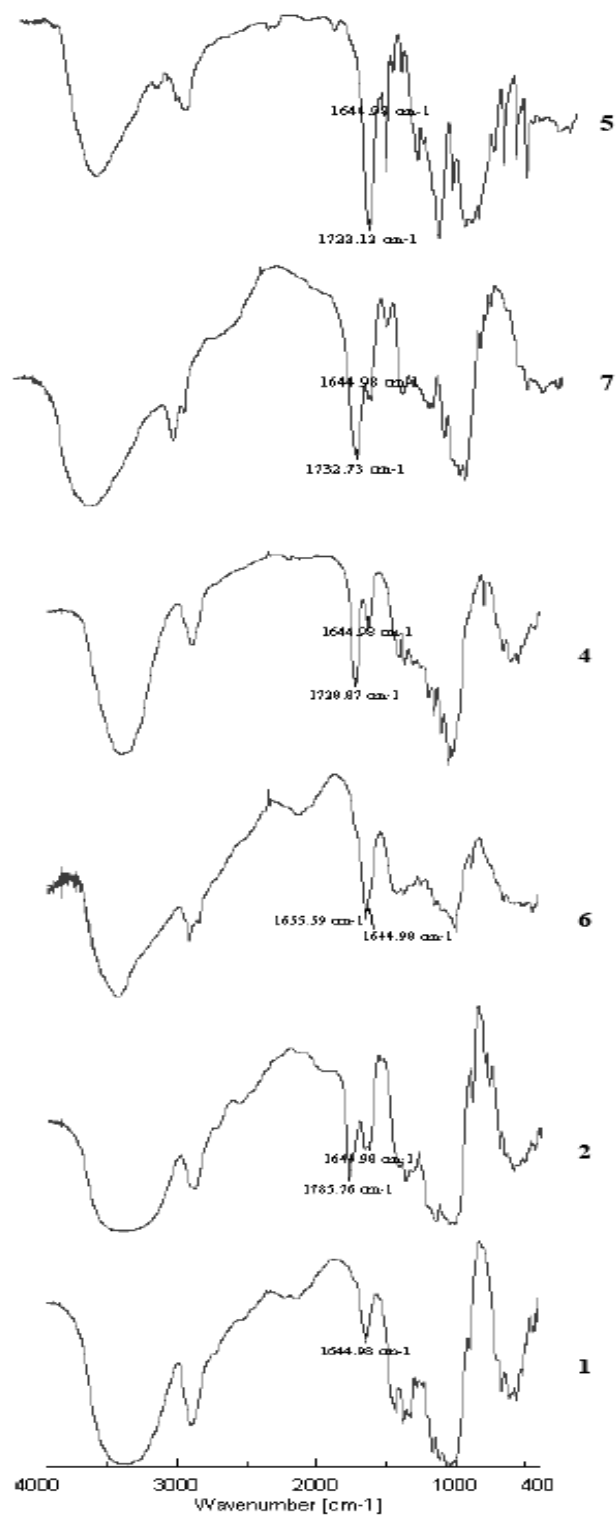
g), sotto agitazione a temperatura ambiente ¹³. L'andamento della reazione è stato monitorato mediante analisi HPLC della concentrazione del reagente AMS nel mezzo di reazione.

Dopo filtrazione e lavaggio con metanolo, il prodotto è stato essiccato a 50°C sotto vuoto.

L'analisi FT-IR conferma il legame ammidico del derivato con il picco a 1732 cm^{-1} , caratteristico dello stretching C=O ammidico (schema 3.2). La presenza di picchi tra 3000 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} è assegnata alla vibrazione dei C-H aromatici.



Schema 3.1. Funzionalizzazione della cellulosa da fibra di ginestra ad eteri, esteri ed ammidi.



Schema 3.2. Spettri FT-IR di fibre di ginestra: non reagita (1); trifluoroacetato (2); vinilbenzil etere (6); acrilato (4); vinilbenzoato (5) ; coniugato fibra ossidata-amminometilstirene (7).

3.2 Analisi quantitativa dei gruppi esterei dei derivati 2-5 (DS).

Tra i principali metodi di preparazione di derivati cellulosici, con sostituenti legati mediante legame covalente, vi è la completa o parziale esterificazione dei gruppi ossidrilici. Una completa funzionalizzazione di tutti i gruppi ossidrilici della cellulosa è più una eccezione che una regola, e la maggior parte dei prodotti presentano una grande quantità di gruppi ossidrilici liberi. Quindi, l'informazione sul rendimento della reazione e sulla distribuzione dei sostituenti è molto importante ed è caratterizzata dal grado di sostituzione (DS) che è compreso tra 0 e 3 e determina il numero medio dei gruppi ossidrilici modificati per unità anidroglicosidica (AGU).

Il DS è stato determinato facendo reagire 50 mg di campione in 5 ml di una soluzione etanolica di NaOH 0.25 M a riflusso per 17h. L'eccesso di soda è stato determinato mediante titolazione con HCl 0.1 N (1° punto equivalente). Le moli di acido usate tra il 1° e il 2° punto equivalente corrispondono alle moli di estere libero. Il DS è stato calcolato secondo l'equazione 3.1:

$$DS = \frac{MM_{glucose\ unit}}{(g_{sample} / n_{free\ ester}) - (MM_{free\ ester} - MM_{H_2O})} \quad \text{Equazione} \quad 3.1$$

$n_{free\ ester} = (V_{2^{\circ} e.p.} - V_{1^{\circ} e.p.}) * [HCl]$; $MM_{glucose\ unit}$: massa molecolare dell'unità glucosidica;

g_{sample} : peso del campione; $n_{free\ ester}$: mol di estere libero; $MM_{free\ ester}$: massa molecolare di estere libero; MM_{H_2O} : massa molecolare di acqua

Nella tabella 3.1 sono riportate le medie dei valori di DS (misura in triplicato) dei derivati esterei della fibra.

Tabella 3.1

<i>Campione</i>	<i>DS</i>
2	0.82±0.09
3	0.37±0.05
4	1.70±0.10
5	0.71±0.07

3.3 Determinazione del contenuto dei gruppi vinilbenzilico e amminometilstirene dei derivati 6 e 7

Un metodo classico per ottenere informazioni sul gruppo vinilico è la determinazione del numero di iodio ¹⁴. I derivati **6** e **7** sono stati fatti reagire separatamente con un eccesso di una soluzione di iodio monoclورو (reagente di Wijs) sotto controllate condizioni, in modo da aggiungere quantitativamente gli alogeni al gruppo vinilico. La quantità di alogeni non reagiti è stata determinata tramite titolazione con tiosolfato. Il numero di iodio, definito come i grammi di alogeno assorbiti dai derivati, è stato determinato secondo l'equazione 3.2:

$$n. \text{ iodio} = \frac{(\text{bianco titolato} - \text{campione titolato}, \text{ ml})(0,01269)(100)}{\text{peso campione}, \text{ g}}$$

$0,01269 = \text{g iodio titolati da 1ml di tiosolfato } 0.1M$

Equazione 3.2

Nella tabella 3.2 sono riportate le medie dei valori (misura in triplicato) determinati per i derivati della fibra **6** e **7**.

Tabella 3.2

<i>Campione</i>	<i>n. iodio</i>	<i>Iodio/massa campione (mmol/g)</i>
6	17	0.65±0.05
7	26	0.98±0.06

3.4 Copolimerizzazione delle fibre di ginestra

La polimerizzazione è stata eseguita sul derivato acrilico **4**, utilizzando N,N-dimetilformammide (DMF) come solvente, azobisisobutirronitrile (AIBN) come iniziatore di polimerizzazione radicalica, N,N-dimetilacrilammide (DMAA) o stirene come comonomeri ¹⁵, lavorando in eccesso e in quantità stechiometrica di comonomero. I materiali copolimerizzati con DMAA sono stati filtrati e lavati inizialmente con acqua, per eliminare tracce di comonomero, e successivamente con acetone. Al contrario, quelli copolimerizzati con stirene sono stati

inizialmente lavati con n-esano e successivamente con acetone. La preparazione dei copolimeri dei derivati **5**, **6** e **7** è ancora in fase di studio.

Le condizioni sperimentali delle reazioni di copolimerizzazione sono riportate nella tabella 3.3.

Tabella 3.3

<i>Derivato</i>	<i>Comonomero</i>	<i>Comonomero</i>	<i>Iniziatore</i>	<i>Solvente</i>	<i>Solventi di lavaggio</i>		
<i>4</i>	<i>DMAA</i>	<i>Stirene</i>	<i>AIBN</i>	<i>DMF</i>	<i>H₂O</i>	<i>n-</i>	<i>acetone</i>
<i>(g)</i>	<i>(g)</i>	<i>(g)</i>	<i>(g)</i>	<i>(ml)</i>	<i>(ml)</i>	<i>esano</i>	<i>(ml)</i>
						<i>(ml)</i>	
1.0	0.46	-	0.01	25.0	3x20	-	3x20
0.57	9.62	-	0.30	"	3x300	-	3x300
0.50	-	0.5	0.01	"	-	3x20	3x20
0.51	-	7.13	0.22	"	-	3x300	3x300

3.5 Microscopia ottica ad alta risoluzione e microscopia a scansione elettronica (SEM)

La caratterizzazione della superficie delle fibre copolimerizzate è stata effettuata inizialmente mediante indagine al microscopio ottico ad alta risoluzione (fig. 3.3). L'analisi morfologica delle fibre è stata, inoltre, eseguita mediante microscopia a scansione elettronica (SEM) che è la più diffusa tra le tecniche analitiche di indagine superficiale. Questa tecnica, che fornisce una immagine tridimensionale delle caratteristiche superficiali, illustra chiaramente, come il microscopio ottico, che la superficie della fibra di ginestra non reagita (fig 3.4a) è meno omogenea di quella copolimerizzata con quantità stechiometrica di DMAA (fig 3.4b) e copolimerizzata con eccesso di DMAA (fig 3.4c). Tutti i derivati hanno un aspetto fibroso ed una superficie liscia paragonati a quella delle fibre non trattate. Le fibre di ginestra acrilate e copolimerizzate con DMAA, hanno fornito un materiale che mantiene la sua natura fibrosa ma ricoperto di un film polimerico.

Le micrografie delle fibre acrilate e copolimerizzate con eccesso e con quantità stechiometrica di DMAA mostrano quanto finora discusso.

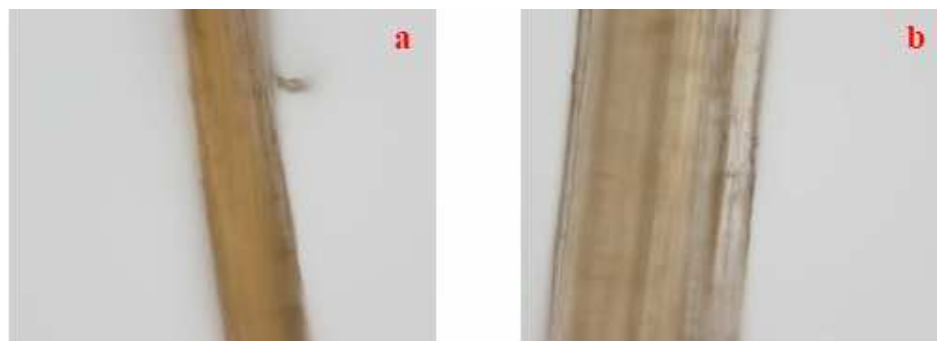


Fig. 3.3. Micrografia ottica di fibra di ginestra acrilata copolimerizzata con *a)* quantità stechiometrica di DMAA; *b)* eccesso di DMAA

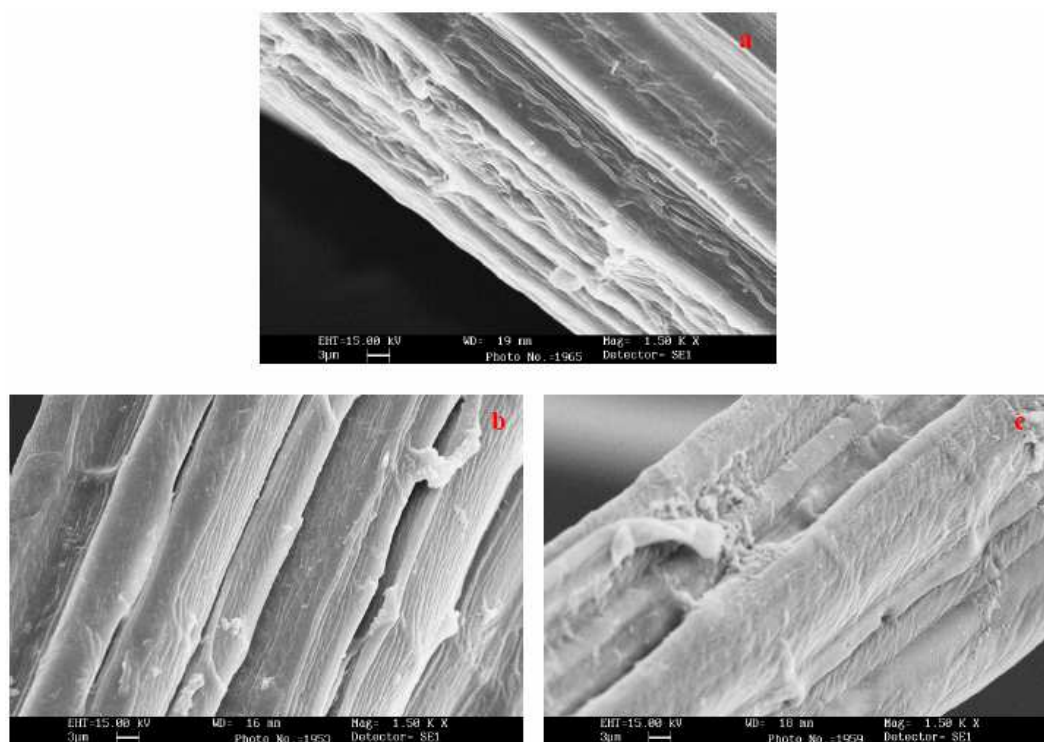


Fig. 3.4. SEM di fibra di ginestra: *a)* non reagita; *b)* copolimerizzata con quantità stechiometrica di DMAA; *c)* copolimerizzata con eccesso di DMAA

Analogamente, la copolimerizzazione con quantità equimolare e in eccesso di stirene ha fornito materiali fibrosi ricoperti di strati polimerici di vario spessore, che sono funzione della quantità di comonomero utilizzata.

Sono in corso studi analoghi sulle fibre funzionalizzate con gruppi stirenici **5 e 6** e copolimerizzati con quantità equimolare ed eccesso di stirene.

3.6 Analisi termogravimetrica dei derivati 2,3

Nell'analisi termogravimetrica (TGA) è riportata la perdita di massa di un campione in funzione dell'incremento della temperatura. L'analisi TGA è stata condotta riscaldando 5 mg dei campioni **2** e **3** da 30°C a 600°C ad una velocità di 10°C/min, sotto un flusso di ossigeno di 30 ml/min. L'esperimento è stato ripetuto in doppio. Queste condizioni operative permettono lo studio della degradazione termo-ossidativa delle fibre di ginestra modificate con composti ritardanti di fiamma come gli acidi trifluoroacetico ed eptafluorobutirrico. Nella figura 3.5 sono riportati i grafici relativi alla perdita di peso (fig. superiore) e la corrispondente velocità di perdita di peso (fig. inferiore). La degradazione termo-ossidativa della fibra non derivatizzata (curva in nero) avviene in due stadi: il primo di volatilizzazione tra 225°C e 400°C, con una velocità massima di decomposizione a 357°C, che lascia un residuo carbonioso del 60% circa della massa iniziale, mentre nel secondo stadio tra 410°C e 520°C, con una velocità massima di decomposizione a 474°C, il residuo è completamente volatilizzato.

Il trattamento delle fibre con acidi polifluorurati modifica il comportamento termo-ossidativo delle fibre di ginestra. Analogamente alla fibra non derivatizzata, la perdita di peso per la fibra derivatizzata con acido eptafluorobutirrico **3** (curva in rosso) avviene in due stadi ben separati: il primo è spostato ad una temperatura minore di velocità massima di decomposizione (319°C), mentre il secondo stadio avviene bruscamente come evidenziato dalla curva della velocità di perdita di peso.

La fibra derivatizzata con acido trifluoroacetico **2** (curva in verde) presenta tre stadi di perdita di peso: i primi due, parzialmente sovrapposti, da 225°C a 370°C con velocità massima di 286°C e 306°C, il terzo da 380°C a 420°C con velocità massima di 405°C.

Il rilascio di alogeno derivati, che è fondamentale nel meccanismo di azione dei ritardanti di fiamma a base di alogenuri¹⁶, può spiegare la ridotta stabilità termica delle fibre derivatizzate, evidenziata dallo spostamento a più basse temperature dei primi stadi relativi alla perdita di peso. Gli ultimi stadi di perdita di peso, a 474°C per **3** e a 405°C per **2** rispettivamente, possono essere causati da un rapido collasso dello strato carbonioso protettivo formato durante i primi stadi di

degradazione termo-ossidativa delle fibre chimicamente modificate, seguiti da brusca ossidazione del residuo organico. Per comprendere pienamente il meccanismo di degradazione chimica che porta ai comportamenti termo-ossidativi osservati, è necessario uno studio più approfondito.

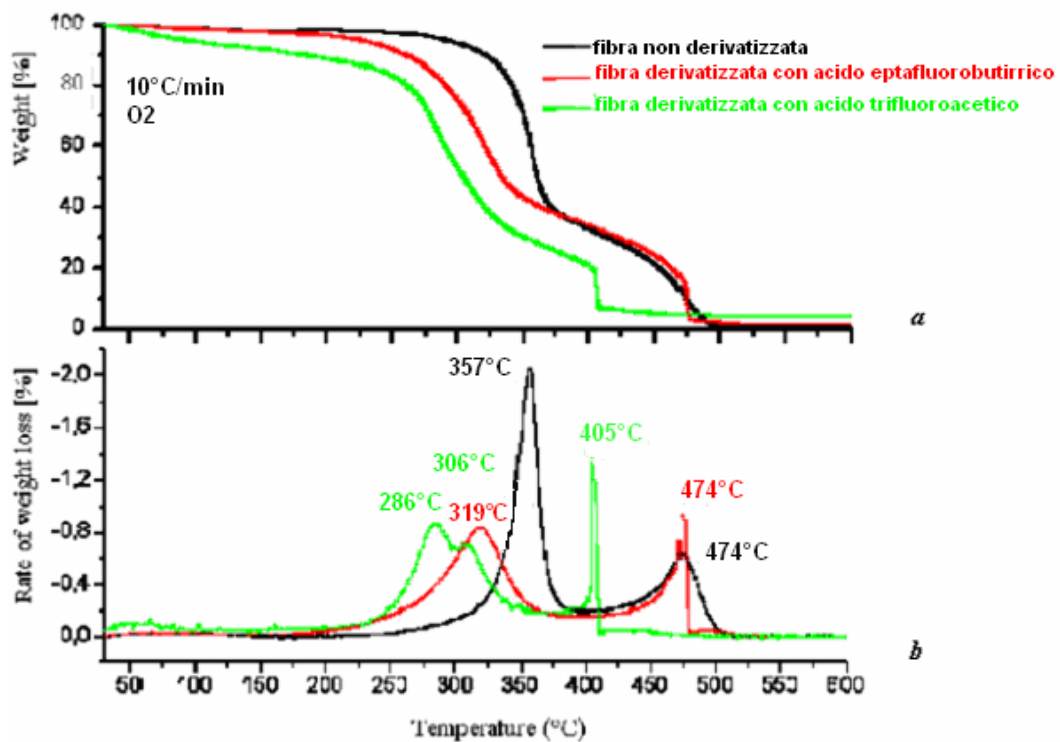


Fig. 3.5. Curve di analisi termogravimetrica (a) e derivata (b) di fibre di ginestra e fibre funzionalizzate con acidi trifluoroacetico ed eptafluorobutirrico

3.7 Conclusioni

Sono stati preparati derivati da fibre di ginestra introducendo gruppi polimerizzabili o residui polialogenati sulle fibre pretrattate. La formazione di tutti i derivati sintetizzati è stata confermata da analisi spettroscopica FT-IR.

La stabilità termica dei materiali fluorurati è stata valutata mediante TGA, i cui risultati suggeriscono che la presenza degli atomi di fluoro modifica la decomposizione termica delle fibre di ginestra. La diminuita infiammabilità delle

fibre modificate con acido trifluoroacetico in confronto al derivato eptafluorobutirrico è principalmente attribuibile a differenti DS.

Relativamente alle fibre di ginestra derivatizzate con gruppi polimerizzabili, la scelta di usare monomeri acrilamidici o stirenici è stata dettata dalla necessità di avere sulla superficie uno strato idrofilo o lipofilo, covalentemente legato alla fibra. Con questa modifica, la fibra può essere utilizzata come riempimento in materiali polimerici compositi che dovrebbero mostrare una maggiore resistenza di quelli realizzati con fibre non trattate.

L'idea è quella di realizzare, in futuro, derivati fluorurati da funzionalizzare con gruppi polimerizzabili, in modo da ottenere materiali polimerizzabili e alogenati, quindi scarsamente infiammabili (fig. 3.6). Questi nuovi materiali, interamente ottenuti da fonti rinnovabili, potrebbero essere utilizzati in agricoltura, nella realizzazione di cordame o di confezioni di prodotti naturali, oppure rimpiazzare i contenitori a base di alluminio^{17,18} usati nel confezionamento degli alimenti. Infatti, l'Istituto Nazionale della Nutrizione, che appartiene al Concilio Indiano della Ricerca Medica, ha concluso che l'alluminio proveniente da molti sorgenti è all'origine di effetti nocivi sulla salute umana. In modo particolare, l'alluminio può contribuire in modo significativo allo sviluppo di malattie come l'Alzheimer ed altri disturbi di natura nervosa¹⁹.

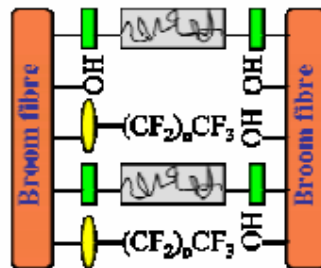


Fig. 3.6. Illustrazione schematica di fibre alogenate e polimerizzate

Bibliografia

- ¹ R. Cassano, S. Trombino, E. Bloise, R. Muzzalupo, F. Iemma, G. Chidichimo, N. Picci. (2007). New broom fibers (*Spartium junceum* L.) derivatives: Preparation and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (23) 9489-9495
- ² Painter, T. J. , *Carbohydr. Res.* , 1977, 59, 711-720
- ³ Heinze, Th. , Klemm, D. , Schnabelrauch, M. , Nehls, I. , *Cellulosics: Chemical, Biochemical and Material Aspects*, 1993, 349-355
- ⁴ Chidichimo, G.; Gabriele, B.; Salerno, G.; Alampi, C.; Cerchiara, T.; Vetere, M. Processo chimico-fisico per la produzione di fibre vegetali. Depositorio: Università della Calabria. Italia *Italian Patent, CZ2006A00006*, 2006.
- ⁵ Kroeze, C.; Matthijsen, A.J.C.M. Fluorocarbons and sulfur hexafluoride (SF₆): a methodology for national emission inventories and scenarios applied to the Netherlands. *Water, Air, and Soil Pollution.*, 1998, 107, 197-218.
- ⁶ Liebert, T.; Schnaberlauch, M.; Klemm, D.; Erler, U. Readily hydrolysable cellulose esters as intermediates for the regioselective derivatization of cellulose; II. Soluble, highly substituted cellulose trifluoroacetates. *Cellulose 1*. 1994, 249-258.
- ⁷ Klemm, D.; Philipp, B.; Heinze, T.; Heinze, U.; Wagenknecht W. Systematics of Cellulose Functionalization. In *Comprehensive Cellulose Chemistry*. Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht W., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 1998; Vol. 2, pp 197, 308.
- ⁸ Rahn, K.; Diamantoglou, M.; Klemm, D.; Berghmans, H.; Heinze, Th. Homogeneous synthesis of cellulose p-toluenesulfonates in N,N-dimethylacetamide/LiCl solvent system. *Angew. Makromol. Chem.* 1996, 238,143-163.
- ⁹ Isogai, A.; Ishizu, A.; Nakano, J. Thermal and structural properties of tri-*O*-substituted cellulose ethers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1985, 30, 345-353.
- ¹⁰ Isogai, A.; Ishizu, A.; Nakano, J. Preparation of tri-*O*-substituted cellulose ethers by the use of a nonaqueous cellulose solvent. *J. Appl. Polym. Sci.* 1984, 29, 3873-3882.
- ¹¹ Klemm, D.; Philipp, B.; Heinze, T.; Heinze, U.; Wagenknecht W. Experimental Protocols for the Analysis of Cellulose- Appendix to Volume 1. In *Comprehensive Cellulose Chemistry*. Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht W., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 1998; Vol. 1, pp 236.
- ¹² USP, 1995. Oxidized Regenerated Cellulose. United States Pharmacopeia 23/Formulary18, 319. National.

-
- ¹³ Zhu, L.; Kumar, V.; Banker, G.S. Examination of oxidized cellulose as a macromolecular prodrug carrier: preparation and characterization of an oxidized cellulose-phenylpropanolamine conjugate. *Int. J. Pharm.* 2001, 223, 35-47.
- ¹⁴ Codex Alimentarius. Vol. 8 - Fats, oils and related products. Second Edition (Revised 2001). Joint FAO/WHO Food Standards Programme.
- ¹⁵ Zhang, Z.B.; McCormick, C.L. Graft copolymerization of cellulose with structopendant unsaturated ester moieties in homogeneous solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997, 66, 307-317.
- ¹⁶ Lewin, M.; Weil, E.D. *In Fire retardant materials*; Horrocks, A.R., Price, D., Eds.; 376; Publisher: Woodhead Ltd, England, 2001,31-68.
- ¹⁷ Liukkonen-Lilja, H.; Piepponen, S. Leaking of aluminum from aluminum dishes and packages. *Food Addit Contam.* 1992, 9, 213-223.
- ¹⁸ Muller, J.P.; Steinegger, A.; Shlatter, C. Contribution of aluminum from packaging materials and cooking utensils to the daily aluminium intake. *Z Lebensm Unters Forsh.* 1993, 197, 332-341.
- ¹⁹ Jansson, E.T. Aluminum exposure and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2001, 3, 541-549.

Capitolo 4

Sistemi polimerici per rilascio di farmaci: i profarmaci

Introduzione

Negli ultimi anni, la ricerca nel settore farmaceutico ha focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di nuovi sistemi in grado di veicolare il farmaco nell'organismo e rilasciarlo in quantità e velocità controllata.

L'obiettivo principale è quello di migliorare l'effetto terapeutico di un farmaco indirizzandolo esclusivamente verso l'organo o il sito recettoriale con dosaggio adeguato e per il tempo necessario ad esplicare la sua azione.

4.1 Drug Delivery Systems (DDS)

In una terapia convenzionale il farmaco, nell'opportuna forma farmaceutica, è somministrato attraverso un'applicazione non specifica, cioè che non interessa il sito in cui il farmaco deve agire, e periodica, cioè ripetuta più volte nella giornata e ad intervalli regolari. Quindi il farmaco, dopo somministrazione, sarà presente non solo nel sito d'azione, ma sarà trasportato dal flusso ematico anche in altri tessuti. Questa distribuzione incontrollata nell'organismo può portare ad una diminuzione dell'azione terapeutica e contemporaneamente può dar luogo ad effetti collaterali.

Nell'intento di ridurre la tossicità delle terapie tradizionali¹, la ricerca si è orientata verso l'utilizzo di sistemi a rilascio di farmaci (Drug Delivery Systems, DDS), forme farmaceutiche in cui il farmaco viene miscelato o incorporato in prodotti, in genere matrici polimeriche di origine naturale e sintetica, biodegradabili e non biodegradabili, che veicolano e rilasciano in modo controllato il farmaco. Questi sistemi, grazie alle loro proprietà intrinseche, aumentano l'efficienza terapeutica del farmaco mediante meccanismi che ne modificano la farmacocinetica, mediante un rilascio al sito attivo specifico e la protezione del farmaco da reazioni di degradazione metabolica, permettendo anche la somministrazione di principi attivi con breve emivita o farmaci che danno luogo a effetti secondari e tossici di notevole entità.

Ogni farmaco svolge la sua azione entro una determinata finestra terapeutica. Somministrando forme farmaceutiche convenzionali, le variazioni delle concentrazioni plasmatiche, dopo somministrazioni di dosi singole, seguono un andamento pulsato con indesiderate punte di massimo, che superano la concentrazione minima tossica (CMT), oltre la quale si possono verificare degli effetti collaterali, e punte di minimo, inferiori alla concentrazione minima efficace (CME), in cui il farmaco non ha effetto.

Pertanto, al fine di mantenere un adeguato livello terapeutico, nelle classiche somministrazioni di farmaci per via orale, parenterale o endovena, è necessario aumentare la frequenza di somministrazione del farmaco (figura 4.1). Si raggiungono così elevati livelli di concentrazione ematica con l'inconveniente dell'instaurarsi di effetti collaterali.

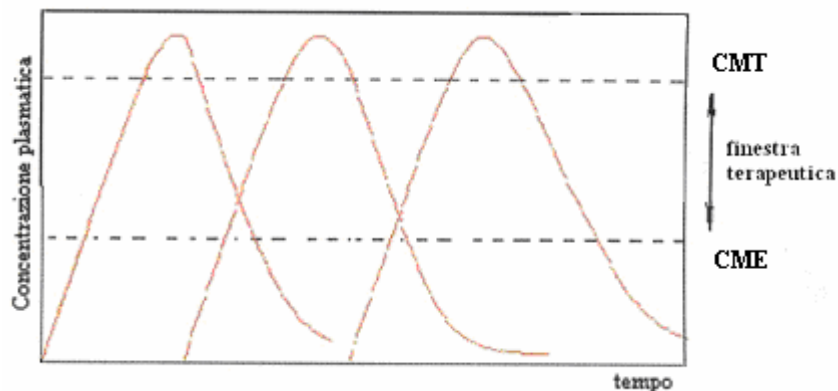


Figura 4.1. Andamento della concentrazione plasmatica del farmaco nelle terapie tradizionali

I sistemi a rilascio controllato possono mantenere concentrazioni ottimali di farmaco nel plasma, attraverso un rilascio con cinetica di ordine zero o assai prossima, senza apprezzabili fluttuazioni ed eliminando la necessità di somministrazioni ripetute di singole dosi (figura 4.2).

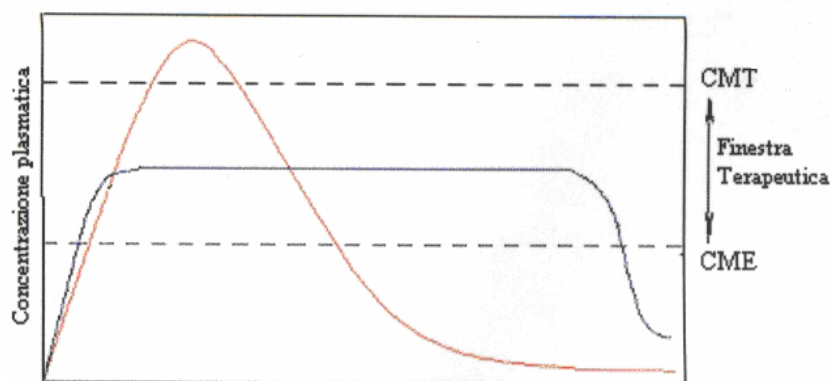


Figura 4.2. Andamento della concentrazione plasmatica del farmaco nelle terapie con DDS (linea nera) vs terapie tradizionali (linea rossa)

Inoltre, questi sistemi possono localizzare il rilascio del farmaco in un determinato compartimento del corpo, migliorandone l'azione e riducendo gli effetti collaterali dovuti ad elevati livelli sistemici, possono proteggere principi attivi facilmente degradabili e migliorare la *compliance* del paziente.

4.2 Profarmaci

Una molecola farmacologicamente attiva, benché dotata di caratteristiche idonee a produrre una certa risposta terapeutica, non necessariamente possiede le migliori proprietà connesse alla sua struttura molecolare per essere trasportata intatta dal sito di somministrazione al suo sito di azione. Generalmente, solo una piccola frazione della dose somministrata raggiunge il sito bersaglio e, poiché la maggior parte del farmaco è libera di interagire con altri sistemi recettoriali presenti in altri siti non-bersaglio, una limitata efficacia è il rischio minore, spesso associato all'insorgenza di effetti collaterali.

Sulla base di questa osservazione, per cercare di individuare una soluzione adattabile alle lavorazioni tecnologiche di sostanze farmaceutiche, la ricerca si è orientata ai profarmaci.

Il termine profarmaco (*pro-drug*) definisce un composto non dotato di una sua intrinseca attività farmacologica ma che diventa attivo dopo aver subito una

biotrasformazione, di tipo chimico od enzimatico, sul sito bersaglio. Il profarmaco costituisce pertanto il precursore del farmaco, rappresentato dal suo metabolita.

Dal punto di vista strutturale e funzionale, le caratteristiche di un profarmaco possono essere così riassunte:

- la parte attiva del profarmaco è legata ad un gruppo vettore temporaneo attraverso un legame covalente, degradabile in vivo attraverso una reazione chimica o enzimatica;
- il profarmaco è farmacologicamente inattivo o molto meno attivo del suo prodotto di scissione metabolica o idrolitica;
- il gruppo vettore, dopo la scissione, non deve possedere una propria attività o tossicità.

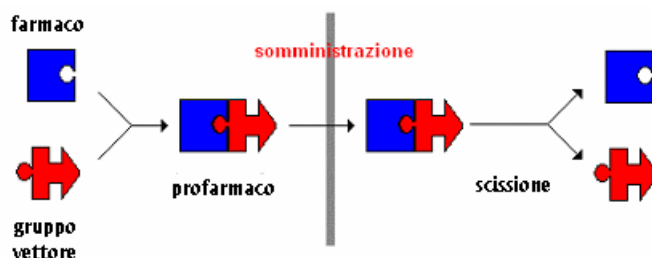


Figura 4.3. Rappresentazione schematica del meccanismo di azione di un profarmaco

4.3 Profarmaci polimerici

Tradizionalmente, i profarmaci sono stati utilizzati per aumentare la solubilità dei farmaci, migliorarne le proprietà di trasporto ed aumentarne la stabilità. I profarmaci polimerici, sistemi in cui il farmaco è ancorato ad una matrice polimerica, oltre a queste caratteristiche presentano il vantaggio di prolungare e mirare il rilascio mediante meccanismi che alterano la farmacocinetica e migliorano la specificità al sito attivo. I principi e le potenziali applicazioni di tali sistemi, soprattutto in chemioterapia, sono state recentemente studiate^{2,3,4,5,6}.

Molti materiali polimerici possono essere utilizzati come composti ad attività terapeutica intrinseca o come *carrier*, cioè come molecole in grado di trasportare un

farmaco e indirizzarlo verso un sito specifico. I polimeri usati per la realizzazione di tali sistemi devono essere chimicamente inerti, non devono influenzare l'attività del farmaco ma devono proteggerlo da possibili alterazioni chimiche e/o enzimatiche, devono essere biocompatibili e devono contenere gruppi funzionali che permettano la coniugazione chimica con il farmaco. Inoltre, sia il polimero che i suoi prodotti di degradazione devono essere non tossici, non cancerogeni e non teratogeni, immunocompatibili, e metabolizzati o escreti dal corpo.

Un modello semplificato di un coniugato polimero-farmaco usato in molti studi^{7,8,9,10,11} (fig. 4.4) consiste di un polimero *carrier* che porta sulla sua catena laterale il farmaco ed una molecola che ha la funzione di riconoscere il sito bersaglio (*homing device*). Il *carrier* può essere un polimero biodegradabile o inerte, che forma lo scheletro del sistema e protegge il farmaco da veloci reazioni che lo degradano.

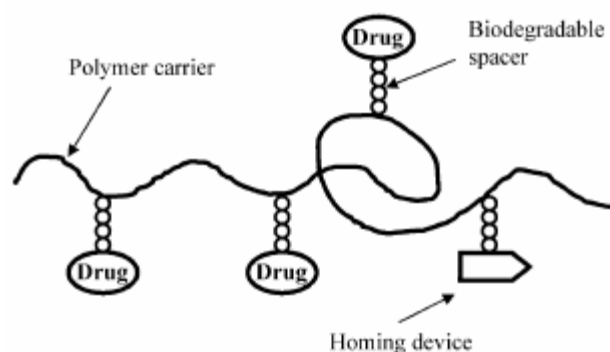


Figura 4.4. Schema di un profarmaco polimerico

Il farmaco può essere attaccato al *carrier* mediante uno spaziatore suscettibile a degradazione enzimatica o idrolitica. La scelta appropriata dello spaziatore permette di controllare il sito e la velocità di rilascio del farmaco dal sistema e, quindi, la sua attivazione¹². Il sito del rilascio del farmaco può essere inoltre controllato da un'opportuna scelta dell'*homing device*, per esempio un anticorpo che riconosce come sito bersaglio gli specifici recettori nel corpo.

I polimeri utilizzabili per la preparazione di profarmaci polimerici possono essere classificati in base alla loro origine (naturale o sintetica), natura chimica (polimeri

vinilici, acrilici, polisaccaridi, poliamminoacidi, ecc.) e alla loro stabilità strutturale (stabili o biodegradabili. E' stata studiata un'ampia varietà di polimeri, naturali e sintetici, come albumina, chitina, destrano, polietilenglicole, acido poligalatturonico, poli(N-(2-idrossipropilmetacrilammide- vinilpirolidone)) copolimero, acido poli(L-aspartico), poli(L-lisina), poli(idrossietil-L-glutamina), acido poli(a-L-glutammico), poli(stirene-anidridemaleica) copolimero¹³, utilizzabili come *carrier* macromolecolari. Anche se molti di questi sistemi sono stati testati clinicamente^{14,15} con ottimi risultati, soprattutto nelle terapie antitumorali¹⁶, la ricerca continua verso la sperimentazione di nuovi *carrier* macromolecolari per realizzare profarmaci polimerici.

Bibliografia

- ¹ Griffith, L.G., 2000. *Polymeric biomaterials. Acta Mater.* 48, 263-277.
- ² Sezaki, H., Hashida, M., 1984. Macromolecular–drug conjugates in targeted cancer chemotherapy. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1, 1–38.
- ³ Duncan, R., 1992. Drug–polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anti-cancer Drugs* 3, 175–210.
- ⁴ Putnam, D., Kopecek, J., 1995. Polymer conjugate with antitumor activity. *Adv. Polym. Sci.* 122, 55–123.
- ⁵ Kumar, V., Banker, G.S., 1996. Target oriented drug delivery systems. In: Banker, G.S., Rhodes, C.T. (Eds.), *Modern Pharmaceutics*. Marcel Dekker, New York, p. 611.
- ⁶ Hoffman, A.S., 1998. A commentary on the advantages and limitations of synthetic polymer–biomolecule conjugates. In: *Biorelated Polymers and Gels*. Academic Press, New York.
- ⁷ K. Ulbrich, V. Subr, J. Strohalm, D. Plocova´, M. Jelinkova´, B. Rihova´. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules: I. Synthesis and physico-chemical characterisation, *J. Control. Release* 64 (2000) 63–79.
- ⁸ B. Rihova´, M. Jelinkova´, J. Strohalm, V. Subr, D. Plocova´, O. Hovorka, M. Novak, D. Plundrova´, Y. Germano, K. Ulbrich, Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules: II. Anti-cancer activity of antibody or (Fab´)2-targeted conjugates and combined therapy with immunomodulators, *J. Control. Release* 64 (2000) 241–261.
- ⁹ K. Hoste, E.H. Schacht, L.W. Seymour, New derivatives of polyglutamic acid as drug carrier systems, *J. Control. Release* 64 (2000) 53– 61.
- ¹⁰ S. Sakuma, Z.R. Lu, B. Pecharova´, P. Kopeckova´, J. Kopecek, N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide copolymer-9-aminocamptothecin conjugate: colon-specific drug delivery in rats, *J. Bioact. Compat. Polym.* 17 (2002) 305– 319.
- ¹¹ F. Searle, S. Gac-Breton, R. Keane, S. Dimitrijevic, S. Brocchini, E.A. Sausville, R. Duncan, N-(2-hydroxypropyl)- methacrylamide copolymer-6-(3-aminopropyl)-ellipticine conjugates. Synthesis, in vitro, and preliminary in vivo evaluation, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 711 – 718.
- ¹² Karel Ulbrich, Vladimir Subr. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1023– 1050

-
- ¹³ Sezaki, H., Hashida, M., 1984. Macromolecular–drug conjugates in targeted cancer hemotherapy. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1, 1–38.
- ¹⁴ R. Duncan, S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y.N. Sat, R. Satchi, F. Searle, Polymer – drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic, *J. Control. Release* 74 (2001) 135– 146.
- ¹⁵ R. Satchi, T.A. Connors, R. Duncan, PDEPT: polymer-directed enzyme prodrug therapy I. HPMA copolymer-cathepsin B and PK1 as a model combination, *Br. J. Cancer* 85 (2001) 1070–1076.
- ¹⁶ R. Satchi-Fainaro, W. Wrasidlo, H.N. Lode, D. Shabat, Synthesis and characterization of a catalytic antibody–HPMA copolymer-conjugate as a tool for tumor selective prodrug activation. *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 3023– 3029.

Capitolo 5

Sintesi e caratterizzazione di un profarmaco a base di cellulosa

Introduzione

Molti polimeri naturali, polisaccaridi come destrano, inulina e chitosano, proteine come albumina serica bovina¹ e umana, transferrina e glicoproteine, sono largamente utilizzati nella realizzazione di DDS, quali matrici inerti nei confronti del farmaco che devono trasportare^{2,3,4,5}.

I vantaggi di utilizzare come *carrier* le macromolecole naturali sono dovuti alla loro bassa tossicità, biodegradabilità e maggiore disponibilità rispetto ai polimeri sintetici. Inoltre, poiché presentano un elevato potenziale di accumulo passivo in organi e tessuti tumorali, conosciuto come effetto EPR^{6,7,8,9} (migliorata permeabilità e ritenzione), pur non mostrando specificità ai recettori delle cellule tumorali, i polimeri naturali sono molto utilizzati come matrici per realizzare profarmaci chemioterapici.

La scelta della cellulosa come matrice polimerica è stata guidata dal fatto che è il polimero più abbondante in natura ed i suoi derivati risultano biocompatibili con tessuti e sangue, non tossici¹⁰ ed ottenibili ad un costo relativamente basso.

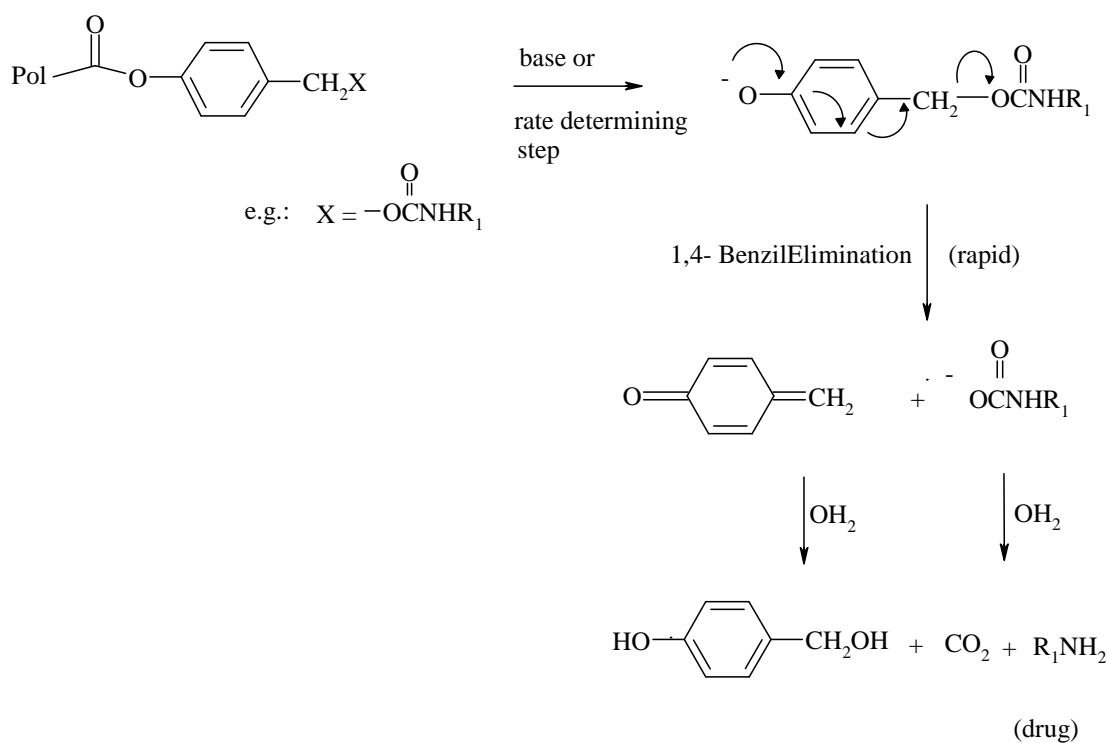
Da ricerca bibliografica risulta che l'etilcellulosa (EC) è spesso utilizzata come matrice per forme di dosaggio a rilascio prolungato¹¹, mentre derivati come metilcellulosa, sodio carbossimetil cellulosa (NaCMC) e idrossipropil metilcellulosa (HPMC) risultano essere polimeri mucoadesivi¹², proprietà interessante nella progettazione di DDS che migliora ed aumenta la biodisponibilità di un farmaco mediante un maggiore contatto fisico e prolungato nel tempo tra la forma farmaceutica e la superficie di assorbimento¹³. Inoltre, derivati della cellulosa con gruppi amminici terziari, idrosolubili, sono stati sperimentati per il rilascio controllato di farmaci a carattere acido e non ionico, utilizzando come mezzo di rilascio succhi gastrici e intestino artificiali¹⁴, mentre la 6-carbossicellulosa è stata utilizzata come *carrier* per realizzare un profarmaco di farmaci amminici¹⁵.

5.1 Profarmaco a base di cellulosa

Nel presente capitolo verranno descritte le reazioni necessarie alla realizzazione di un *carrier* polimerico a base di cellulosa, su cui si può successivamente ancorare un farmaco e studiarne il rilascio.

L'attivazione del farmaco da ancorare al polimero avviene mediante un modello che prevede una 1,4- oppure 1,6- benzil eliminazione¹⁶ di HX. Il gruppo X è un buon gruppo uscente (come un alogenuro, un carbossilato, un anione carbammato, ecc.) e viene eliminato velocemente, in ambiente debolmente basico, dalla porzione benzilica che porta un sostituito fortemente elettrondonatore (gruppo *orto*- o *para*- ossidrile oppure *orto*- o *para* -amminico), formando un chinone metide o un chinonimine metide.

Nello specifico, il polimero e il farmaco sono legati mediante uno spaziatore, un idrossibenzil alcol che, dopo idrolisi enzimatica o chimica del legame con il polimero, libera il farmaco mediante una veloce decomposizione molecolare¹⁷, secondo il seguente schema:

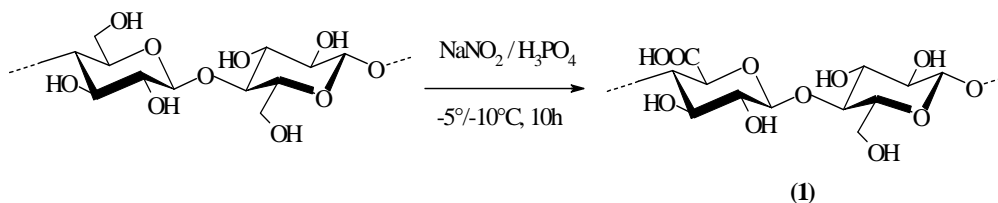


Schema 5.1. Modello 1,4- Benzil Eliminazione.

In letteratura sono riportati studi in vivo che confermano che il residuo chinonico, generato durante la rottura del profarmaco, risulta atossico.

5.1.1 Sintesi della 6-carbossicellulosa (1)

Sulla base di questo modello, la cellulosa è stata inizialmente funzionalizzata mediante reazione di ossidazione dell'OH primario^{18,19}, ottenendo la 6-carbossicellulosa, un derivato biocompatibile e bioassorbibile (schema 5.2):



Schema 5.2. Reazione di ossidazione della cellulosa

L'analisi FT-IR conferma la presenza del gruppo carbossilico nel derivato con il picco a 1734 cm^{-1} , caratteristico dello stretching C=O dell'anione carbossilato.

Il contenuto dei gruppi carbossilici è stato determinato mediante assorbimento di blu di metilene^{20,21}.

5.1.2 Sintesi del coniugato cellulosa- spaziatore benzilico (3)

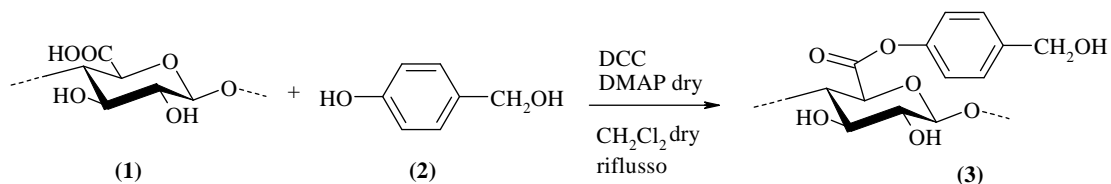
La funzione carbossilica inserita sulla catena della cellulosa è stata sfruttata per realizzare un legame estereo tra il polimero e lo spaziatore.

In ambiente basico, un anione fenolato ha un carattere nucleofilo maggiore rispetto ad un gruppo alcolico primario benzilico. Quindi, considerando come reagente il

4-idrossibenzilalcol (2), la reazione di acilazione con la 6-carbossicellulosa è favorita sul gruppo OH fenolico e permette di ottenere l'estere idrolizzabile secondo il modello BE (schema 5.3). L'uso di un largo eccesso del componente fenolico guida selettivamente la reazione tra l'acido (1) e la porzione fenolica del (2), mentre se si conduce la reazione con quantità equimolare dei reagenti si ottiene una bifunzionalizzazione dei due gruppi OH ed una miscela di entrambi i tipi di esteri.

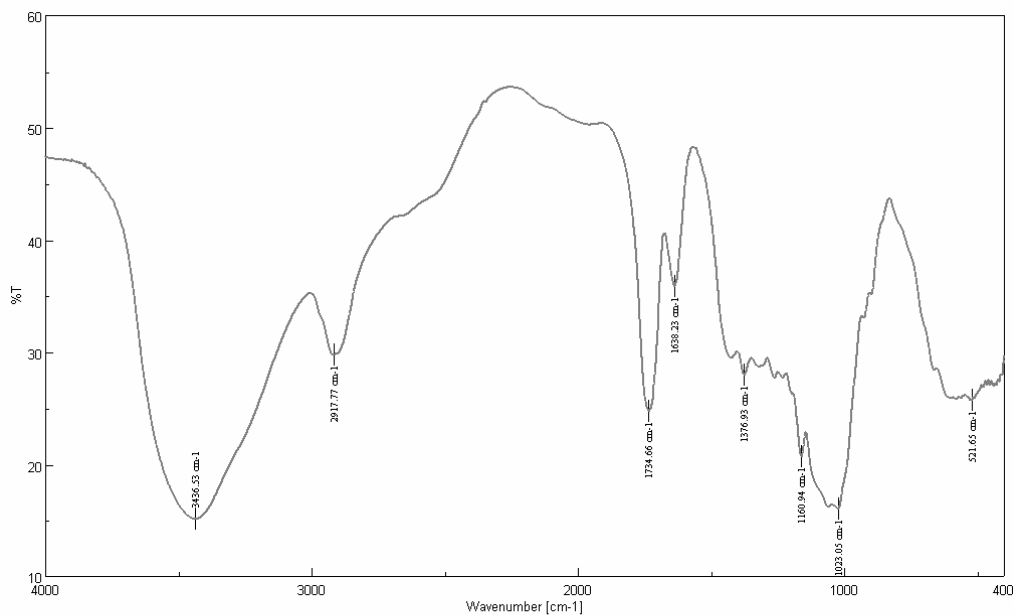
0,50 g di 6-carbossicellulosa (equivalenti a 0,23 mmol/g COOH) è stata posta a reagire con 0,60 g di 4-idrossibenzilalcol, usando un equivalente eccesso dell'agente condensante dicicloesilcarbodiimmide (DCC, 1,00 g), in presenza della base 4-

dimetilaminopiridina (DMAP, 0,59 g), mantenendo il sistema sotto agitazione in 40 ml cloruro di metilene anidro e a riflusso per 24 h:



Schema 5.3. Reazione di esterificazione della 6-carbossicellulosa con 4-idrossibenzilalcol

Il prodotto (3) è stato filtrato e lavato con 3 porzioni da 50 ml di metanolo, per eliminare l'eccesso del reagente (2) e della DCC non reagiti. Il prodotto umido è stato, quindi, essiccato a 50°C sotto vuoto e caratterizzato mediante analisi FT-IR, che conferma la presenza del gruppo estereo con il segnale di stretching a 1734 cm⁻¹, (schema 5.4):



Schema 5.4. Spettro FT-IR del coniugato cellulosa- spaziatore benzilico (3)

Il gruppo OH-benzilico libero sullo spaziatore è un sito reattivo su cui si può facilmente ancorare un farmaco modello mediante legami di vario tipo (etere, estere, carbammato, ecc...).

5.2 Conclusioni

Lo studio del modello della Benzil-Eliminazione (BE) ha permesso di realizzare, in questo lavoro preliminare, un *carrier* a base di cellulosa da utilizzare nella progettazione di profarmaci. In futuro, si possono studiare e progettare sistemi analoghi che abbiano una determinata velocità di idrolisi variando la natura del legame polimero-spaziatore ed usando spaziatori benzilici con maggiore ingombro sterico. Questo approccio offre un grande vantaggio nella sperimentazione e realizzazione di DDS che siano in grado di rilasciare una gran varietà di farmaci tramite una farmacocinetica ottimale.

Bibliografia

- ¹ F. Iemma, U. G. Spizzirri, F. Puoci, R. Muzzalupo, S. Trombino, R. Cassano, S. Leta, N. Picci. pH-Sensitive hydrogels based on bovine serum albumin for oral drug delivery. *Inter. J. of Pharm.* 312 (2006) 1-2, 151-157.
- ² D. Putnam, J. Kopeċek, Polymer conjugates with anticancer activity, *Adv. Polym. Sci.* 122 (1995) 55– 123.
- ³ Y. Takakura, M. Hashida, Macromolecular drug carrier systems in cancer-chemotherapy – macromolecular prodrugs, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 18 (1995) 207–231.
- ⁴ F. Kratz, U. Beyer, M.T. Schutte, Drug– polymer conjugates containing acid-cleavable bonds, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16 (1999) 245– 288.
- ⁵ T. Roth, F. Kratz, C. Steidle, C. Unger, H.H. Fiebig, In vitro and in vivo antitumor efficacy of acid sensitive albumin and poly(ethylene) glycol conjugates of doxorubicin, *Ann. Oncol.* 9 (1998) 102.
- ⁶ H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* 41 (2001) 189–207.
- ⁷ L.W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohmalm, K. Ulbrich, R. Duncan, Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier, *Eur. J. Cancer* 31 (1995) 766– 770.
- ⁸ H. Maeda, J. Fang, T. Inutsuka, Y. Kitamoto, Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications, *Int. Immunopharmacol.* 3 (2003) 319–328.
- ⁹ H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release* 65 (2000) 271– 284.
- ¹⁰ D.A. Alderman, A review of cellulose ethers in hydrophilic matrices for oral controlled-release dosage forms. *Int. J. Pharm. Tech. Prod. Mfr.* 5 (1984) 1–9.
- ¹¹ Yamada T, Onishi H, Machida Y, 2001. In vitro ed in vivo evaluation of sustained release chitosan-coated ketoprofen microparticles. *Yakugaku Zasshi* 121(3) 239-245
- ¹² K.P.R. Chowdary and Y. Srinivasa Rao, 2003. Desing in vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microcapsules of glipizide for oral controlled release : a technical note. *AAPS PharmSciTech* 2003; 4 (3) article 39.

-
- ¹³ Ikeda K., Murata K., Kobayashi M., Koda K. Enhancement of bioavailability of dopamine via nasal route in beagle dogs. *Chem. Pharm. Bull.* 1992; 40 (8), 2155-2158.
- ¹⁴ J. Liesiene, J. Matulioniene. Application of water-soluble diethylaminoethylcellulose in oral drug delivery systems. *Reactive & Functional Polymers* 59 (2004) 185–191
- ¹⁵ Lihua Zhu, Vijay Kumar *, Gilbert S. Banker. Examination of oxidized cellulose as a macromolecular prodrug carrier: preparation and characterization of an oxidized cellulose-phenylpropranolamine conjugate. *Int. J. of Pharm.* 223 (2001) 35–47
- ¹⁶ Wakselman, M. 1,4- And 1,6-Eliminations from Hydroxy and Amino-Substituted Benzyl Systems: Chemical and Biochemical Applications. *Nouv. J. Chem.* 1983, 7, 439-447.
- ¹⁷ Greenwald, Pendri, Conover, Zhao, Choe, Martinez, Shum, Guan. 1999. Drug Delivery Systems employing 1,4- or 1,6-elimination: poly(ethylene glycol) prodrugs of amine-containing compounds. *J. Med. Chem.*, 42, 3657-3667
- ¹⁸ Heinze, Th. , Klemm, D. , Schnabelrauch, M. , Nehls, I. , *Cellulosics: Chemical, Biochemical and Material Aspects.* 1993, 349-355
- ¹⁹ Liebert, T. ; Schnabelrauch, M. ; Klemm, D. ; Erler, U. , *Cellulose*, 1994, 1, 249-258
- ²⁰ Klemm, D.; Philipp, B.; Heinze, T.; Heinze, U.; Wagenknecht W. Experimental Protocols for the Analysis of Cellulose- Appendix to Volume 1. In *Comprehensive Cellulose Chemistry*. Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht W., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 1998; Vol. 1, pp 236.
- ²¹ USP, 1995. Oxidized Regenerated Cellulose. United States Pharmacopeia 23/Formulary18, 319. National.

Capitolo 6

Attività degli antiossidanti

Introduzione

Fisiologicamente dalle normali funzioni metaboliche si producono dei metaboliti di scarto che possono essere, per la loro elevata attività, estremamente dannosi a livello cellulare.

E' stato dimostrato che specie pericolose, quali i radicali liberi, sono alla base di numerose patologie. Una loro limitata e fisiologica produzione è controbilanciata da sistemi altamente specializzati, in grado di bloccare la loro reattività o facilitarne la rimozione. A volte però l'equilibrio persistente fra radicali liberi e "sistemi difensivi" pende a favore dei primi, soprattutto in particolari condizioni come lo stress ossidativo.

La possibilità di introdurre, con fonti esogene, composti antiossidanti può garantire il ripristino del perduto equilibrio prevenendo, così, condizioni di stress ossidativo e le varie patologie ad esso correlate. E' proprio per questo che negli ultimi anni si sta manifestando un interesse sempre maggiore nei confronti di varie classi di antiossidanti come acido ascorbico, tocoferolo, carotenoidi, polifenoli, la cui presenza nell'alimentazione quotidiana fa presumere un ruolo protettivo nei confronti della salute umana. Tali sostanze infatti, oltre a essere dotate di proprietà fotoprotettiva cutanea, sono in grado di contrastare la sovrapproduzione delle specie reattive dell'ossigeno e dei radicali liberi, derivanti dall'eccessiva esposizione a raggi UV, e di ridurre la gravità dei danni da essi indotti.

Nella cute, il fenomeno assume una particolare rilevanza poiché viene accelerato il processo di invecchiamento con gravi alterazioni strutturali, sia a livello estetico che funzionale. L'applicazione topica di antiossidanti sembra rappresentare un'efficace strategia per proteggere la pelle dai danni ossidativi cui è sottoposta.

L'utilizzo di tali sostanze è stato, per diverso tempo, limitato a causa della loro foto- e termo sensibilità. Oggi, fortunatamente, ci si avvale di forme cosmetiche che permettono di veicolare, rilasciare e assicurare la stabilità del principio attivo.

6.1 I radicali liberi

C'è un crescente interesse verso i radicali liberi nella ricerca biomedica, poiché tali molecole, se non efficacemente contrastate dalle difese antiossidanti, sono coinvolte in una serie veramente copiosa di patologie, dalla semplice infiammazione alla diminuita resistenza alle infezioni, all'invecchiamento, all'aterosclerosi, al cancro.

I radicali liberi sono molecole altamente instabili, in quanto possiedono solo un elettrone invece di due (figura 6.1). Questo li porta a ricercare un equilibrio appropriandosi dell'elettrone di altre molecole con le quali vengono in contatto, molecole che divengono instabili e che a loro volta ricercano un elettrone e così via, innescando un meccanismo di reazioni a catena. La velocità e la selettività di queste reazioni dipendono dalla concentrazione del radicale e dal sua stabilità.

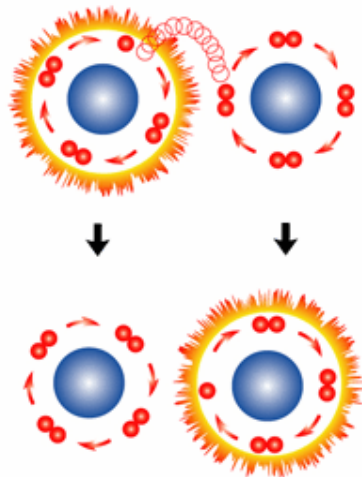


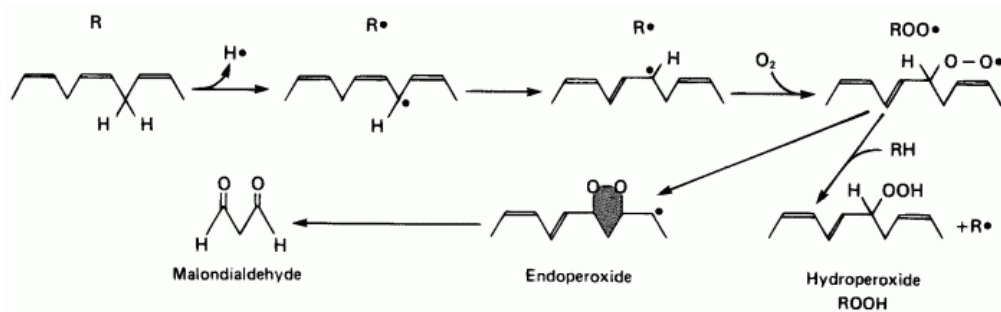
Figura 6.1 Reazione a catena dei radicali liberi

La vita media di un radicale biologicamente attivo è dell'ordine dei microsecondi. In quest'arco di tempo, i radicali liberi reagiscono con le molecole biologiche (proteine, lipidi, DNA) e con le membrane cellulari, danneggiandole¹.

Le reazioni dei radicali liberi possono essere classificate in: interazioni intramolecolari, quando il radicale va incontro a decomposizione o riarrangiamento prima di reagire con altre molecole; interazioni radicale-molecola, quando il radicale interagisce con un sistema insaturo (olefinico o

aromatico); interazioni radicale-radicale, quando il radicale è coinvolto in reazioni di dimerizzazione o di disproporzione².

Una delle reazioni radicaliche di maggiore interesse è quella a danno dei lipidi, o meglio conosciuta come perossidazione lipidica (schema 6.1). Gli acidi grassi poliinsaturi, quali l'acido linoleico, linolenico e arachidonico presenti nei sistemi biologici in forma di esteri con fosfolipidi, trigliceridi e colesterolo, sono maggiormente coinvolti in questo meccanismo ossidativo.



Schema 6.1 Perossidazione lipidica

Nel primo passaggio, un atomo di idrogeno è sottratto dall'acido grasso poliinsaturo per l'azione dei ROS ($X\cdot$) generati nel sistema biologico ad opera di iniziatori radicalici 2,2-azobis(2-ammidinopropano) (AAPH) e *terz*-butilidroperossido (TBOOH), o mediante reazioni catalizzate da metalli di transizione come ad esempio rame e ferro. Nel primo caso, la presenza dell'AAPH o del TBOOH permette una costante produzione di radicali liberi; nel secondo, l'azione dei metalli di transizione prevede un ciclo redox del metallo catalizzatore.

Il radicale alchilico ($R\cdot$) generato reagisce con l'ossigeno molecolare e forma un radicale perossilico ($ROO\cdot$) che può successivamente strappare un idrogeno da un'altra molecola di acido grasso generando l'idroperossido corrispondente ($ROOH$) ed un nuovo radicale alchilico ($R\cdot$). Queste ultime due reazioni a catena rappresentano la fase di propagazione della perossidazione lipidica.

L'idroperossido degrada successivamente in frammenti più piccoli: i radicali alcossilici ($RO\cdot$) e le aldeidi.

L'esposizione delle cellule alle aldeidi può determinare inibizione della crescita, alterazioni delle attività enzimatiche e inibizione della sintesi proteica. Questi effetti sono il risultato delle proprietà altamente nucleofile delle aldeidi capaci di reagire con siti elettrofilici, quali i gruppi amminici e tiolici di enzimi e proteine.

6.2 Radicali liberi di interesse biologico

I radicali liberi di interesse biologico sono prevalentemente derivati reattivi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), che si formano regolarmente come risultato delle normali funzioni degli organi ma che, se prodotti in eccesso o in ambienti inappropriati, possono diventare nocivi. ROS e RNS sono componenti delle cascate trasduzionali dei segnali cellulari coinvolti, in funzioni quali la proliferazione, l'infiammazione e l'adesione³. I radicali liberi sono anche normalmente prodotti dai leucociti e macrofagi che li utilizzano per distruggere gli organismi patogeni durante la fagocitosi.

In qualunque sistema biologico deve essere mantenuto un equilibrio tra la formazione di ROS e RNS e la loro rimozione. Lo spostamento di questo equilibrio verso i radicali liberi induce allo stress ossidativo, causa di numerose manifestazioni patologiche⁴.

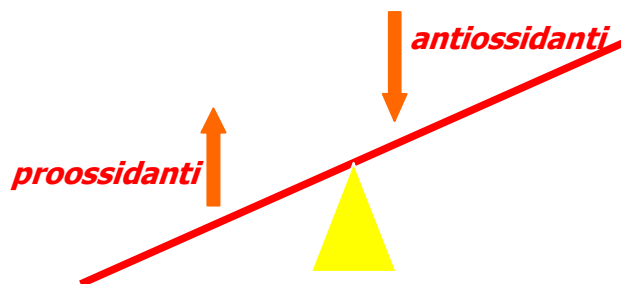
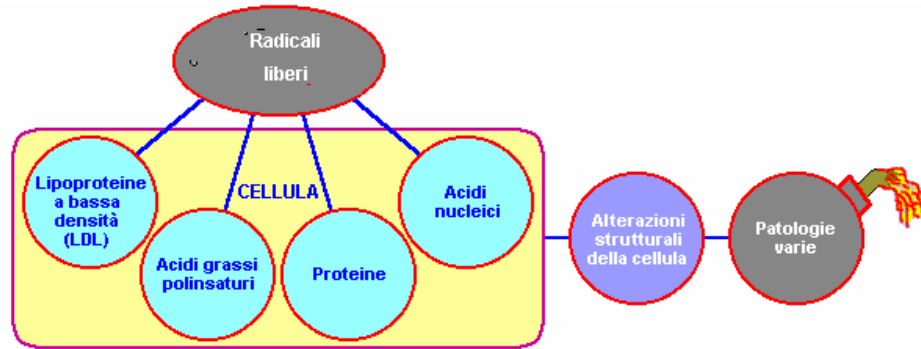


Figura 6.2 Equilibrio tra radicali liberi e antiossidanti

Uno stress ossidativo può determinare l'ossidazione dei lipidi e proteine, con variazione nella loro struttura e nelle loro funzioni, e il danneggiamento del DNA (rottura della doppia elica, modificazione delle basi, formazione di legami crociati tra DNA e proteine) con conseguente sviluppo di tumori. La lista dei disordini e delle patologie in cui sono coinvolti i radicali liberi comprende, oltre al cancro, patologie del cuore e del sistema cardiocircolatorio⁵ (aterosclerosi), patologie

cerebrali⁶ (morbo di Parkinson e Alzheimer), patologie oculari (retinopatie, cataratte), patologie renali (nefrotossicità autoimmuni), patologie del tratto gastrointestinale (pancreatine), problemi infiammatori o autoimmuni (artrite reumatoide), deficienza dei globuli rossi (favismo, malaria, anemie).



Schema 6.2 Azione dei radicali liberi sulla cellula

La tabella 6.1 riporta i ROS e gli RNS più comuni con le loro caratteristiche principali.

Specie	Formula	Caratteristiche
Perossido di idrogeno	H_2O_2	Reattività selettiva
Acido ipocloroso	$HOCl$	Si forma nei neutrofilo presenti nei siti di una infiammazione
Ozono	O_3	Determina riduzione degli antiossidanti plasmatici Vitamina D, Vitamina E ed acido urico
Ossigeno singoletto	1O_2	Potente agente ossidante
Superossido	$^{\cdot}O_2^-$	Reattività selettiva
Idrossile	$^{\cdot}OH$	Reattività estremamente elevata
Perossile, Alcosile	ROO^{\cdot}, RO^{\cdot}	Intermedi durante lo stadio di propagazione della perossidazione lipidica
Monossido d' azoto	NO^{\cdot}	Viene formato a partire dalla L-arginina ad opera della nitrossido sintasi (NOS)
Diossido d'azoto	NO_2^{\cdot}	Si forma quando l' NO^{\cdot} reagisce con l' O_2 . Si trova nell'aria inquinata e nel fumo di sigaretta
Perossinitrito	$ONOO^{\cdot}$	Ossida i gruppi SH delle proteine

Tabella 6.1: ROS e RNS di natura neutra

6.3 Gli antiossidanti

Per antiossidante si intende una sostanza che, se presente in basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ne inibisce significativamente o ne previene l'ossidazione. Con il termine substrato ossidabile si intendono tutte le sostanze presenti nei tessuti viventi e nei cibi, ovvero lipidi, proteine, carboidrati e DNA⁷.

Gli antiossidanti sono ampiamente utilizzati nelle industrie; oltre a essere utilizzati come additivi per cosmetici, bevande e cibi con elevato contenuto di grassi, negli ultimi anni si è largamente sviluppato l'utilizzo di tali sostanze in campo medico e farmaceutico.

Negli organismi viventi esiste una grande varietà di antiossidanti la cui importanza dipende dal tipo di ROS e RNS generato, dal luogo, dal modo in cui è prodotto e dall'effetto misurato. Ad esempio, se si testa la capacità di inibire la perossidazione lipidica indotta dagli ioni ferro nel plasma umano, gli agenti protettivi più importanti sono la ceruloplasmina e la transferrina; quando il plasma umano, invece, è esposto al diossido di azoto, il ruolo principale è svolto dall'acido urico. A parità di stress ossidativo, si possono ottenere risultati differenti in base all'effetto misurato. Per esempio, l'acido ascorbico blocca la perossidazione lipidica dovuta al fumo di sigarette, ma non ha effetto sul danno che il fumo provoca sulle proteine plasmatiche⁸. Quindi, è possibile che un antiossidante abbia effetti protettivi in un sistema e dannosi in un altro: ad esempio, l'idrossianisolo metilato è un potente inibitore della perossidazione lipidica che però, se assunto a elevate dosi con l'alimentazione, può determinare cancro allo stomaco per danneggiamento del DNA.

6.4 Classificazione degli antiossidanti

Non esiste una vera classificazione degli antiradicalici, ma, ai fini esemplificativi, si possono suddividere in tre categorie:

Antiossidanti di sistema, comprendono molti oligoelementi tra cui lo zinco, il selenio, il rame e il molibdeno, che fanno parte dei sistemi enzimatici del nostro organismo (superossido dismutasi e glutazione perossidasi);

Antiossidanti di membrana, rappresentanti tipici di questa categoria sono le vitamine liposolubili A ed E. La loro azione antiossidante è attuata soprattutto nelle membrane cellulari ed intracellulari, dove difendono in modo particolare le lipoproteine sulle quali si fissano per la loro natura lipofila;

Antiossidanti di circolo, ne fanno parte la vitamina C, il coenzima Q10, i bioflavonoidi. Queste sostanze sono idrosolubili e ubiquitarie ed intercettano i radicali che sono in circolo fungendo da *scavenger* (che cattura i “rifiuti”).

I meccanismi d’azione dei vari antiossidanti possono differire in composizione, proprietà chimico-fisiche, meccanismo e sito d’azione. I principali meccanismi d’azione sono riportati nella tabella 6.2

Meccanismo d’azione	Descrizione
Inibizione della produzione di radicali liberi	Agenti che formano con i metalli di transizione complessi senza attività redox
	Agenti che formano complessi con attività redox ma che sono essi stessi bersaglio dei radicali liberi prodotti
	Agenti che riducono la concentrazione di idroperossidi
Blocco o stabilizzazione dei radicali liberi	Radicali liberi relativamente stabili
	Agenti riducenti
	Stabilizzanti di radicali liberi
Regolazione dell’espressione genica	
Meccanismo misto	

Tabella 6.2: Meccanismo d’azione degli antiossidanti

6.4.1 Agenti chelanti

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

cataliticamente attivi si riduce e viene inibita la formazione di radicali liberi: è il caso dei complessi Cu(I)-EDTA e Fe(III)-acido lipoico o ferulico⁹.

Una seconda possibilità prevede la formazione di un complesso metallo-antiossidante, che non inibisce l'ossidazione del metallo.

I radicali liberi prodotti interagiscono esclusivamente con il complessante come nel caso della complessazione del rame da parte dell'albumina plasmatica che genera radicali idrossilici. Tali radicali danneggiano esclusivamente l'albumina, preservando le lipoproteine plasmatiche e le membrane dei globuli rossi e delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni¹⁰.

Tra i vari complessati, vestono un ruolo primario a livello biologico quei composti capaci di complessare il ferro. Tra questi particolare importanza rivestono la deferoxamina (DFO), idrossammati, catecoli, idrossipirimidoni, amminocarbossilati e idrossicarbossilati.

La loro efficienza antiossidante, come avviene in generale per tutti gli agenti chelanti, dipende dalla stabilità del complesso che essi formano con il metallo. Il catione Fe^{3+} , grazie alla sua elevata densità di carica, può essere classificato come una specie hard (teoria di Lewis¹¹) e forma legami molto stabili con ligandi hard, come ad esempio sistemi contenenti atomi di ossigeno. Al contrario, il catione Fe^{2+} , che ha una densità di carica inferiore, preferisce chelanti contenenti atomi soft come gli atomi di azoto.

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

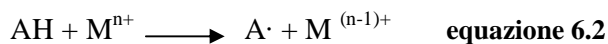
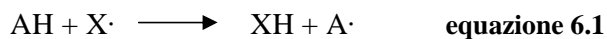
6.4.2 Radicali liberi relativamente stabili

Nel valutare gli effetti di radicali liberi stabili sulla cinetica di ossidazione è stato possibile rilevare che, in condizione di stress ossidativo moderato e in particolare in presenza di metalli di transizione ionizzati, questi radicali possono indurre ossidazione in seguito all'interazione con gli acidi grassi poliinsaturi, mentre in condizioni di stress ossidativi elevato possono bloccare i radicali liberi attivi ($RO\cdot$ o $ROO\cdot$) formando un prodotto non radicalico (NRP)¹².

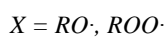
Un importante membro di questa sottoclasse di antiossidanti è il nitrossido ($NO\cdot$), un regolatore delle patologie vascolari, il cui effetto antiossidante è la probabile causa dell'inibizione dei processi aterosclerotici. Il radicale nitrossido ha un comportamento analogo a quello di altri radicali liberi relativamente stabili, ma presenta la capacità di formare, in condizioni di stress ossidativi estremamente elevato, il perossinitrito ($ONOO\cdot$) che reagisce con gli acidi grassi poliinsaturi formando idroperossidi.

6.4.3 Agenti riducenti

Molti degli antiossidanti di origine naturali, ad esempio le vitamine C ed E, sono agenti riducenti¹³. Questi antiossidanti naturali (AH) possono interagire con radicali liberi ($X\cdot$), formando altre specie radicaliche stabili ($A\cdot$) (equazione 6.1), o con metalli di transizione provocandone la riduzione (equazione 6.2):

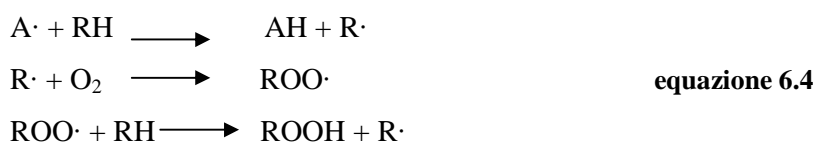


In condizioni di stress ossidativo elevato, quando gli acidi grassi sono esposti ad un flusso elevato di radicali liberi, il radicale risultante ($A\cdot$) può reagire con un radicale libero lipidico bloccandolo (equazione 6.3)



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

Contrariamente, in condizioni di stress ossidativo moderato, il radicale libero (A·) può indurre una reazione a catena (equazione 6.4) fungendo da pro-ossidante:



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

6.4.4 Stabilizzanti di radicali liberi

Uno stabilizzante di radicali liberi¹⁴ (IH) può reagire con radicale libero (X·) formando con esso un radicale stabile (HIX·) che, decomponendosi spontaneamente, forma radicali (X·) oppure (I·).

In condizioni di stress ossidativo estremamente elevato, il radicale (HIX·) può reagire con un secondo radicale (X·) con formazioni di specie non radicaliche (NRP).

Un effetto antiossidante è stato osservato nell'estradiolo¹⁵ che, in presenza di un antiossidante di origine naturale, quale il tocoferolo, manifesta potere antiossidante a concentrazioni nanomolari. Questo comportamento non può essere spiegato esclusivamente con la chelazione dei metalli di transizione da parte dell'estradiolo, ma con una possibile azione sinergica dell'estradiolo e del tocoferolo nel prevenire la perossidazione.

6.5 Antiossidanti naturali

Come già detto, gli agenti antiossidanti riportano l'equilibrio chimico nei radicali liberi grazie alla possibilità di fornire loro gli elettroni di cui sono privi.

L'organismo umano si difende naturalmente dai radicali liberi producendo degli antiossidanti endogeni come la superossido dismutasi, la catalasi e il glutathione. Superata una certa soglia però, per fronteggiare un'eventuale ossidazione dei sistemi biologici, è necessario un apporto esterno di antiossidanti.

I principali antiossidanti naturali sono:

Pigmenti vegetali, quali polifenoli e bioflavonoidi;

Vitamine, come vitamina E, vitamina C e betacaroteni (provitamina A);

Micronutrienti ed enzimi, tra cui selenio, rame, zinco, glutathione, coenzima Q10, melatonina, acido urico, ecc..

Gli agenti antiossidanti possono agire singolarmente o in sinergia, proteggendosi a vicenda nel momento in cui vengono ossidati.

Va tenuto presente che ciascun antiossidante ha un campo di azione limitato ad uno o due specifici radicali liberi. Pertanto solo un'alimentazione completa ed equilibrata può garantire un'efficace azione antiossidativa.

Per garantirsi un sufficiente apporto giornaliero di antiossidanti, gli esperti consigliano un'alimentazione equilibrata ed un consumo giornaliero di almeno 5-6 etti di frutta e verdura fresche e di stagione (due etti di frutta e tre di verdura).

6.5.1 Polifenoli

Sono pigmenti vegetali presenti in natura (coloranti naturali). Tra questi ricordiamo la quercetina, l'epicatechina, i flavonoidi (colore chiaro dall'avorio al giallo), le anticianidine, le antocianine (colore rosso), ecc.

Esercitano una particolare azione protettiva dalle lipoproteine a bassa densità L.D.L. (colesterolo che si accumula nelle arterie), che hanno un ruolo nella distribuzione cellulare dei grassi e della colesterina.

I polifenoli hanno proprietà antinfiammatorie, antiallergiche e antivirali. Proteggono particolarmente dalla cardiopatia ischemica (malattie delle coronarie, infarto) e dai tumori in genere.

Per quanto riguarda le fonti naturali, tali pigmenti sono particolarmente presenti nella frutta e verdura colorata (verde scuro, giallo, viola, rosso, arancione, ecc.) e prodotti naturali da essi derivati:

- cavolo, carota, zucca, fiori di zucca, spinaci, peperoni, porri, indivia, lattuga, ecc.;
- mirtilli, more selvatiche, lamponi, ciliege, prugne, albicocche, meloni, mele, cachi, aranci, uva nera e i frutti in genere;
- fiori, il polline e derivati (es. propoli delle api).

Particolarmente presenti nei mirtilli sono le antocianine, antiossidanti che preservano anche l'integrità dei capillari e proteggono la retina.

L'uva nera è ricca anche di resveratrol, principio attivo dotato di azione preventiva sui tumori, azione svolta anche dal vino rosso, mentre le foglie del tè sono ricchissime di flavonoidi.

6.5.2 Vitamina C (acido ascorbico)

E' la vitamina idrosolubile con maggiore attività antiossidante. Resiste bene alla luce ed agli acidi, mentre è scarsamente resistente al calore, alcali, tabacco, antistaminici, barbiturici, contraccettivi, aspirina, corticosteroidi.

Svolge molteplici funzioni biologiche, come il ripristino della vitamina E dai radicali tocoferolo e tocoferossili, prodotti durante la perossidazione dei grassi cellulari. Stimola il metabolismo cellulare, agisce come catalizzatore nella respirazione cellulare ed è essenziale per la formazione del collagene (cemento intercellulare del tessuto connettivo), fondamentale per mantenere elastici i tessuti cartilaginei, vasi sanguigni, ossa e denti. Collabora alla formazione del sangue ed alla integrità dei vasi capillari. Disciplina il ricambio del ferro e ne esalta l'assorbimento; agisce nel ricambio del calcio, magnesio e zinco.

Accresce la resistenza alle malattie infettive e contribuisce al recupero da stanchezza fisica; inoltre combatte anche le nitrosammine (formate dai nitriti e nitrati contenuti in alcuni alimenti industriali).

Non viene accumulata dall'organismo, pertanto la colazione e i due pasti principali dovrebbero garantirne l'apporto giornaliero costante.

In una dieta carente di vitamina C, si avvertono sintomi come perdita di sangue dalle gengive, fragilità dei capillari, dolori articolari, perdita di appetito e debolezza generale.

Un eccesso di vitamina C può indurre diarrea, aumento della diuresi, alterazione nell'equilibrio dei minerali e calcolosi renale.

La necessità giornaliera dell'adulto è di circa 60 mg.

Le principali fonti naturali di vitamina C sono:

- peperoncino rosso piccante, prezzemolo, peperoni verdi, radicchio, spinaci, cetrioli, piselli, rape, patate, cavoli, asparagi, cipolle, carote, cavolfiori, zucche, pomodori, vegetali rosso-arancio in genere;
- arance, mandarini, limoni, cedri, pompelmi, ribes, mirtilli, lamponi, fragole, banane e frutta acidula in genere.

6.5.3 Vitamina E (tocoferolo)

E' la principale, tra le vitamine liposolubili, a mostrare un'elevata attività antiossidante. Le caratteristiche di questa vitamina sono la scarsa resistenza alla luce (fotosensibilità), al calore (termosensibilità), agli acidi ed agli alcali, ai contraccettivi.

Le sue funzioni biologiche si evidenziano nel contrastare, in sinergia con il glutatione, la perossidazione degli acidi grassi a livello cellulare. In questa azione produce radicali tocoferolo e tocoferossili che vengono neutralizzati dalla vitamina C e che vengono successivamente utilizzati per la rigenerazione della vitamina E.

Interviene nello sviluppo della muscolatura e del tessuto connettivo. Viene definita anche vitamina antisterilità, in quanto agisce sulla secrezione degli ormoni sessuali maschili e femminili. Contribuisce alla formazione e salute dei globuli rossi. In sinergia con la vitamina C, protegge la cute dall'azione dei raggi solari UVA e UVB.

La carenza rende fragili i globuli rossi del sangue e procura sintomi di debolezza muscolare, difficoltà di concentrazione e apatia.

Non è tossica ma se assunta in eccesso può determinare nausea, vomito, diarrea.

Inoltre interferisce con l'assorbimento intestinale delle vitamine A, D e K.

La necessità giornaliera dell'adulto è in relazione soprattutto all'assunzione di acidi grassi polinsaturi. Normalmente ne occorrono circa 10 mg.

Le principali fonti naturali sono:

- carne, latte e derivati, burro, tuorlo d'uovo;
- olio di germi di grano, arachidi, olio di oliva, di germi di mais, di girasole e di lino, riso e pane integrali;
- olive, noci, nocciole, frutti oleosi, foglie verdi, lattuga, insalata, piselli.

6.5.4 Betacaroteni e Vitamina A (retinolo)

I precursori della vitamina A sono i carotenoidi (betacarotene, licopene, luteina, ecc.), un gruppo di pigmenti di colore rosso, arancio e giallo presenti nel mondo vegetale (frutta e verdura), ed il retinolo che si trova nelle carni degli animali erbivori. E' proprio a livello epatico che avviene, per opera dell'enzima carotenasi, la scissione del betacarotene in due molecole di vitamina A.

Il betacarotene è il pigmento colorato della frutta e della verdura che agisce sulle piante per difenderle dai raggi solari (la stessa azione svolta dalla melanina sulla cute umana).

Il massimo della presenza del betacarotene corrisponde con il massimo della maturazione del vegetale. Indipendentemente dal colore, più il vegetale è scuro tanto più pigmenti contiene, quindi più antiossidanti.

I carotenoidi, in sinergia con la vitamina E ed il selenio, prevengono la perossidazione lipidica delle membrane cellulari inibendo i radicali perossili.

La vitamina A è liposolubile e non resiste agli ossidanti, agli acidi e alla luce. Resiste relativamente alle sostanze alcaline ed al calore. Viene distrutta dall'alcool, dagli antiacidi, anticoagulanti e barbiturici.

Assume diverse funzioni biologiche, promovendo la nutrizione e la resistenza della cute e delle membrane mucose, specialmente degli occhi, intestino e polmoni. Contribuisce alla sintesi delle proteine, all'accrescimento di nuove cellule, alla formazione dei pigmenti visivi e all'aumento della resistenza alle infezioni. Impedisce l'ossidazione della vitamina C e agisce in sinergia con le vitamine del complesso B, con la vitamina E, con il calcio ed il fosforo.

L'utilizzo ottimale della vitamina A richiede la presenza dell' α -tocoferolo e dello zinco.

Una dieta carente in vitamina A comporta difficoltà visive crepuscolari, secchezza e ruvidità della pelle, perdita di appetito, scarsa resistenza alle infezioni.

Diete invece ricche di vitamina A, causano un accumulo epatico della stessa che risulta tossico (oltre 10 volte i livelli raccomandati). Può, infatti, comportare vomito, diarrea, vertigini, debolezza, dimagrimento, ipercalcemia, ingrossamento del fegato e della milza, ipertensione endocranica.

La necessità giornaliera dell'adulto è di circa 1 mg.

Alimenti ricchi di vitamina A sono:

- olio di fegato di merluzzo e di ipoglosso, fegato di vitello, tuorlo d'uovo, latte, burro, formaggi grassi, panna;
- carote, broccoli, spinaci, finocchi, bietole, prezzemolo, radicchio, cavolo, verza, insalata verde, mais, piselli, fagioli, pomodori, lattuga, zucca;
- banane, albicocche, pesche, arance, mango, vegetali giallo-arancio in genere.

6.5.5 Selenio

È un minerale-traccia, attivo sotto forma di seleniocisteina. Invece, la sua presenza come seleniometionina diventa disponibile solo se gli alimenti ingeriti contengono metionina. L'assorbimento del selenio avviene nell'intestino tenue.

Svolge molteplici funzioni biologiche come la prevenzione della perossidazione lipidica delle membrane cellulari, particolarmente se associato alla vitamina E. Contribuisce a rafforzare il sistema immunitario, previene le malattie cardiocircolatorie, protegge la cute, gli occhi e i capelli, diminuisce i rischi di insorgenza del cancro, soprattutto al colon, intestino, polmone e prostata.

I muscoli e il fegato provvedono a rifornire di selenio il cervello e le ghiandole endocrine (ipofisi, tiroide e ghiandole sessuali) che lo utilizzano per svolgere le loro funzioni.

Viene eliminato quasi totalmente attraverso le urine e le feci e, una parte minore, con il sudore e la saliva.

Se carente può comportare cardiopatie, debolezza muscolare, alterazione dei pigmenti dei capelli e della cute, danni al pancreas.

L'eccesso è tossico e può determinare dolori all'addome, diarrea, nausea, irritabilità, stanchezza, dermatiti, alopecia. Un segnale di eccesso di selenio si evidenzia con un caratteristico odore di aglio nel sudore e nell'aria espirata.

Il fabbisogno giornaliero nell'adulto è di circa 55 mcg.

E' presente in concentrazioni elevate in diversi alimenti:

- frattaglie, pesci, molluschi, carni, latte e derivati;
- lievito di birra, germe di grano, pasta (specialmente se di grano duro), riso;
- funghi, noci, aglio, frutta e verdure in genere.

6.5.6 Rame

E' uno tra i tanti minerali essenziali che nell'organismo umano svolge molteplici funzioni biologiche, tra le quali l'intervento nell'azione dell'enzima superossido dismutasi che trasforma i radicali liberi in perossido di idrogeno (acqua ossigenata). È presente nella sintesi dei fosfolipidi, nella produzione dell'acido ribonucleico (RNA), nell'utilizzazione della vitamina C e della tirosina. Favorisce l'accrescimento osseo e lo sviluppo del sistema nervoso.

È richiesto nel sangue ai globuli rossi per la sintesi del ferro, indispensabile al trasporto dell'emoglobina. È necessario per tenere uniti collagene ed elastina, per la produzione di melanina e per il metabolismo energetico.

La capacità di assorbimento del rame viene ridotta dalla presenza di zinco.

La carenza di rame provoca sintomi simili a quelli da carenza di ferro, dei quali il più evidente è l'anemia.

Un eccesso produce irregolarità nelle mestruazioni, perdita di capelli, insonnia ed, inoltre, abbassa la quota di zinco presente.

Il fabbisogno giornaliero nell'adulto è di circa 2-3 mg.

Può essere assunto dall'organismo attraverso l'assunzione di:

- carne in genere;
- noci, cereali e pane integrale, legumi.

6.5.7 Zinco

Minerale presente nei muscoli e nel fegato, è parte integrante delle ossa e dei denti. Anche esso svolge diverse importanti funzioni biologiche che rendono

possibile l'azione di moltissimi enzimi. Insieme al rame potenzia l'azione dell'enzima superossido dismutasi, che trasforma i radicali liberi in perossido di idrogeno (acqua ossigenata). Interviene nella formazione delle proteine, in alcune funzioni ormonali e del sistema nervoso, nei processi di accrescimento e di riparazione dei danni ai tessuti e nella difesa immunitaria. La sua presenza si rende indispensabile per l'ottimale metabolismo del fosforo, per la digestione dei carboidrati, per la sintesi dell'acido nucleico e per l'assorbimento delle vitamine. Dipende dallo zinco anche la formazione dello sperma maschile e dell'ovulo femminile. Favorisce la formazione dell'insulina.

La mancanza di questo minerale porta a disturbi anche seri a livello metabolico. Possono provocare una carenza di zinco i farmaci anti- MAO, i corticosteroidi, i diuretici ed altri. L'eccesso di alcol può determinare una carenza di zinco in quanto questo minerale fa parte dell'enzima indispensabile per scomporlo.

L'inalazione o ingestione di cadmio, come avviene per i fumatori, non permette un'ottimale utilizzazione dello zinco.

Alcuni alimenti e minerali presenti nella dieta come i cereali crudi, le fibre, la caseina del latte, il ferro, il calcio e il rame, riducono la quantità di zinco assorbita a livello intestinale.

Un eccesso di zinco può impedire l'assorbimento del ferro e del rame.

Il fabbisogno giornaliero nell'adulto è di circa 55 mg.

Ne sono ricchi i cibi ad alto contenuto proteico in genere:

- carni, uova, formaggi magri, olio di pesce, molluschi;
- germe di grano, cereali integrali, legumi, semi in genere;
- noci, nocciole e frutti con guscio in genere.

6.5.8 Glutatione

E' una proteina prodotta nel fegato ed è composta da tre aminoacidi (tripeptide): cisteina, acido glutammico e glicina.

Svolge numerose funzioni biologiche come la formazione, con il selenio, del glutatione perossidasi, un enzima con azione antiossidante all'interno delle membrane cellulari. Impedisce ai radicali liberi di legarsi alle proteine fibrose, salvaguardando così l'elasticità del collagene con benefici per la pelle e per le

arterie. Specialmente a livello polmonare interviene nel sistema immunitario e contribuisce all'utilizzo ottimale degli aminoacidi cisteina e cistina. Migliora l'utilizzo e la biodisponibilità del ferro ingerito con gli alimenti. Aiuta l'organismo a liberarsi dai metalli tossici come il mercurio, piombo, cadmio. Tampona gli effetti tossici dell'alcool, degli additivi e sostanze chimiche ingerite o inalate come i nitriti, nitrati, anilina, derivati dal toluolo e dal benzolo, ecc. Inoltre tampona dagli effetti tossici dovuti a radiazioni e chemioterapici.

6.5.9 Coenzima Q10

E' una sostanza simile per struttura alla vitamina E, appartenente al gruppo degli ubiquinoni. Viene sintetizzato dal nostro organismo ma la sua produzione diminuisce andando avanti con gli anni.

Ha un'azione antiossidante superiore a quelle della vitamina E. Infatti, oltre alle sue riconosciute proprietà di tonico cardiaco e attivatore del metabolismo cellulare, il coenzima Q evidenzia una spiccata attività antiossidante in quanto, nei mitocondri cellulari, partecipa alla produzione di energia trasportando l'idrogeno nelle catene di ossidoriduzione. Inoltre, ha effetti benefici sul sistema cardiocircolatorio.

Il fabbisogno giornaliero per l'adulto è di circa 5 mg, superiore quando si oltrepassano i 35-40 anni.

Le fonti naturali sono:

- carne, pesce;
- cereali, soia, noci, vegetali in genere.

6.5.10 Melatonina

E' l'ormone secreto dalla ghiandola pineale (epifisi) posta al centro del cervello. È il risultato di complesse reazioni biochimiche che vedono come elementi di partenza il triptofano (aminoacido) e la serotonina (neurotrasmettitore).

La formazione di melatonina avviene anche nella retina, nell'intestino tenue, nelle piastrine del sangue, ecc.

La produzione di melatonina varia quantitativamente nell'arco delle 24 ore. Il picco massimo viene raggiunto di notte, tra l'una e le cinque (nella terza e quarta

fase REM del sonno profondo). Questo permette un sonno ristoratore in grado anche di migliorare la capacità di autoriparazione e autorigenerazione delle cellule.

Intorno ai 40-45 anni diminuisce la sua secrezione.

Le sue principali funzioni biologiche, oltre a regolare i cicli di sonno-veglia, sono quelle di protezione del DNA cellulare dall'attacco dei radicali liberi e di stimolo del sistema immunitario. Contribuisce alla rigenerazione dei tessuti connettivi e alla protezione del sistema cardiocircolatorio. Regola il tono dell'umore, migliora la capacità di affrontare lo stress e gli stati patologici in quanto rafforza l'effetto delle endorfine e abbassa il livello di aldosterone e cortisolo (detti "ormoni dello stress").

La sua azione antiossidante è particolarmente efficace, in quanto agisce su diverse tipologie di radicali liberi, con una potenza valutata del doppio rispetto alla vitamina E, e di ben cinque volte rispetto al glutatione.

L'integrazione di melatonina può essere utile per chi soffre di insonnia (0,3-0,5 mg.) e chi, cambiando fuso orario, deve recuperare il giusto ciclo biologico sonno-veglia e la forma fisica (sindrome del jet-lag). Inoltre, per chi necessita di un'azione normalizzante dell'umore negli stati di ansia e di depressione.

Non è tossica e non dà assuefazione, ma può dare sintomi di sonnolenza e pesantezza del capo.

Le fonti naturali sono:

- riso, avena, mais;
- pomodori, rapanelli, prezzemolo, zenzero;
- latte bovino appena munto;
- cibi contenenti il triptofano in genere.

Bibliografia

- ¹ Cadoan, J. I. G.; Principles of Free Radical Chemistry; London: *The Chemical Society*, 1973
- ² Perkins, M.; *Radical Chemistry*; London: Ellis Horwood; 1994.
- ³ Aruoma, O.I.; *Free Radical Biology and Medicine*; 1996;20; 675-705
- ⁴ Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; *Methods in Enzymology*; 1990; 186; 1-85.
- ⁵ Steinbrecher U.P.; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1999; 1436; 279-298.
- ⁶ Halliwell, B.; *J. Neurochem.*; 1992; 52; 1609-1623.
- ⁷ Halliwell, B.; *Free Radical Research Communications*; 1990, 9; 1-32.
- ⁸ Frei, B.; Forte, T. M.; Ames, B. N.; Cross, C. E.; *Biochemical Journal*; 1991; 247; 133-138.
- ⁹ Liu ; Z. D. ; Hider ; C. ; *Coordination Chemistry reviews*; 2002 ; 232 ; 151-171.
- ¹⁰ Halliwell; B.; *Biochemical Pharmacology*; 1985; 37; 569-571.
- ¹¹ Pearson, R. G.; *J. Am. Soc.*; 1963; 85; 3535.
- ¹² Pinchuk, I.; Lichtenberg, D.; *Progress in Lipid Research*; 2002; 41; 279-314.
- ¹³ Kontush, A.; Meyer, S.; Finckh, B.; Kohlschutter, A.; Beisiegel, U.; *J. of Biol. Chem.*; 1996; 271; 11106-11112.
- ¹⁴ Saadan, B.; Le tutour, B.; Quemeneur, F. ; *New J. Chem.* ; 1998 ;22 ; 801-807.
- ¹⁵ Huang, M ; Li, J. P ; Teoh, H.; Man, R. Y. K.; *Free Radical Biology and Medicine*; 1999; 27; 438-441.

Capitolo 7

Sintesi e caratterizzazione di derivati cellulosici con attività antiossidante

Introduzione

Come già discusso, i radicali liberi sono specie reattive generate dagli organismi viventi in molti processi metabolici e in grande quantità durante malattie croniche o acute. Queste molecole hanno un ruolo importante nel sistema immunitario perché agiscono da molecole “segnale” sbilanciando un equilibrio nella regolazione di processi cellulari. Per tale motivo, è importante mantenere nei sistemi biologici un equilibrio tra la formazione e la rimozione di queste molecole. Eccessive quantità di radicali liberi possono causare la distruzione e la morte della cellula, mediante reazioni con componenti cellulari quali membrane lipidiche, acidi nucleici e proteine, cause di malattie come arterosclerosi¹, infiammazione², carcinogenesi³, artrite reumatoide⁴, cataratta⁵, asma⁶, morbo di Parkinson^{7,8,9}, e diabete¹⁰.

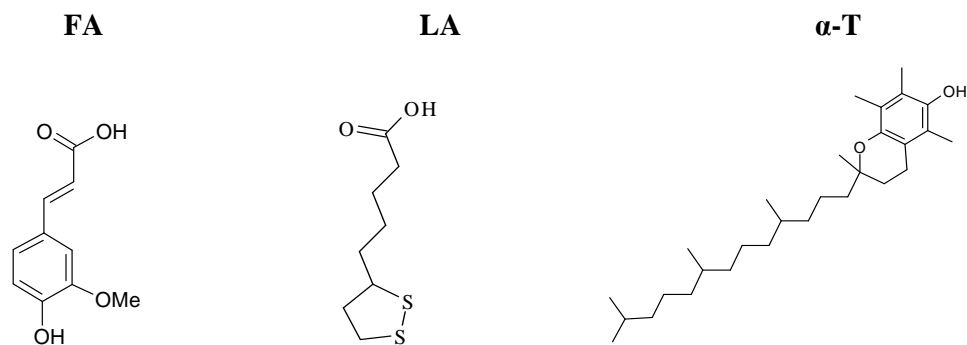
Gli antiossidanti sono composti capaci di proteggere il corpo umano dai derivati reattivi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) normalmente generati durante le normali funzioni degli organi o come risultato un eccessivo stress ossidativo. Il sistema antiossidante naturale degli organismi viventi necessita di un continuo mantenimento perché proprio gli antiossidanti sono il bersaglio principale dei radicali liberi. Quando l'equilibrio tra la produzione di radicali liberi e antiossidanti naturali pende a favore dei primi, è necessario ricorrere all'uso terapeutico di antiossidanti. In virtù di questo, negli ultimi anni la ricerca si è orientata verso lo studio e l'applicazione di antiossidanti in campo medico^{11,12,13,14}. Ci sono molti studi sul ruolo fisiologico di molecole antiossidanti come α -tocoferolo (vitamina E)¹⁵, acido trans-ferulico¹⁶, acido ascorbico¹⁷, acido α -lipoico, proteine come la glutatione perossidasi¹⁸, l'acido mio-inositolo esafofosforico^{19,20,21,22} e i suoi derivati^{23,24}.

L'uso terapeutico degli antiossidanti convenzionali come complemento al sistema antiossidante naturale, può essere condizionato da diversi fattori quali una farmacocinetica sfavorevole, un breve tempo d'azione dovuto ad una veloce metabolizzazione e un eccessivo assorbimento che produce effetti tossici.

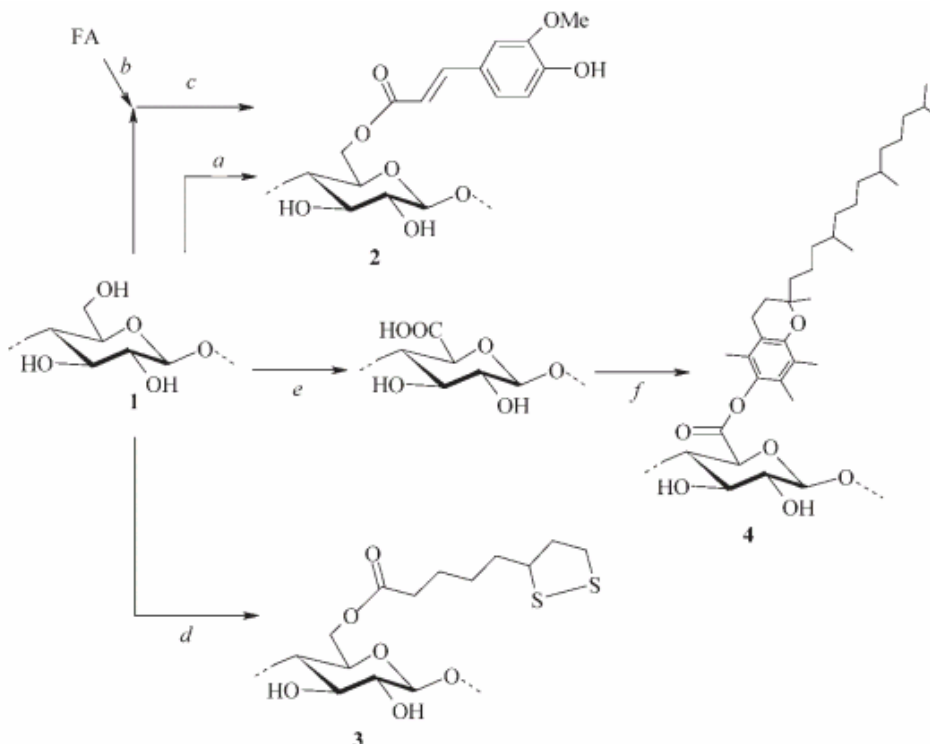
Legando la molecola antiossidante ad una matrice polimerica mediante un legame covalente, si realizza un sistema che migliora il trasporto e la stabilità metabolica dell'antiossidante, ne riduce la velocità di degradazione assicurando una persistenza maggiore rispetto alla molecola antiossidante libera^{25,26,27,28,29}. Inoltre, questi sistemi ad elevato peso molecolare non sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e danneggiare così le membrane cellulari^{30,31}.

Questi sistemi potrebbero essere impiegati in campo biomedico, per esempio nella preparazione di membrane per emodialisi, generalmente, sono costituite da cellulosa o suoi derivati. Infatti, nei pazienti emodializzati molti problemi derivano dallo stress ossidativo risultante da uno squilibrio tra la produzione di ROS e meccanismi di difesa antiossidante.

Recentemente sono state sviluppate nuove membrane per dialisi rivestite di vitamina E^{32,33}, che presentano delle limitazioni dovute al fatto che l'antiossidante non è legato. Per ridurre questi inconvenienti, noi stiamo studiando gli effetti del trattamento della emodialisi utilizzando membrane su cui sono legate molecole antiossidanti, quali vitamina E (α -T), acido trans-ferulico (FA) e acido α -lipoico (LA), realizzate con polimeri antiossidanti descritti in questo capitolo³⁴. L'effetto *scavenger* di queste membrane cellulosiche può permettere un migliore controllo dello stress ossidativo intradialitico. La preparazione, il comportamento e le proprietà di queste membrane verranno descritte in un lavoro successivo.



In questo capitolo si riporta la sintesi e la caratterizzazione di biopolimeri a base di cellulosa microcristallina e di suoi derivati su cui sono stati ancorati gruppi ferulici (MC-FA, **2**), lipoici (MC-LA, **3**) e α -tocoferulici (MC-T, **4**). L'acido trans-ferulico e lipoico sono stati direttamente legati al polimero mediante un legame estereo, mentre il derivato con α -tocoferolo è stato preparato partendo dalla 6-carbossicellulosa (schema 7.1).



Schema 7.1. Sintesi dei derivati cellululosici antiossidanti.

Reagenti e condizioni: a. (i) DMAc/LiCl, 80°C, 30min, (ii) DCC, DMAP, FA, 40°C, 72 h; b. Et₂O anidro, Piridina anidra, SOCl₂ anidro, 0°C, 10 min.; c. Et₂O anidro, Piridina anidra, riflusso, 1 h.; d. (i) DMAc/LiCl, 80°C, 30 min, (ii) DCC, DMAP, α -LA, 40°C, 72 h.; e. NaNO₂, H₃PO₄, -10°C, 10h f. (i) DMAc/LiCl, 80°C, 30 min, (ii) 6-carboxycellulose (iii) DCC, DMAP, α -T, temp. amb., 72 h.

L'idea di legare l' α -tocoferolo sulla catena della cellulosa viene dalla letteratura³⁵ in cui è dimostrata la capacità del residuo antiossidante ancorato ad un materiale polimerico di stabilizzare i radicali liberi. Inoltre, gli esteri del tocoferolo sono utilizzati come profarmaci per scopi terapeutici³⁶.

I materiali sintetizzati sono stati caratterizzati mediante spettroscopia FT-IR e ¹³C-NMR ed il loro grado di sostituzione (DS) è stato determinato mediante analisi

volumetrica³⁷. Inoltre, abbiamo valutato l'attività antiossidante dei derivati di cellulosa nell'inibire la perossidazione lipidica delle membrane microsomiali di fegato di ratto³⁸ indotta *in vitro* da due diverse sorgenti di radicali liberi: 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH) che produce radicali perossilici esogeni mediante decomposizione termica, e il tert-butil idroperossido (TBOOH) che produce radicali alcossilici endogeni mediante reazione di Fenton.

7.1 Pretrattamento della cellulosa³⁹

La cellulosa microcristallina (**1**) è stata pretrattata ponendo 10 g di campione in 50 ml di metanolo sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente e successivamente filtrata. Si eseguono altre due procedure di rigonfiamento in metanolo seguite da tre simili procedure in 50 ml di N,N'-dimetilacetammide (DMAc) che completa il processo di rigonfiamento e facilita la dissoluzione della cellulosa. Il polimero viene filtrato e essiccato a 80°C sotto vuoto per 48 h.

Dopo questa procedura, il campione contiene 0.4g di cellulosa per grammo di campione rigonfio (cellulosa+solvente).

7.2 Funzionalizzazione della cellulosa

7.2.1 Sintesi omogenea di MC-FA (2)

9 g di LiCl sono stati solubilizzati in 125 ml di DMAc per 30 minuti a 80°C sotto flusso di azoto. Dopo raffreddamento a 40°C, alla miscela solvente LiCl/DMAc è stata aggiunta la cellulosa rigonfiata (2g per 5g di campione rigonfio, 12 mmol). La soluzione è stata ulteriormente raffreddata a 25°C e si sono aggiunti l'agente condensante dicicloesilcarbodiimmide (DCC, 37 mmol), la base N,N'-dimetilamminopiridina (DMAP, 0.4 mmol) ed infine FA (37 mmol). La miscela omogenea di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 72 h a 40°C. Il polimero è stato precipitato in acqua, filtrato e lavato inizialmente con diverse aliquote di metanolo caldo per rimuovere i residui di dicicloesilurea, e ed infine con cloroformio e dietilere. Dopo essiccamento sotto vuoto, il prodotto ottenuto (1.14 g) è stato caratterizzato mediante spettroscopia FT-IR e ¹³C-NMR.

7.2.2 Sintesi eterogenea di MC-FA (2)

0.86 ml (12 mmol) di cloruro di tionile (SOCl_2) sono stati aggiunti ad una soluzione di 2 g di FA (10 mmol) in 120 ml di etere etilico (Et_2O) e di 0.95 ml (18 mmol) di piridina, a 0°C . La miscela eterogenea di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 0°C per 10 min. e, successivamente, l'eccesso di SOCl_2 e Et_2O è stato allontanato per distillazione. Il solido ottenuto è stato disperso in 150 ml di Et_2O , a cui sono stati aggiunti 0.95 ml (18 mmol) di piridina e la cellulosa rigonfiata (0.84 g di campione rigonfio pari a 0.36 g, 2 mmol). La miscela è stata mantenuta a riflusso sotto agitazione per 1 h e, successivamente, trattata con 150 ml di acqua distillata, filtrata e lavata inizialmente con Et_2O (50 ml), poi stesse aliquote di metanolo e cloroformio. Dopo essiccamento sotto vuoto, il prodotto ottenuto (0.54 g) è stato caratterizzato mediante spettroscopia FT-IR e ^{13}C -NMR.

7.2.3 Sintesi di MC-LA (3)

Questo derivato è stato preparato solo mediante sintesi omogenea perché l'acido α -lipoico è incline a omopolimerizzazioni in condizioni drastiche di reazione, dovute all'elevata instabilità del ponte zolfo presente nell'anello. Sono state impiegate le stesse condizioni di reazione e le stesse quantità di solventi e reagenti (7.62 g, 37 mmol di LA) descritte per la sintesi omogenea del derivato ferulico (paragrafo 7.2.1). Le analisi spettroscopiche FT-IR e ^{13}C -NMR del prodotto ottenuto (3.67 g) hanno confermato il legame estereo del derivato lipoico.

7.2.4 Sintesi di MC-T (4)

La 6-carbossicellulosa è stata preparata mediante una reazione di ossidazione del gruppo ossidrilico sul C-6 della cellulosa⁴⁰, e la determinazione del contenuto di gruppi carbossilici è stata effettuata mediante assorbimento di blu di metilene⁴¹.

È stata preparata una miscela solvente mediante dissoluzione di 1.73 g di LiCl in 24 ml di DMAc mantenendo la miscela sotto agitazione per 30 min. Dopo raffreddamento a 40°C sono stati aggiunti 0.6 g di 6-carbossicellulosa (corrispondenti a $0.47 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ di COOH). La soluzione ottenuta è stata ulteriormente raffreddata a 25°C e sono stati aggiunti 0.28 mmol di DCC, $9.24\cdot 10^{-3}$ mmol di DMAP ed, infine, 0.84 mmol di α -T. La miscela di reazione è

stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 72 h, poi precipitata con metanolo, lavata con diverse aliquote di acetone. Il polimero è stato recuperato mediante filtrazione e essiccato sotto vuoto. Il prodotto ottenuto (0.23g) è stato caratterizzato mediante spettroscopia FT-IR e ¹³C-NMR.

7.3 Analisi quantitativa dei gruppi esterei³⁷ (DS)

Il grado di sostituzione (DS) è stato determinato mediante analisi volumetrica dopo saponificazione degli esteri della cellulosa sintetizzati. Le misure sono state eseguite in triplicato e in tabella 7.1 si riporta la media dei DS calcolati per i derivati.

Brevemente, 50 mg di campione sono stati posti a reagire in 5 ml di una soluzione etanolica di NaOH 0.25 M a riflusso per 17h. L'eccesso di soda è stato determinato mediante titolazione con HCl 0.1 N (1° punto equivalente). Le moli di acido usate tra il 1° e il 2° punto equivalente corrispondono alle moli di estere libero. Il DS è stato calcolato secondo l'equazione 7.1:

$$DS = \frac{MM_{glucose\ unit}}{(g_{sample} / n_{free\ ester}) - (MM_{free\ ester} - MM_{H_2O})} \quad \text{Equazione} \quad 7.1$$

$n_{free\ ester} = (V_{2^\circ\ e.p.} - V_{1^\circ\ e.p.}) \times [HCl]$; $MM_{glucose\ unit}$: massa molecolare dell'unità glucosidica;

g_{sample} : peso del campione; $n_{free\ ester}$: mol di estere libero; $MM_{free\ ester}$: massa molecolare di estere libero; MM_{H_2O} : massa molecolare di acqua

Tabella 7.1. Grado di sostituzione (DS)

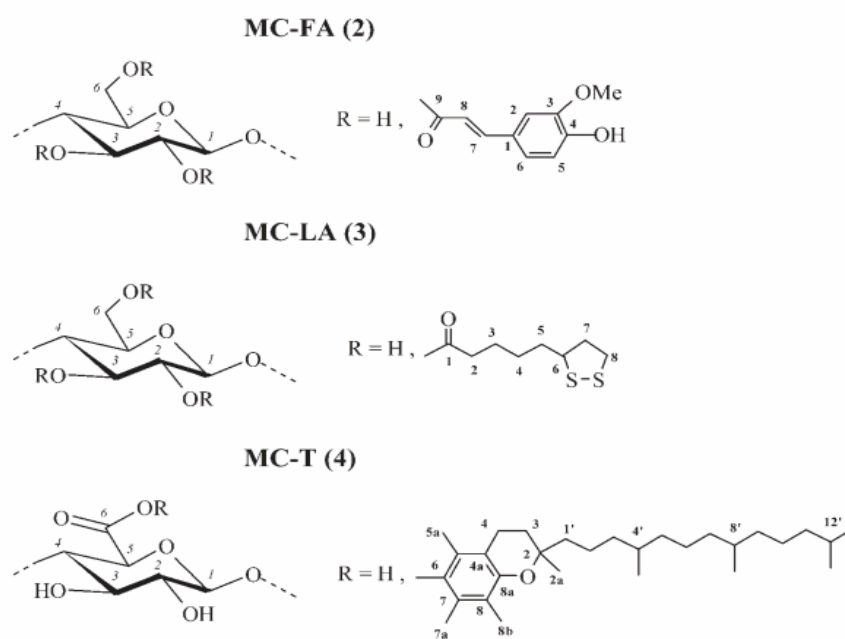
Campione	DS
MC-FA sintesi omogenea	0.56±0.05
MC-FA sintesi eterogenea	0.68±0.03
MC-LA	0.52±0.08
MC-T	1.00±0.05

7.4 Caratterizzazione spettroscopica FT-IR e $^{13}\text{C-NMR}$

La formazione dei derivati della cellulosa è confermata da analisi spettroscopiche. Gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ mostrano una considerevole variazione dei valori di *chemical-shift* in confronto allo spettro della cellulosa di partenza.

Le più importanti informazioni ottenute dagli spettri FT-IR nel caso del derivato lipoico MC-LA è la presenza della banda a 521 cm^{-1} dello *stretching* del legame S-S, e l'assenza di bande tra 2560 e 2570 cm^{-1} caratteristica dello *stretching* S-H conferma che l'anello ciclico della porzione lipoica resta intatto durante la reazione.

Le strutture dei derivati sono riportate nello schema 7.2. I risultati per le misure spettroscopiche FT-IR (KBr) e $^{13}\text{C-NMR}$ (DMAc/LiCl, temp. amb.) sono riportati in tabella 7.2 e 7.3 rispettivamente.



Schema 7.2. Strutture e numerazione degli atomi di carbonio dei derivati.

Tabella 7.2. Misure FT-IR (KBr)

Campione	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
MC-FA (2)	3347 (OH); 2930 (CH); 1728 (CO Estere); 1230 (COC Estere)
MC-LA (3)	3480 (OH); 2929 (CH); 1731 (CO Estere); 1240 (COC Estere)
MC-T (4)	3434 (OH); 2927 (CH); 1734 (CO Estere); 1264 (COC Estere); 521 (S-S)

Tabella 7.3. Misure ^{13}C -NMR (DMAc/LiCl, temp. amb.)

Campione	n. di carbonio del sostituente	δ (ppm)	n. carbonio AUG*	δ (ppm)	n. carbonio AUG-s*	δ (ppm)
MC-FA (2)	1	126.22	1	104.0	1'	101.1
	2	111.57	2	73.6		
	3	148.36	3	76.4		
	4	149.53	4	81.3		
	5	116.07	5	74.9		
	6	123.30	6	59.8	6s	62.6
	7	144.98				
	8	115.96				
	9	168.46				
	OMe	56.13				
MC-LA (3)	1	156.91	1	103.2	1'	101.5
	2	32.12	2	73.2		
	3	24.47	3	75.9		
	4	27.12	4	80.0		
	5	34.58	5	74.8		
	6	55.06	6	61.0	6s	63.7
	7	38.91				
	8	36.87				
MC-T (4)	1'	39.89	1	102.04	1'	100.09
	2'	21.72	2	72.67		
	3'	37.49	3	74.02		
	4'	32.79	4	75.17		
	4a'	20.79	5	80.38		
	5'	39.40	6	174.9	6s	168.83
	6'	24.95				
	7'	37.61				
	8'	33.52				
	8a'	19.78				
	9'	39.40				
	10'	25.59				
	11'	40.05				
	12'	28.80				
	12a'	23.02				
	2	74.54				
	2a	24.48				
	3	31.53				
	4	21.09				
	4a	118.49				
	5	122.63				
	5a	12.24				
	6	141.60				
	7	125.88				
	7a	13.18				
	8	127.42				
	8a	149.70				
	8b	12.31				

* AUG: unità glucosidica; AUG-s: unità glucosidica sostituita

7.5 Preparazione della sospensione microsomiale

I microsomi di fegato di ratto sono stati preparati mediante omogeneizzazione del tessuto con 5 volumi di ghiaccio, 0.25 M di saccarosio contenente 5 mM di acido 4,2-idrossietil-1-piperazinetansolfonico (HEPES), $0.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ di acido etilendiamminotetracetico (EDTA) a pH 7.5⁴². Le membrane microsomiali sono state isolate mediante rimozione della frazione nucleare a 8000 g per 10 minuti e rimosse dalla frazione mitocondriale a 18000 g per 10 minuti. La frazione microsomiale è stata sedimentata a 105000 g per 60 minuti, successivamente lavata con KCl 0.15M e recuperata nuovamente a 105000 g per 30 minuti⁴³.

Le membrane sono state sospese in tampone fosfato 0.1M a pH 7.5 e conservate a -80°C. Le proteine microsomiali sono state determinate mediante il metodo Bio-Rad⁴⁴.

7.6 Addizione di MC-FA, MC-LA e MC-T ai microsomi

Ai microsomi sospesi mediante leggera omogeneizzazione sono state aggiunte varie aliquote dei tre derivati cellulósici nel range di 0.5-6 mg·ml⁻¹. Le sospensioni sono state, quindi, incubate in un bagno a 37°C sotto leggera agitazione, in presenza di aria e al buio.

7.7 Formazione della malondialdeide (MDA)

La MDA è stata estratta ed analizzata come riportato in letteratura²⁵. Brevemente, sono state miscelate aliquote da 1 ml di sospensione microsomiale (0.5 mg di proteine) con 3 ml di una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) allo 0.5%, con 0.5 ml di una soluzione composta da 2 parti di acido 2-tiobarbiturico allo 0.4% (TBA) in 0.2M HCl ed una parte di acqua distillata, e con 0.07 ml di idrossitoluene butilato (BHT) allo 0.2% in metanolo al 95%. I campioni sono stati incubati in un bagno a 90°C per 45 minuti. Dopo questo tempo di incubazione, è stato estratto il complesso TBA-MDA con 3 ml di alcol isobutilico. L'assorbanza dell'estratto è stata misurata mediante spettrofotometria UV a 535 nm ed il risultato viene espresso come nmol per mg di proteine ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ l} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7.8 Proprietà antiossidanti dei derivati cellulosici MC-FA, MC-LA e MC-T

L'abilità dei derivati cellulosici nel proteggere contro la perossidazione lipidica indotta da due diverse sorgenti di radicali liberi, è stata esaminata incubando le membrane microsomiali di fegato di ratto, in presenza dei derivati sintetizzati, con $0.25 \cdot 10^{-3}$ M di TBOOH o con $25 \cdot 10^{-3}$ M di AAPH per 120 minuti a 37°C , all'aria e al buio. Lo stesso esperimento è stato eseguito sulla cellulosa microcristallina commerciale per verificare le proprietà antiossidanti del polimero non derivatizzato. I dati ottenuti, non riportati, rivelano che la cellulosa non ha attività antiossidante.

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

Gli effetti dei derivati della cellulosa sulla perossidazione lipidica sono tempo-dipendenti e mostrano un buon effetto antiossidante sia come % di inibizione di MDA che come produzione di MDA in $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ di proteine (figura 7.1 e 7.2).

Il derivato ferulico MC-FA risulta un antiossidante più efficace nel proteggere le membrane rispetto ai derivati MC-LA e MC-T; in particolare, tutti i derivati sintetizzati presentano un'attività antiossidante maggiore nella protezione delle membrane dalla perossidazione lipidica indotta dal TBOOH rispetto a quella indotta dall'AAPH, mostrando in entrambi i casi una massima efficienza per un tempo di 30 minuti di incubazione, preservando l'attività antiossidante fino a 2 ore.

Inoltre, il derivato ferulico con maggiore DS (0.68) inibisce in misura maggiore la produzione di MDA, indotta da entrambi i proossidanti TBOOH e AAPH, rispetto all'analogo derivato con DS più basso (0.56) (figura 7.3).

Il comportamento del derivato MC-T è da considerare perché, nonostante il fatto che il gruppo OH fenolico, riconosciuto come responsabile dell'effetto antiossidante della molecola, è impegnato nel legame con la catena polimerica della cellulosa, presenta una buona attività antiossidante. Questo risultato è in

accordo con dati di letteratura che riportano la capacità del gruppo α -tocoferilico di stabilizzare i radicali liberi anche quando è ancorato ad una matrice metacrilica o copolimerizzato con idrossietilmetacrilato fornendo un idrogel³⁵. Questa capacità può derivare dall'azione della porzione α -tocoferilica *in situ* o anche dal rilascio dell' α -tocoferolo dopo un'eventuale idrolisi del legame estereo in condizioni fisiologiche³⁶.

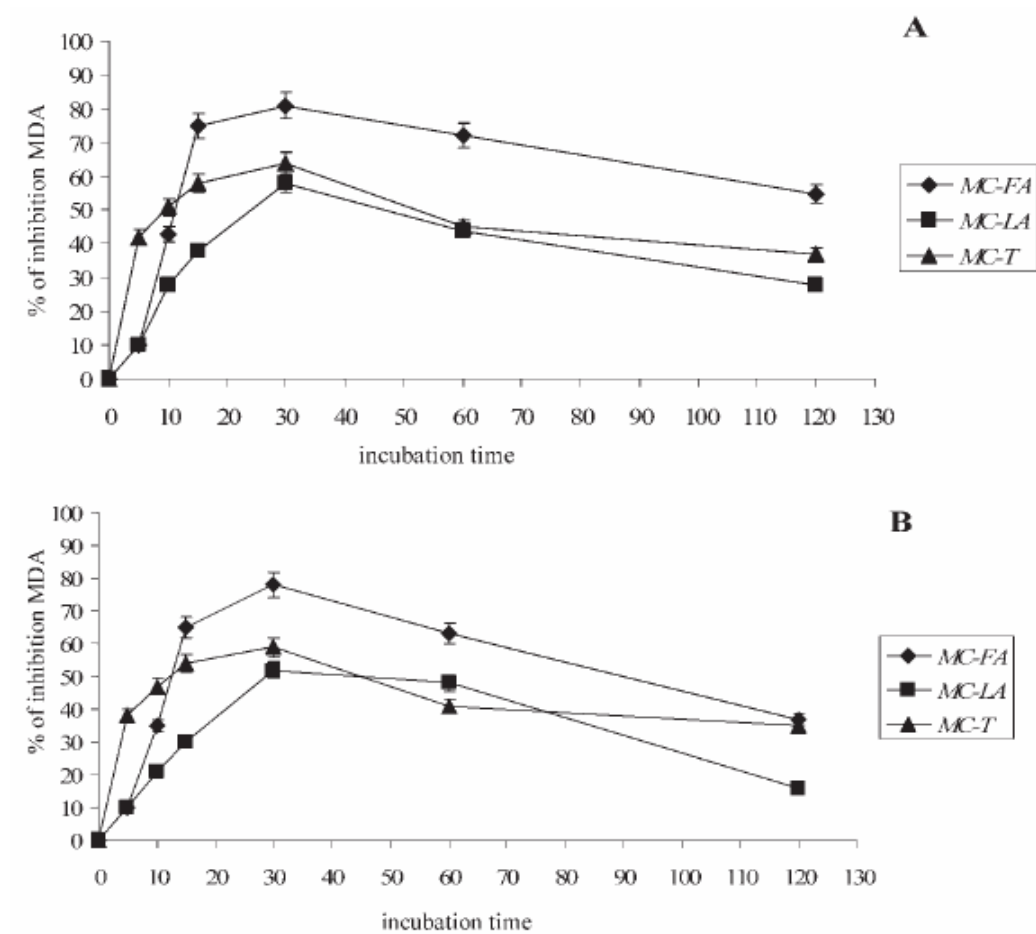


Figura 7.1 Percentuale di inibizione di MDA formata per induzione nelle membrane microsomiali di ratto da (A) TBOOH e (B) AAPH. I risultati rappresentano il valore medio \pm l'errore standard di sei esperimenti eseguiti separatamente.

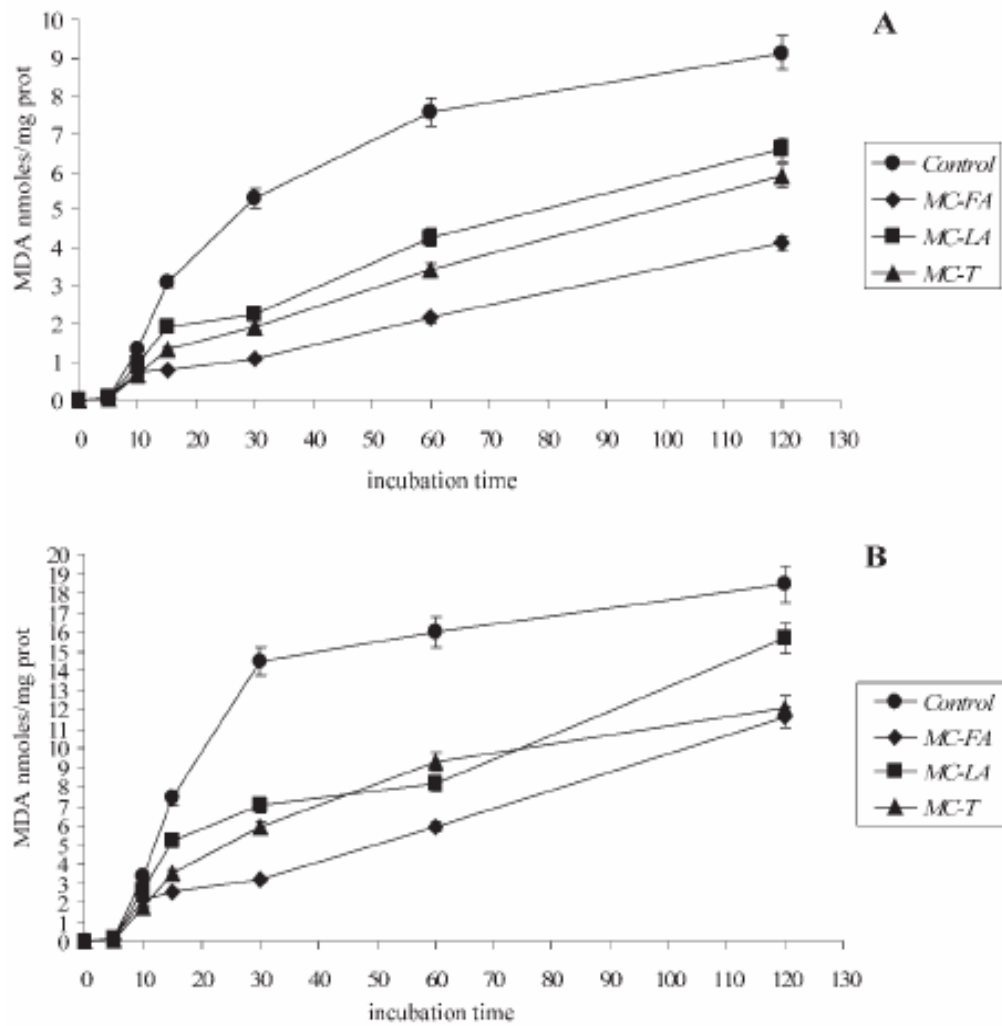


Figura 7.2 Effetto dei derivati cellulosici sulla produzione di MDA formata per induzione nelle membrane microsomiali di ratto da (A) TBOOH e (B) AAPH. I risultati rappresentano il valore medio \pm l'errore standard di sei esperimenti eseguiti separatamente.

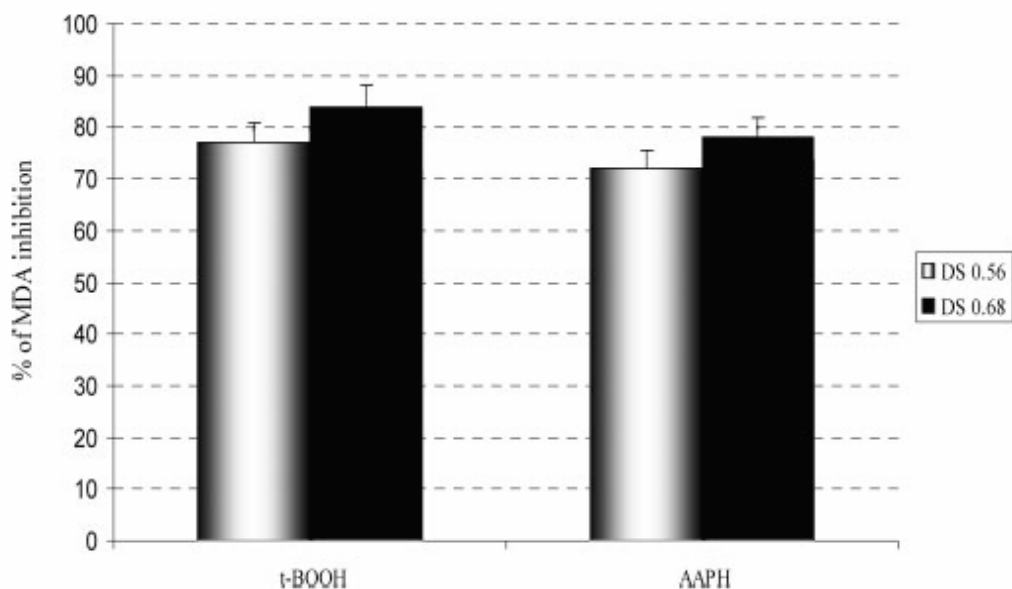


Figura 7.3 Percentuale di inibizione di MDA formata per induzione nelle membrane microsomiali di ratto da TBOOH e AAPH in presenza di cellulosa ferulata con DS 0.56 ± 0.05 e 0.68 ± 0.03 , rispettivamente. I risultati rappresentano il valore medio \pm l'errore standard di sei esperimenti eseguiti separatamente.

7.9 Conclusioni

Sono stati preparati derivati della cellulosa con diversi valori di DS introducendo residui antiossidanti sulla catena polimerica ed è stata valutata l'attività antiossidante di questi sistemi attraverso le membrane microsomiali di fegato di ratto. I risultati ottenuti suggeriscono che l'acido trans-ferulico, l'acido α -lipoico e l' α -tocoferolo legati al polimero mantengono la loro ottima attività antiossidante. La struttura macromolecolare dei sistemi preparati può migliorare il trasporto e la stabilità metabolica delle molecole antiossidanti ed, inoltre, ridurre la velocità di degradazione. Quindi, questi sistemi possono trovare applicazione in campo chimico e biomedico.

Negli ultimi anni, molti studi si sono rivolti verso i danni provocati da trattamenti a lungo termine nei pazienti dializzati. Studi preliminari che impiegano membrane biocompatibili ricoperte con agenti antiossidanti, come la vitamina E, mostrano

miglioramenti significativi nella funzionalità degli organi di tali pazienti, migliorandone la qualità della vita.

Dati i risultati incoraggianti ottenuti in questo lavoro di ricerca, nel nostro laboratorio stiamo utilizzando questi sistemi a base di cellulosa, su cui abbiamo legato covalentemente le molecole antiossidanti, per realizzare membrane emocompatibili, in modo da permettere al sangue dei pazienti dializzati di venire a contatto con gli agenti antiossidanti e garantirne una migliore protezione contro lo stress ossidativo.

Bibliografia

- ¹ W. Palinski, M. E. Rosenfeld, S. Yla-Hertulla, G. C. Gurtner, S. S. Socher, S. W. Butler, S. Parthasarathy, T. E. Carew, D. Steinberg, J. L. Witztum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 1372
- ² K. H. Cheeseman, L. G. Forni, *Biochem. Pharmacol.* 1988, 37, 4225.
- ³ S. A. Weitzman, A. B. Weitberg, E. P. Clark, T. P. Stossel, *Science* 1985, 227, 1231.
- ⁴ J. C. Fantone, P. A. Ward, *Hum. Pathol.* 1985, 16, 973.
- ⁵ M. Cengiz, M. Seven, N. Suyugul, *Genet. Couns.* 2002, 1, 339.
- ⁶ A. Sharma, S. Bansal, R. K. Nagpal, *Indian J. Pediatr.* 2003, 70, 715.
- ⁷ L. Canevari, A. Y. Abramov, M. R. Duchen, *Neurochem. Res.* 2004, 29, 637
- ⁸ L. Tretter, I. Sipos, V. Adam-Vizi, *Neurochem. Res.* 2004, 29, 569.
- ⁹ X. Zhu, A. K. Raina, G. Perry, M. A. Smith, *Lancet Neurol.* 2004, 3, 219.
- ¹⁰ N. F. Wiernsperger, *BioFactors* 2003, 19, 11
- ¹¹ B. Halliwell, J.M. C. Gutteridge, *Methods Enzymol.* 1990, 186, 1.
- ¹² M. R. McCall, B. Frei, *Free Radical Biol. Med.* 1999, 26, 1034.
- ¹³ I. Pinchuk, D. Lichtemberg, *Prog. Lipid Res.* 2002, 41, 279.
- ¹⁴ U. P. Steinbrecher, *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1436, 279
- ¹⁵ A. T. Diplock, ‘‘Fat-Soluble Vitamins, their Biochemistry and Applications’’, Heinemann, London 1985, p. 154.
- ¹⁶ H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. Taniguchi, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2161.
- ¹⁷ O. I. Aruoma, M. Grootveld, B. Halliwell, *J. Inorg. Biochem.* 1987, 29, 289
- ¹⁸ B. Halliwell, *Nutr. Rev.* 1994, 52, 253.
- ¹⁹ E. Graf, J. M. Eaton, *Free Radical Biol. Med.* 1990, 8, 61.
- ²⁰ S. Muraoka, T. Miura, *Life Sci.* 2004, 74, 1691.
- ²¹ V. Raboy, *Phytochemistry* 2003, 64, 1033.
- ²² I. Vucenik, A. M. Shamsuddin, *J. Nutrition* 2003, 133, 3878S.
- ²³ L. G. Barrientos, P. P. N. Murthy, *Carbohydr. Res.* 1996, 296, 39.
- ²⁴ B. Q. Phillippy, E. Graf, *Free Radical Biol. Med.* 1997, 22, 939.
- ²⁵ A. E. Hagerman, K. M. Riedl, J. G. Alexander, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, T. W. Hartzfeld, T. L. Riechel, *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1887.
- ²⁶ F. Iemma, S. Trombino, F. Puoci, G. Cirillo, U. G. Spizzirri, R. Muzzalupo, N. Picci, *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 1049.

-
- ²⁷ M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, *Biomacromolecules* 2003, 4, 1394.
- ²⁸ J. Q. Pan, N. C. Liu, W. W. Y. Lau, *Polym. Degrad. Stab.* 1998, 62, 165.
- ²⁹ M. Saito, H. Hosoyama, T. Ariga, S. Kataoka, N. Yamaji, *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1460
- ³⁰ M. D. Hadgood, Z. D. Liu, L. S. Dehkordi, H. H. Khodr, J. Abbot, R. C. Hider, *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57, 1305.
- ³¹ V. A. Levin, *J. Med. Chem.* 1980, 23, 682
- ³² I. Baraghetti, S. Furiani, S. Vettoretti, S. Raselli, F. M. Maggi, F. Galli, A. L. Catapano, G. Bucciatti, *Blood Purif.* 2006, 24, 369.
- ³³ N. Clyne, T. Jogestrand, *Nephron* 1992, 60, 390.
- ³⁴ Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Leta, S., & Puoci, F., et al. (2008). *Macromol. Biosci.*, 8, 86–95.
- ³⁵ C. Ortiz, B. Vazquez, J. San Roma ´n, *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 45, 184.
- ^{35a} I. Cho, Y. D. Kim, *Macromol. Symp.* 1997, 118, 631
- ³⁶ G. M. Beijersbergen Van Henegouwen, H. E. Junginger, H. J. De Vries, *J. Photochem. Photobio.* 1995, 29, 45.
- ³⁷ R. Cassano, S. Trombino, E. Bloise, R. Muzzalupo, F. Iemma, G. Chidichimo, N. Picci. (2007). *J. Agric. Food Chem.*, 55 (23) 9489-9495
- ³⁸ S. Trombino, S. Serini, F. Di Nicuolo, L. Celleno, S. Ando ` , N. Picci, G. Calviello, P. Palozza, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2411.
- ³⁹ Z. B. Zhang, C. L. McCormick, *J. Appl. Polym. Sci.* 1997, 66, 293.
- ⁴⁰ T. J. Painter, *Carbohydr. Res.* 1977, 55, 95.
- ⁴¹ B. Philipp, W. Rehder, H. Lang, *Papier* 1965, 19, 1.
- ⁴² V. L. Tatum, C. Changoit, C. K. Chow, *Lipids* 1990, 25, 226.
- ⁴³ T. Ohta, T. Nakano, Y. Egashira, H. Sanada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 1942
- ⁴⁴ M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.

Capitolo 8

Sistemi polimerici per rilascio di farmaci: gli idrogel

Introduzione

Le strategie utilizzate per la veicolazione di farmaci mediante *carrier* di natura polimerica sono diverse. Un metodo per ottenere un continuo rilascio del farmaco è l'uso di eccipienti polimerici, a carattere idrofilico ma insolubili in acqua, capaci di assorbire e trattenere grandi quantità di acqua e fluidi biologici, rilasciando il farmaco attraverso una lenta diffusione.

Queste matrici polimeriche, grazie alle loro caratteristiche, influenzano l'assunzione, la distribuzione e l'eliminazione del farmaco, aumentando da un lato l'efficienza terapeutica e dall'altro diminuendo i livelli di tossicità; inoltre, come per i pro-farmaci polimerici, le matrici devono essere chimicamente inerti, non tossiche, non cancerogene, e devono preservare il farmaco da possibili alterazioni chimiche e/o enzimatiche.

8.1 Idrogel: definizione, classificazione e proprietà

Gli idrogel sono strutture polimeriche reticolate in grado di assorbire un'elevata quantità d'acqua o fluidi biologici¹. Attraverso una valutazione strutturale si è arrivati alla conclusione che un reticolo ideale si ottiene solo raramente. In figura 8.1 è riportato un reticolo macromolecolare ideale (figura A) in cui è possibile distinguere punti di reticolazione tetrafunzionali (*junction*). Tuttavia, in reticoli reali è possibile incontrare giunzioni multifunzionali (figura B) o aggrovigliamenti molecolari dovuti alla presenza di interazioni non covalenti (figura C). Infine è sempre possibile imbattersi in idrogel con difetti molecolari.

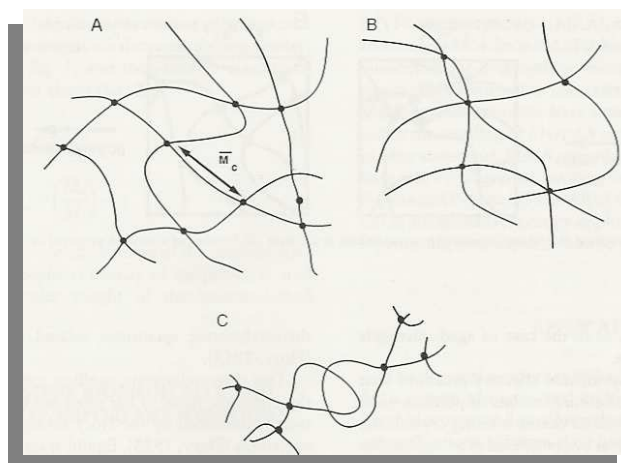


Figura 8.1 (A) reticolo ideale; (B) e (C) reticoli reali.

Grazie alla natura idrofila delle catene polimeriche, gli idrogel risultano termodinamicamente compatibili con l'acqua; questa caratteristica permette loro di rigonfiare nei mezzi acquosi. La reticolazione deve essere presente nell'idrogel per prevenire la dissoluzione della catena polimerica idrofila nell'ambiente acquoso. I metodi³ per preparare i reticoli sono svariati: reticoli chimici, ottenuti mediante polimerizzazione radicalica, polimerizzazione di addizione, condensazione, reazioni con aldeidi, polimerizzazione ad alta energia, reticolazione mediante enzimi, e reticoli fisici ottenuti da interazioni ioniche, da processi di cristallizzazione, da legami ad idrogeno e da interazioni tra proteine.

Gli idrogel trovano molte applicazioni sia in campo biomedico⁴ che farmaceutico in quanto grazie alle loro proprietà risultano molto simili ai tessuti viventi più di ogni altro materiale sintetico⁵, motivo per cui vengono utilizzati come lenti a contatto, membrane per biosensori, materiali per la realizzazione di pelle artificiale e congegni per il rilascio modificato di farmaci.

Gli idrogel possono essere classificati in base al metodo di preparazione, alla carica ionica, e alle caratteristiche strutturali in diverse categorie.

Sulla base del metodo di preparazione possono essere classificati in: omopolimeri, copolimeri, multipolimeri e strutture polimeriche e interpenstrate. Gli omopolimeri sono strutture polimeriche contenenti unità ripetitive identiche, mentre i copolimeri sono strutture reticolate costituite da comonomeri di cui

almeno uno di natura idrofilica che renda idro-rigonfiabile il materiale. Gli idrogel polimerici interpenetranti sono preparati sintetizzando un primo reticolo rigonfiato in un monomero. Successivamente alla polimerizzazione si osserva la formazione di una seconda struttura interna alla prima.

In base alla carica ionica, quindi a seconda dei gruppi funzionali presenti sulla catena laterale, gli idrogel si distinguono in neutri o ionici.

Un'altra classificazione tiene conto della morfologia del reticolo polimerico, in base alla quale gli idrogel si suddividono in amorfi, semicristallini, strutture supramolecolari e aggregati colloidali. Inoltre, la struttura del reticolo ci permette di parlare di sistemi macroporosi, microporosi, e non porosi.

Una delle più importanti proprietà degli idrogel, peraltro molto sfruttata nella costruzione di sistemi a rilascio modificato, è rappresentata dalla loro elevata permeabilità. La performance del sistema polimerico, in questo campo di ricerca, è in gran parte dipendente dalla struttura tridimensionale⁶ (figura 8.2). I parametri più usati per la caratterizzazione di questa sono rappresentati:

- dalla frazione di volume polimerica nello stato rigonfiato, $V_{2,s}$,
- dal peso molecolare del polimero tra i due punti di reticolazione, M_c ,
- dalle dimensioni dei pori ξ .

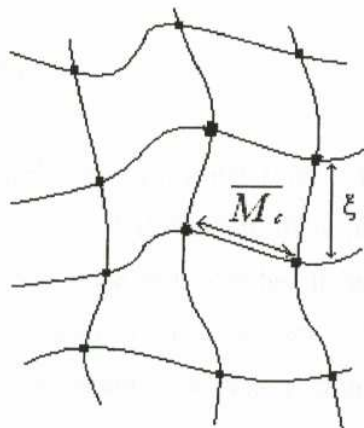


Figura 8.2. Struttura tridimensionale di un reticolo polimerico

Il volume del polimero nello stato rigonfiato, $V_{2,s}$, è una misura della quantità di fluido inglobato nell'idrogel. M_c dipende dal grado di reticolazione della matrice polimerica.

8.2 Idrogel come DDS

L'esistenza degli idrogel risale al 1960 quando Wichterle e Lim per primi proposero l'uso di sistemi idrofilici di poli (2-idrossietilmetacrilato) (PHEMA) nelle lenti a contatto. Da allora l'uso degli idrogel è stato esteso a varie applicazioni biomediche e farmaceutiche.

Gli idrogel possono essere considerati semplicemente come dei sistemi polimerici costituiti da legami stabili, sia di natura fisica (idrogel fisici) che di natura chimica (idrogel chimici), che rendono la struttura insolubile in acqua ma che sono capaci di rigonfiare in mezzo acquoso, pur mantenendo la loro struttura tridimensionale. E' da sottolineare che questo comportamento è totalmente reversibile: infatti, se la matrice viene deidratata, ritorna alla propria configurazione iniziale⁷ (figura 8.3).

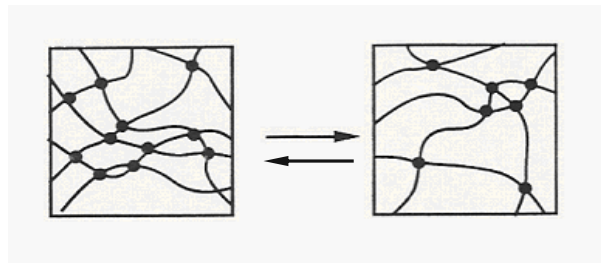


Figura 8.3. Comportamento reversibile di una struttura reticolata di un idrogel.

Il comportamento degli idrogel è molto influenzato dalla struttura chimica del polimero, poiché la presenza di gruppi idrofilici che interagiscono con l'ambiente acquoso permettono un rigonfiamento (*swelling*) maggiore rispetto agli idrogel che contengono gruppi idrofobici. Questi ultimi, infatti, collassano in ambiente acquoso così da minimizzare la loro esposizione alle molecole di acqua, con conseguente contrazione (*shrinking*) della maglia polimerica.

Un altro fattore che influenza il grado di *swelling* degli idrogel è il "rapporto di legame crociato", definito come il rapporto tra le moli di agente reticolato (*cross-*

link) e le moli delle unità ripetitive del polimero: più è elevato questo rapporto, più l'agente reticolato è incorporato nella struttura dell'idrogel. Gli idrogel estremamente reticolati hanno una struttura stretta e rigonfieranno di meno rispetto agli idrogel con un rapporto di legame crociato inferiore.

Gli idrogel sono stati utilizzati in maniera notevole in campo farmaceutico in virtù della loro elevata biodisponibilità e della loro sensibilità nei confronti dell'ambiente esterno. In questo contesto, sono molto apprezzati in quanto possono essere progettati in modo da avvertire uno stimolo, interno o esterno al corpo, e rispondere a tale stimolo esibendo cambiamenti nel loro comportamento chimico o fisico, con conseguente rilascio controllato del farmaco in esso intrappolato. Fra gli stimoli usati per modulare il rilascio di un farmaco (figura 8.4) troviamo:

- la temperatura
- il campo magnetico
- il pH,
- le radiazioni luminose,
- la forza ionica
- gli ultrasuoni
- la concentrazione ematica di particolari sostanze, quali glucosio e urea

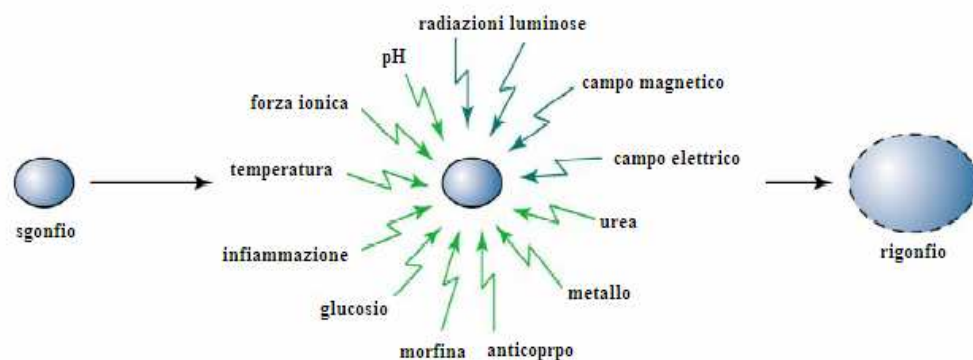


Figura 8.4. Rappresentazione schematica della risposta di un idrogel a vari tipi di stimoli

Negli ultimi trent'anni le ricerche in questo campo si sono rivolte verso la valutazione della risposta degli idrogel nei confronti di stimoli conformi a quelli fisiologici. Lo studio di questa tipologia di idrogel è stato molto importante soprattutto per comprendere il comportamento di una determinata forma farmaceutica dopo somministrazione a contatto con i fluidi biologici.

In particolare, lo studio dei sistemi pH sensibili ha riscontrato recentemente un grande interesse, in quanto possono provvedere alla protezione dei farmaci nei confronti di un ambiente potenzialmente ostile, a livello del sito di rilascio, “conservandoli” nella rete in attesa dello stimolo al rilascio, infatti, in diverse parti del corpo sono presenti variazioni di pH, come nel tratto gastrointestinale, vagina e vasi sanguigni e ciò può essere sfruttato nel rilascio di farmaci da sistemi pH-sensibili.

8.2.1 Idrogel termo-sensibili

Numerosi sono i polimeri che in seguito a variazioni di temperatura mostrano una transizione di fase. Per comprendere meglio questo comportamento si fa riferimento alla temperatura di soluzione critica inferiore (LCST) che per un sistema bifasico (polimero-acqua) rappresenta la temperatura limite, al di sotto della quale il sistema è completamente miscibile, al di sopra della quale le due fasi sono invece immiscibili. Per i sistemi polimerici la LCST è quella temperatura al di sotto della quale la matrice interagisce con il solvente rigonfiandosi.

La temperatura critica superiore (UCST), riferita sempre al sistema bifasico, è quella temperatura al di sopra della quale i componenti sono totalmente miscibili e, viceversa al di sotto.

Quindi applicando il concetto ad un sistema bifasico polimero-solvente, si osserva un rigonfiamento (*swelling*) a valori superiori di UCST, e contrazione (*shrinking*) a valori più bassi.

I polimeri che possiedono una LCST esibiscono un comportamento noto come *swelling* inverso o negativo dipendente dalla temperatura. La caratteristica di questi polimeri è quella di essere costituiti da catene che possiedono gruppi moderatamente idrofobici o miscele di segmenti idrofobici e idrofilici, di modo che a basse temperature si verifica idratazione a causa della formazione di legami

a idrogeno tra i segmenti idrofilici e le molecole d'acqua. Ad alte temperature i ponti a idrogeno diventano più deboli motivo per cui il risultato netto è la contrazione dell'idrogel. La LCST può essere mutata cambiando il rapporto tra i segmenti idrofilici e quelli idrofobici del polimero.

8.2.2 Idrogel sensibili agli enzimi

Molti enzimi sono stati utilizzati come strumento di diagnosi al fine di monitorare specifici cambiamenti fisiologici in organi specifici. Per questo motivo, enzimi specifici sono divenuti segnali utili per il rilascio di farmaci sito-specifico. In seguito alla scoperta di polimeri biodegradabili e della loro possibilità di essere digeriti enzimaticamente sono stati preparati degli idrogel sensibili agli enzimi.

8.2.3 Idrogel sensibili agli antigeni

Gli anticorpi sono muniti di specifici siti di legame per gli antigeni mediante interazioni non covalenti come legami elettrostatici, legami a ponte idrogeno, interazioni idrofobiche e interazioni di Vander Waals. La principale funzione degli anticorpi è legata alla difesa immunitaria del nostro organismo nei confronti di sostanze estranee. Gli idrogel sensibili agli antigeni sono preparati usando il complesso antigene-anticorpo legato a punti di *cross-link* nell'idrogel.

In genere, le maggiori potenzialità degli idrogel sensibili agli stimoli richiedono un comportamento reversibile in risposta ai cambiamenti degli stimoli ambientali.

Nel caso degli idrogel contenenti antigene-anticorpo intrappolati, l'anticorpo trasuda dall'idrogel, mentre questo subisce rigonfiamento per risposta a uno specifico antigene. Come risultato della perdita dell'anticorpo, l'idrogel, con intrappolati antigene e anticorpo, non mostra un comportamento reversibile di *swelling-shrinking* in risposta ai cambiamenti in concentrazione di antigene.

Quindi, gli idrogel devono essere costruiti per far sì di avere un idrogel sensibile all'antigene reversibile. Per far questo, l'anticorpo deve essere immobilizzato nella rete cosicché può costruire un complesso con l'antigene innestato alla rete in una soluzione tampone, senza la presenza di antigene libero.

Un idrogel reversibile, sensibile agli antigeni, può essere preparato per esempio, con la fabbricazione di una struttura a rete polimerica semi-interpenetrante, che

consiste in un polimero lineare racchiudente gli anticorpi e una rete contenente gli antigeni.

8.2.4 Idrogel pH sensibili

Tutti gli idrogel pH-sensibili sono formati da uno scheletro polimerico a livello del quale sono presenti gruppi funzionali ionizzabili: gruppi acidi (acidi carbossilici e solforici) o basici (sali di ammonio), che accettano o rilasciano protoni in risposta a variazioni di pH nell'ambiente circostante.

In mezzo acquoso, questi gruppi si ionizzano e sviluppano una carica nella rete polimerica, creando delle forze elettrostatiche repulsive responsabili dello *swelling* o dello *shrinking*. A piccole variazioni di pH corrispondono grandi variazioni nella misura delle maglie della rete polimerica.

Ovviamente, il rigonfiamento permette al farmaco di "sbrigliarsi" dalle maglie della rete polimerica, facilitando, per diffusione, il rilascio dello stesso al sito d'azione, affinché possa esplicare il suo effetto terapeutico.

Oltre alle caratteristiche chimiche del polimero, anche la natura del mezzo di rilascio influenza la cinetica di *swelling* degli idrogel pH-sensibili.

Se sono presenti gruppi anionici nella rete polimerica (idrogel anionico), questi si ionizzeranno a valori di pH maggiore del pKa dello stesso gruppo ionizzabile, e l'idrogel si rigonfia. Il contrario avviene per gli idrogel cationici, i quali rigonfiano a un valore di pH più basso del pKa dei gruppi ionizzabili (figura 8.5).

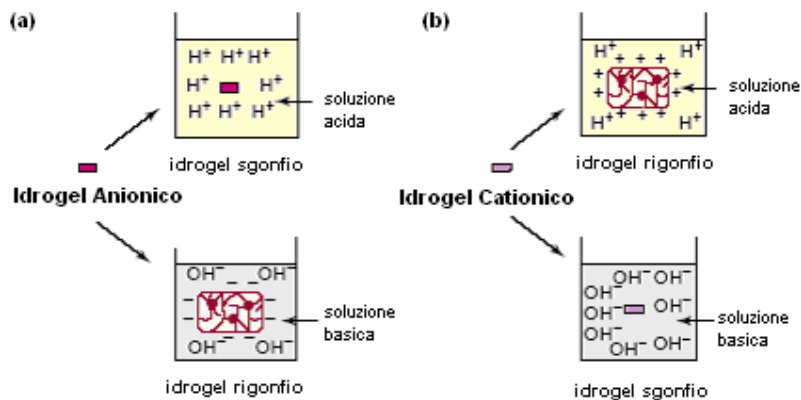


Figura 8.5. Comportamento di idrogel pH-sensibili (a) anionico e (b) cationico

Quindi, a seconda del pH acido o basico del mezzo di rilascio, si assiste a un differente ed opposto *swelling* degli idrogel. Occorre comunque tener presente che i valori delle costanti acide dei singoli monomeri possono subire, a causa dell'intorno chimico presente, piccole variazioni.

La maggiore applicazione dei sistemi pH-sensibili è il rilascio controllato di farmaci che vengono somministrati per via orale, sfruttando la differenza di pH esistente tra lo stomaco e l'intestino.

Tuttavia, si stanno creando nuovi approcci per l'utilizzo di questi sistemi, ad esempio sono stati studiati sistemi polimerici con proprietà bioerodibili sensibili al pH.

Esempi di sistemi polimerici pH-sensibili sono stati progettati per il rilascio di un farmaco molto importante, l'insulina⁸, grazie alla produzione di idrogel a base di idrossietilmetacrilato nel quale sono stati inglobati gli enzimi glucosio ossidasi e catalasi. In questo caso, il rigonfiamento dell'idrogel è innescato dalla diffusione di glucosio al suo interno dove avviene la conversione, catalizzata enzimaticamente, in acido gluconico. L'abbassamento del pH nel microambiente dell'idrogel genera il suo rigonfiamento con conseguente rilascio di insulina.

Una diminuzione della concentrazione di glucosio in risposta all'insulina rilasciata causa la contrattura dell'idrogel con diminuzione della velocità di rilascio dell'insulina. In questo modo un sistema a rilascio controllato segue la necessità fisiologiche del corpo.

I polimeri ionici più studiati per la sintesi di idrogel pH-sensibili comprendono poli (acrilamide) (pAAM), poli (acido acrilico) (PAA), poli (acido metacrilico) (PMAA), poli (dietilaminoetilmetacrilato) (PDEAEMA) e poli (dimetilaminoetilmetacrilato) (PDMAEMA)⁹.

8.3 Meccanismi e andamento di rilascio del farmaco

Come accennato, la cinetica di rilascio è influenzata dall'idrofilia della matrice polimerica e dal suo grado di reticolazione ma anche dalle proprietà chimico-fisiche del farmaco (solubilità, massa molare, tipo di interazioni che può stabilire con il polimero), dalla tecnica utilizzata per l'incorporazione del farmaco nell'idrogel e dalla quantità che ne viene incorporata¹⁰. Affinché un idrogel possa

essere utilizzato come sistema per il rilascio di farmaci è necessario che abbia un opportuno grado di rigonfiamento ed una certa permeabilità al farmaco intrappolato, tale da consentire la sua diffusione tra le maglie del polimero.

La maggior parte degli idrogel ha consistenza vetrosa nello stato deidratato ma, venendo a contatto con acqua o con un altro fluido termodinamicamente compatibile, si ha la penetrazione del solvente attraverso le catene macromolecolari. Nel momento in cui penetra una quantità sufficiente di acqua, la temperatura di transizione vetrosa del polimero diminuisce, la matrice assume consistenza gommosa e si ha il rigonfiamento¹¹. Il movimento delle molecole di solvente avviene ad una velocità ben definita e con un simultaneo aumento dell'ampiezza delle maglie del reticolo polimerico nella regione idratata. Il rilascio del farmaco avviene per diffusione attraverso le maglie allargate. La diffusione e il trasporto di sostanze attraverso gli idrogel può seguire fondamentalmente tre diverse cinetiche:

1. diffusione normale (o legge di Fick,) quando la velocità di diffusione è minore di quella di rigonfiamento, in cui il coefficiente di diffusione è il parametro che controlla il processo;
2. trasporto lineare, in cui la diffusione è molto veloce ed il trasporto è regolato dalla velocità del processo di rigonfiamento (o dall'erosione, per sistemi erodibili).
3. diffusione di tipo anomalo (che non segue la legge di Fick), dove la velocità di diffusione è paragonabile a quella di rigonfiamento.

L'equazione proposta da Korsmeyer e Peppas descrive l'andamento complessivo del processo:

$$M_t/M_{inf} = K * T^n$$

dove:

M_t/M_{inf} rappresenta la frazione di farmaco rilasciata al tempo T

K ed n sono rispettivamente la costante e l'esponente cinetico.

Il valore di n fornisce informazioni sulla cinetica di rilascio. Per $n > 0.5$ si ha una diffusione di tipo anomalo; per $n < 0.5$ si ha una diffusione normale; per $n = 1$ si ha una cinetica di ordine zero.

8.4 Idrogel polisaccaridici nel rilascio modificato di farmaci

I polisaccaridi sono una classe di composti molto utilizzata nella realizzazione di *Drug Delivery Systems* poiché sono polimeri molto diffusi, poco costosi e disponibili in una variabilità di strutture e forme con diverse proprietà. Un'importante caratteristica è quella di poter essere facilmente modificati attraverso metodi chimici e biochimici, di essere altamente stabili, atossici, biodegradabili, idrofili e in grado di formare idrogel.

La degradazione dei polisaccaridi naturali avviene nel colon ad opera di enzimi microbici (come ad esempio destranasi, amilasi, pectinasi etc.). Tutte queste caratteristiche rendono i polisaccaridi ideali come base per lo sviluppo di sistemi a rilascio controllato¹². Uno dei maggiori problemi legati all'utilizzo di queste molecole è la loro elevata solubilità in acqua che può, però, essere modificata mantenendo inalterata la biodegradabilità.

Numerosi sono i polisaccaridi di origine naturale testati come prototipo nei sistemi a rilascio modificato. Gli esempi più significativi sono rappresentati dal chitosano^{13,14,15}, dall'acido ialuronico^{16,17,18}, dalle ciclodestrine, le pectine, l'inulina, l'amilosio, la gomma guar^{19,20}, il destrano^{21,22,23} e la cellulosa^{24,25,26,27}

Bibliografia

- ¹ L. Brannon-Peppas, R.S. Harland. Absorbent polymer technology, in “Studies in polymer Science”, Vol. 8 pp. 278. Elsevier Science Pub., Amsterdam, New York, USA (1990); Peppas N.A., Mikos A.G. *Hydrogel Med. Pharm.* 1, 1 (1986).
- ³ W.E. Hennink, C.F. van Nostrum. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 13–36.
- ⁴ Allan S. Hoffman. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43 (2002) 3–12
- ⁵ N.A. Peppas, R. Langer, New challenges in biomaterials. *Science*. 1994, 263, 1715.
- ⁶ N.A. Peppas, B.D. Barr-Howell. Characterization of the cross-linked structure of hydrogels, in “*Hydrogels in Medicine and Pharmacy*” Vol. 1, pp. 27 Boca Raton, *CRC Press*; 1986.
- ⁷ P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2002, 7, 569-579.
- ⁸ Jung Ju Kim and Kinam Park. Modulated insulin delivery from glucose-sensitive hydrogel dosage forms. *J. of Control. Rel.*, 77, 1-2 (2001), 39-47
- ⁹ A.M. Lowman, N.A. Peppas. "Hydrogels," *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, pp. 397. Edited. E. Mathiowitz (John Wiley & Sons, 1999).
- ¹⁰ J. Kost, R. Langer, N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Vol III, Properties and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 95-108, (1987).
- ¹¹ J.S. Gutowska, I.C. Bark, J. Knon, Y.H. Bae, Y. Cha, S.W. Kim, *J. Control. Release*. 1997, 48, 141-148.
- ¹² Th. F. Vandamme, A. Lenourry, C. Charrueau, J-C. Chaumeil. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polym. Review*, 48 (2002), 219-231
- ¹³ T. Mitsumata, Y. Suemitsu, K. Fujiib, T. Fujiic, T.Taniguchi, K. Koyama. pH-response of chitosan, k-carrageenan, carboxymethyl cellulose sodium salt complex hydrogels. *Polymer* 44 (2003) 7103–7111
- ¹⁴ J. Murata, Y. Ohya, T. Ouchi. Possibility of application of quaternary chitosan having pendant galactose residues as gene delivery tool. *Carbohydrate Polym.*, Vol. 29, No. 1, pp. 69-74, 1996
- ¹⁵ V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. of Pharm. Review*. 274 (2004) 1–33

-
- ¹⁶ T. Ito, Y. Yeo, C. B. Highley, E. Bellas, C. A. Benitez, D. S. Kohane. The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives. *Biomaterials* 28 (2007) 975–983
- ¹⁷ K. Surendrakumar, G.P. Martyn, E.C.M. Hodgers, M. Jansen, J.A. Blair. Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based dry powder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs. *Journal of Controlled Release* 91 (2003) 385–394
- ¹⁸ R. Tomer, D. Dimitrijevic, A. T. Florence. Electrically controlled release of macromolecules from cross-linked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Controlled Release* 33, (1995) 405-413
- ¹⁹ H.L. Bhalla, A.A. Shah, *Ind. Drugs*. 1991, 28, 420-422.
- ²⁰ N.K. Jain, K. Kulkarni, N. Talwar, *Pharmazie*. 1992, 47, 277-278.
- ²¹ L. Hovgaard, H.J. Bronsted, *Control. Release*. 1995, 36, 159-166.
- ²² H.C. Chiu, A.T. Wu, Y.F. Lin, *Polyme.*, 2001, 42, 1471-1479.
- ²³ S.H. Kim, C.Y. Won, C.C. Chu, *J. Biomed. Mater. Res*. 1999, 46, 160-170.
- ²⁴ A. Sannino, P.A. Netti, G. Mensitieri, L. Nicolais. Designing microporous macromolecular hydrogels for biomedical applications: a comparison between two techniques. *Composites Science and Technology* 63 (2003) 2411–2416.
- ²⁵ T. Mitsumata, Y. Suemitsu, K. Fujii, T. Fujii, T. Taniguchi, K. Koyama. pH-response of chitosan, k-carrageenan, carboxymethyl cellulose sodium salt complex hydrogels. *Polymer* 44 (2003) 7103–7111
- ²⁶ M.A. Attia, I. El-Gibaly, S.E. Shaltout, G.N. Fetih. Transbuccal permeation, anti-inflammatory activity and clinical efficacy of piroxicam formulated in different gels. *Int. J. of Pharm.* 276 (2004) 11–28
- ²⁷ A. Sannino, M. Madaghiele, M. G. Lionetto, T. Schettino, A. Maffezzoli. A Cellulose-Based Hydrogel as a Potential Bulking Agent for Hypocaloric Diets: An In Vitro Biocompatibility Study on Rat Intestine. *J. of Appl. Polym. Sci.*, Vol. 102, 1524–1530 (2006)

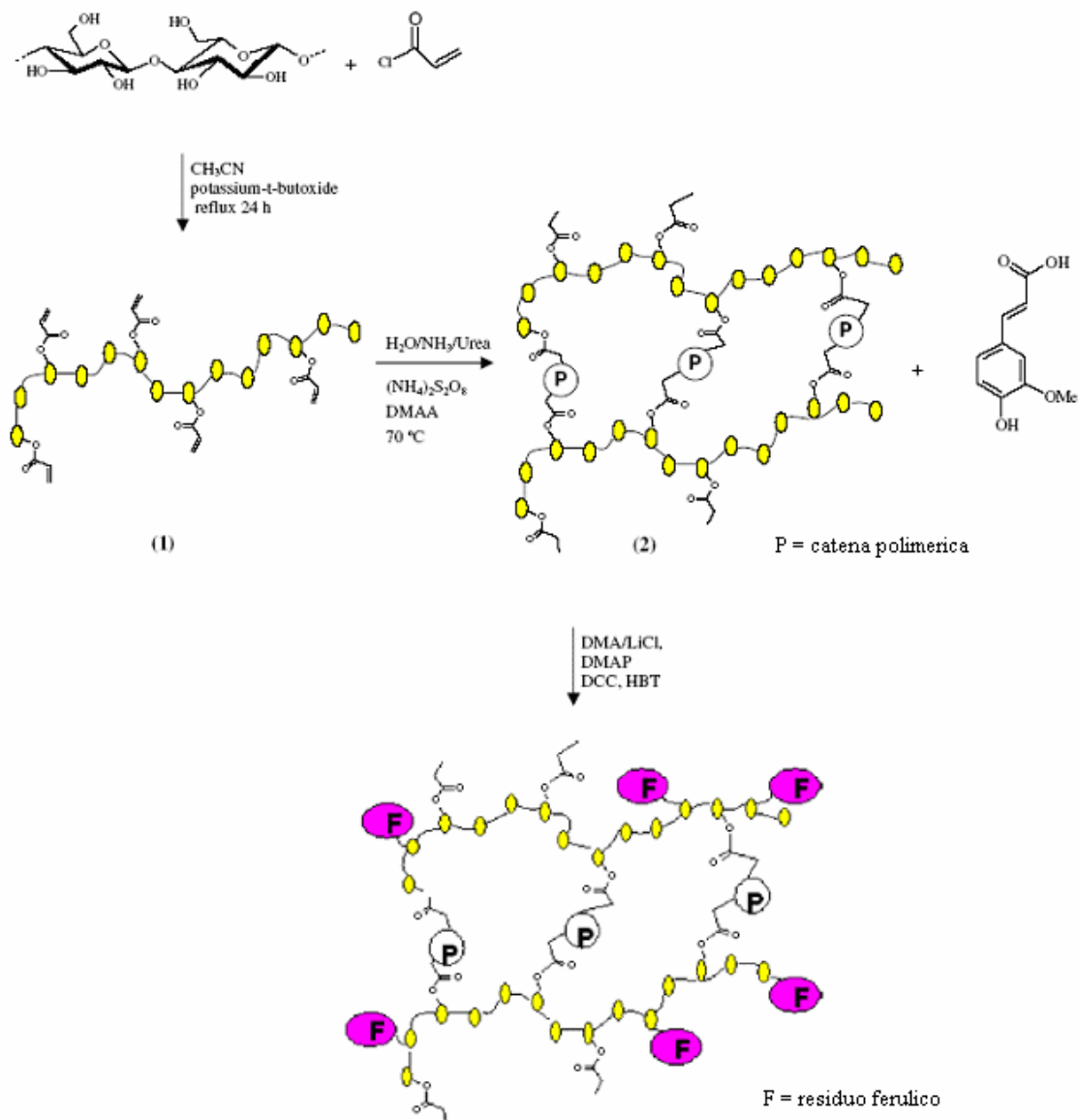
Capitolo 9

Idrogel cellulosici con attività antiossidante

Introduzione

Come precedentemente discusso, gli idrogel sono molto studiati quali matrici per il rilascio controllato di molecole bioattive. Anche i polisaccaridi naturali come alginato, chiosano, destano ecc., sono utilizzati per realizzare idrogel^{1,2} poiché sono materiali non tossici, biocompatibili e biodegradabili. Recentemente, sono stati realizzati idrogel con derivati commerciali della cellulosa che, svolgendo un'azione di riempimento dello stomaco, possono essere utilizzati nella diete ipocaloriche per la cura dell'obesità³.

Nell'ultimo decennio, molti ricercatori hanno focalizzato l'attenzione sull'applicazione di antiossidanti^{4,5,6,7} e di polimeri antiossidanti, sia in campo farmaceutico che cosmetico. Ad esempio, sono stati realizzati idrogel con proprietà antiossidanti e *scavenger* di radicali liberi a base di monomeri acrilici o vinilici che contengono gruppi di vitamina E^{8,9} e monomeri vinilici di Eugenolo¹⁰. Inoltre, precedentemente abbiamo sintetizzato sistemi polimerici a base di cellulosa contenente residui ferulici, lipoici e α -tocoferulici che mostrano una buona attività antiossidante¹¹. Da questo nasce l'idea di ancorare, mediante legame covalente, residui ferulici su un idrogel a base di cellula, per realizzare un *carrier* capace di proteggere farmaci instabili da utilizzare in formulazioni per uso topico e somministrazione orale (schema 9.1).



Schema 9.1. Sintesi dell'idrogel ferulato

In questo capitolo si riporta:

- ☞ la sintesi di sei idrogel a base di cellulosa, mediante copolimerizzazione radicalica dell'acrilcellulosa (AcrC) con N,N'-dimetilacrilammide (DMAA);
- ☞ la caratterizzazione degli idrogel mediante misure di rigonfiamento (*equilibrium swelling degree %*, α) a vari valori di pH;

- la reazione di ancoraggio (*grafting*) dell'acido *trans*-ferulico sull'idrogel che ha mostrato migliore grado di rigonfiamento α ;
- la valutazione della sua attività antiossidante mediante misura dell'inibizione della perossidazione lipidica nelle membrane microsomiali di fegato di ratto¹²;
- la valutazione del suo effetto *scavenging* sul radicale stabile 1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH).

9.1 Sintesi dell'acrilcellulosa (AcrC) (1)

Il monomero AcrC è stato ottenuto mediante una sintesi eterogenea¹³ con acriloilcloruro. La cellulosa microcristallina è stata posta a rigonfiare in acetonitrile a temperatura ambiente per 1 h; successivamente, è stata aggiunta una soluzione di *ter*-butossido di potassio in acetonitrile, mantenendo la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per 4h. Un eccesso di acriloilcloruro in acetonitrile si aggiunge goccia a goccia e si lascia la miscela a reflusso per 24h. Il prodotto ottenuto è stato filtrato e lavato abbondantemente con acqua, etanolo, acetone ed etere etilico, poi essiccato a 50°C a pressione ridotta. L'analisi FT-IR conferma il legame estereo del derivato acrilico con l'assorbimento a 1721 cm⁻¹ e la presenza dei gruppi vinilici a 805 cm⁻¹.

Variando il rapporto molare tra i reagenti ed il tempo di reazione (tabella 9.1), sono stati ottenuti due derivati con differente grado di sostituzione (DS, analisi in triplicato), calcolato mediante analisi volumetrica¹⁴.

Tabella 9.1. Condizioni di reazione e grado di sostituzione (DS)

Rapporto molare Cellulosa/ <i>t</i> -butossido/Acrloilcloruro	Tempo reazione (h)	DS
1:3:3	8	0.28±0.06
1:3:10	20	0.68±0.07

9.2 Sintesi degli idrogel cellulosici (2)

Gli idrogel sono stati preparati mediante polimerizzazione radicalica del derivato AcrC con DMAA (schema 9.1). Il monomero di cellulosa è stato posto a rigonfiare in un sistema acquoso di NH₃ (30%)/Urea (12%), per 10 minuti sotto

agitazione raffreddando a -5°C . Successivamente, è stato aggiunto il comonomero DMAA e l'iniziatore radicalico persolfato di ammonio, riscaldando la miscela a 70°C per pochi minuti, fino a quando la miscela gelifica e si ha la formazione del reticolo. Quindi, gli idrogel formati sono stati lavati rigonfiandoli in diverse aliquote di acqua calda (50°C) sotto agitazione, poi rilavati con acetone in cui si "sgonfiano", ed, infine, essiccati a 50°C sotto vuoto.

La caratterizzazione mediante spettroscopia FT-IR conferma l'avvenuta copolimerizzazione, poiché si osserva una diminuzione dell'intensità del picco a 805 cm^{-1} caratteristico del doppio legame, e la comparsa di una nuova banda a 1732 cm^{-1} del legame estereo dovuto alla formazione dell'idrogel tra AcrC e DMAA.

La reazione di co-polimerizzazione è stata condotta anche utilizzando il sistema solvente N,N-dimetilacetammide e Cloruro di litio (DMA/LiCl), ottenendo idrogel con un basso grado di rigonfiamento α .

9.3 Studio di rigonfiamento degli idrogel cellulosici

L'idrofilia degli idrogel si determina mediante la misura di *swelling*.

Aliquote di 40-50 mg di drogel secco sono state poste in un filtro di vetro con setto poroso da 5 ml (\varnothing 10 mm; porosità G3), preventivamente pesato. Il filtro, contenente l'idrogel, è stato immerso in un beaker contenente il fluido rigonfiante (soluzione acida a pH 1, simulante del fluido gastrico; tampone fosfato a pH 6.8, simulante del fluido intercellulare; soluzione basica a pH 8, simulante il fluido intestinale) e lasciato a rigonfiare. Dopo determinati periodi di tempo (1, 4 e 24 h) l'eccesso di acqua è stato rimosso per percolazione e il filtro è stato centrifugato a 3500 rpm per 15 min e pesato. Successivamente, è stata determinata la tara del filtro bagnato. Dalla media dei pesi registrati ai diversi tempi si calcola il grado di rigonfiamento all'equilibrio (α %) (equazione 9.1):

$$\alpha(\%) = \frac{(W_s - W_d)}{W_d} \cdot 100$$

equazione 9.1

Ws: peso dell'idrogel rigonfio; Wd: peso dell'idrogel sgonfio

Le quantità del monomero e dell'agente reticolante utilizzate per la preparazione degli idrogel ed i relativi valori di α % sono riportati nelle tabelle 9.2 e 9.3.

Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati presentano un errore standard di $\pm 4\%$.

Tabella 9.2. Grado di rigonfiamento all'equilibrio % degli idrogel preparati da AcrC con DS = 0.28

Rapporto molare AcrC/DMAA	Grado di rigonfiamento all'equilibrio α %		
	pH 1	pH 6.8	pH 8
1:3 ^a	-	-	-
1:6	706	533	778
1:9	759	772	891

^a Non si forma l'idrogel

Tabella 9.3. Grado di rigonfiamento all'equilibrio % degli idrogel preparati da AcrC con DS = 0.68

Rapporto molare AcrC/DMAA	Grado di rigonfiamento all'equilibrio α %		
	pH 1	pH 6.8	pH 8
1:3	364	266	570
1:6	680	557	646
1:9	652	562	700

Dai valori di α ottenuti si evince tutti i materiali sintetizzati mostrano ottime caratteristiche di idrogel. In generale, non si evidenziano sostanziali differenze di *swelling* ai vari valori di pH, mentre sono evidenti vari comportamenti di *swelling* in funzione del DS del macromonomero AcrC e della quantità di co-monomero DMAA utilizzato. In particolare, gli idrogel sintetizzati con AcrC a più alto DS mostrano valori di α più bassi, dovuti alla formazione di una rete polimerica a maggiore densità. A parità di DS, utilizzando grandi quantità di co-monomero aumenta la lunghezza dei segmenti dell'omopolimero poli-DMAA, formando una rete polimerica con minore densità capace di rigonfiarsi maggiormente (valori di α più alti).

9.4 Sintesi dell'idrogel cellulosico contenente acido *trans*-ferulico

L'inserimento del gruppo antiossidante è stato condotto sull'idrogel già formato piuttosto che su un suo precursore, per evitare che l'azione *scavenging* sui radicali liberi dell'acido *trans*-ferulico potesse inibire il processo di polimerizzazione radicalica.

La reazione di *grafting* dell'acido ferulico FA (schema 9.1) è stata condotta sull'idrogel che ha mostrato il maggior grado di rigonfiamento α , sintetizzato da AcrC (DS 0.28)/DMAA con un rapporto molare 1:9.

0.4 g di idrogel secco (corrispondenti a 3.3 mmol di gruppi OH liberi) sono stati posti a rigonfiare nel sistema solvente DMA/LiCl a 130°C per 2 h. Alla miscela, mantenuta sotto agitazione e raffreddata a temperatura ambiente, è stata aggiunta una quantità catalitica di N,N-dimetilamminopiridina, un eccesso di FA e i due agenti condensanti dicicloesilcarbodiimide (DCC) e 4-idrossibenzotriazolo (HBT). Il sistema è stato riscaldato a 100°C per 4 h e lasciato poi a raffreddare a temperatura ambiente per tutta la notte. Il solido ottenuto è stato lavato con acqua, metanolo, tetraidrofurano ed acetone per rimuovere i sottoprodotti di reazione come dicicloesilurea e acido ferulico non reagito. Infine, il prodotto è stato essiccato sotto vuoto a 50°C e caratterizzato mediante spettroscopia FT-IR che ha confermato la formazione del nuovo legame estereo con il picco a 1698 cm⁻¹.

9.5 Determinazione del contenuto dei residui ferulici nell'idrogel ferulato

Il grado di sostituzione dei residui ferulici è stato determinato mediante il metodo di Folin-Ciocolteu^{15,16,17}, un saggio colorimetrico che si basa sulla riduzione dei metalli, presenti nel reagente, da parte dell'OH fenolico, con formazione di una soluzione di colore azzurro-blu che viene analizzata allo spettrofotometro UV-Vis a 725 nm.

La figura 9.1 mostra la retta di calibrazione utilizzata per determinare il valore del grado di sostituzione del residuo ferulico sull'idrogel. La retta è stata ottenuta utilizzando sei soluzioni di acido *trans*-ferulico nel range che va da 1.68x10⁻⁵ a 2.81x10⁻⁵ mol/l. Il risultato del saggio colorimetrico ha fornito un valore di 2.36x10⁻⁵ moli di residui ferulici per grammi di idrogel.

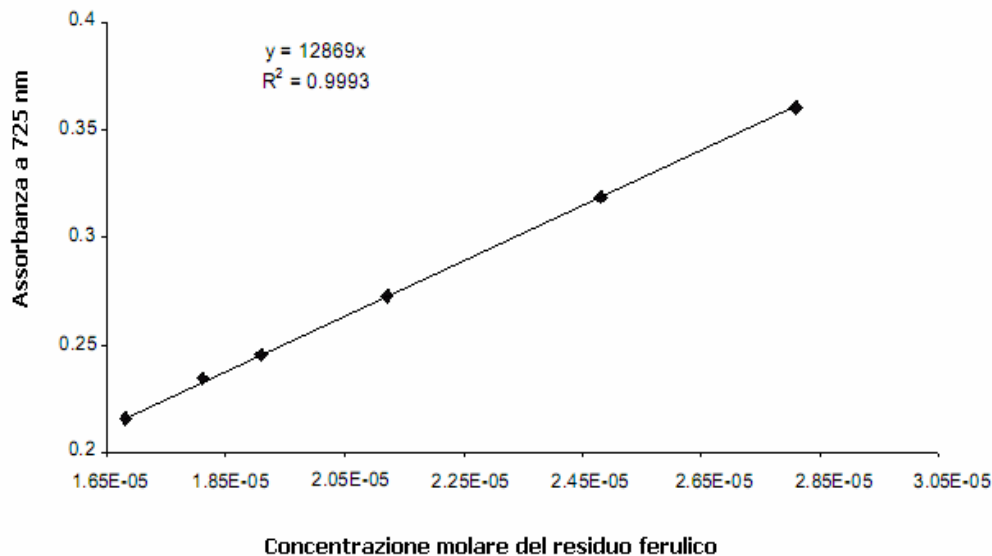


Fig. 9.1. Retta di calibrazione dell'acido *trans*-ferulico

9.6 Attività scavenging dell'idrogel ferulico

È stata valutata la capacità dell'idrogel ferulico sintetizzato di agire come *scavenger* dei radicali liberi, utilizzando il metodo di Wang¹⁸ che prevede la reazione con il radicale stabile DPPH. Questo radicale agisce estraendo il protone fenolico dalla porzione ferulica¹⁹, riducendosi alla forma DPPH-H di colore giallo che si saggia mediante spettrofotometria.

Diverse quantità di idrogel ferulico (2, 10, 20 e 40 mg/ml) sono state aggiunte ad una soluzione etanolica 1.1×10^{-4} M del radicale DPPH. Le miscele sono state agitate vigorosamente e lasciate a reagire al buio per 30 minuti. Quindi, è stata misurata l'assorbanza di ogni soluzione mediante spettrofotometro UV-Vis a 516 nm contro un bianco che non conteneva il DPPH. Ogni misura è stata eseguita in triplicato ed è stata calcolata la media. La figura 9.2 mette in relazione la % di inibizione del DPPH in funzione della concentrazione di idrogel ferulico e mostra l'ottima efficienza *scavenger* dell'idrogel sintetizzato.

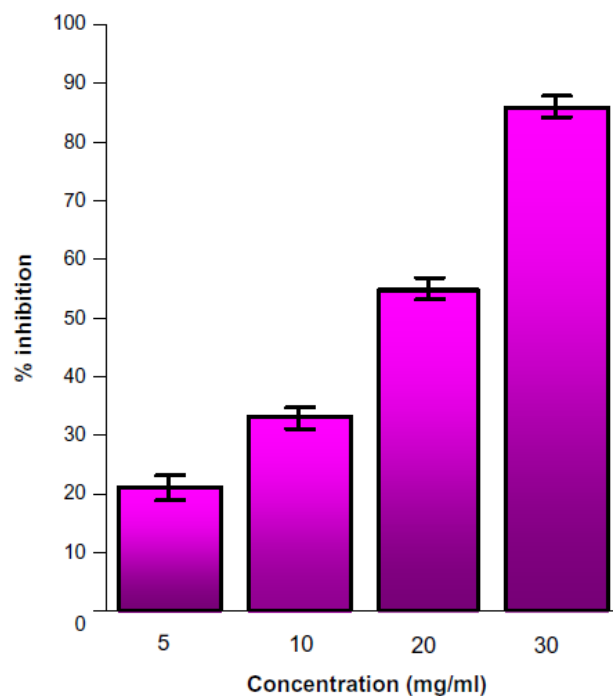


Fig. 9.2. Effetto *scavenging* dell'idrogel ferulato sul radicale libero DPPH. I risultati rappresentano il valore medio \pm l'errore standard di tre esperimenti eseguiti separatamente.

9.7 Proprietà antiossidante dell'idrogel ferulico

Come per i derivati cellulósici antiossidanti descritti precedentemente nel capitolo 7¹¹, è stata valutata l'attività antiossidante dell'idrogel ferulico nell'inibire la perossidazione lipidica nelle membrane microsomiali di fegato di ratto²⁰.

Sono state utilizzate due diverse sorgenti di radicali liberi (25×10^{-3} M di AAPH e 0.25×10^{-3} M di *ter*-BOOH a 37°C) per indurre *in vitro* la perossidazione lipidica, per un tempo totale di incubazione di 120 min. Lo stesso esperimento effettuato sull'idrogel ferulico a base di cellulosa è stato condotto, per confronto, sull'idrogel non derivatizzato, il quale non ha mostrato attività antiossidante, e sull'acido *trans*-ferulico commerciale.

Nella figura 9.3 sono riportati in grafico gli effetti dell'idrogel ferulico sulla perossidazione lipidica indotta *in vitro*, espressa come formazione di

malondialdeide (MDA nmol/mg di proteine) in funzione del tempo di incubazione. I risultati rappresentano la media di sei esperimenti eseguiti separatamente.

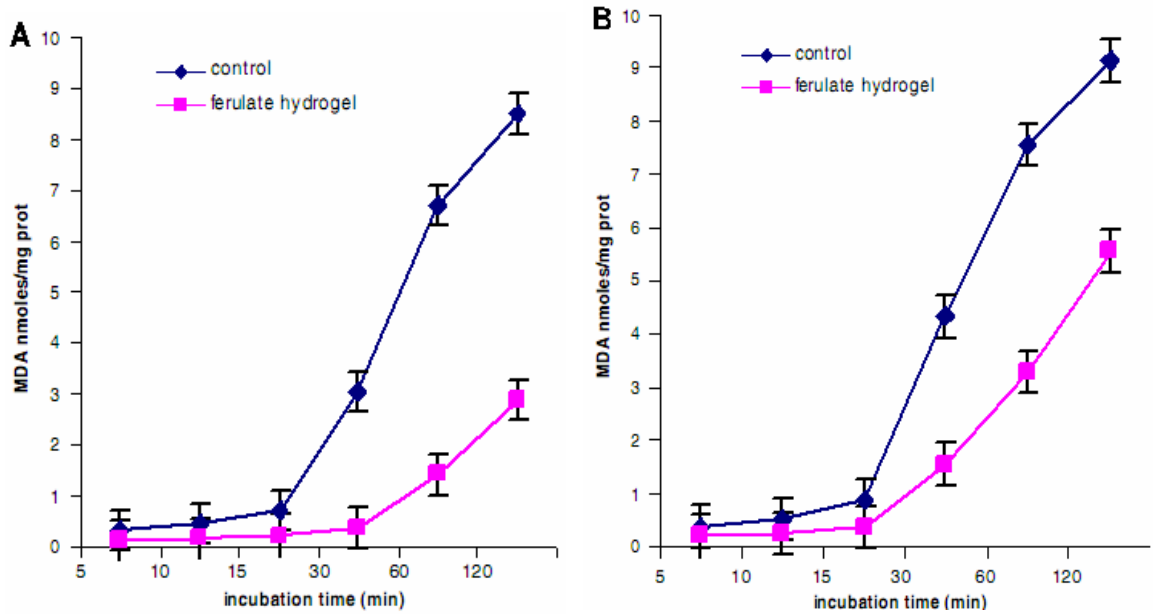


Fig. 9.3. Effetto dell'idrogel ferulico sulla produzione di MDA indotta da (A) *ter*-BOOH e (B) AAPH

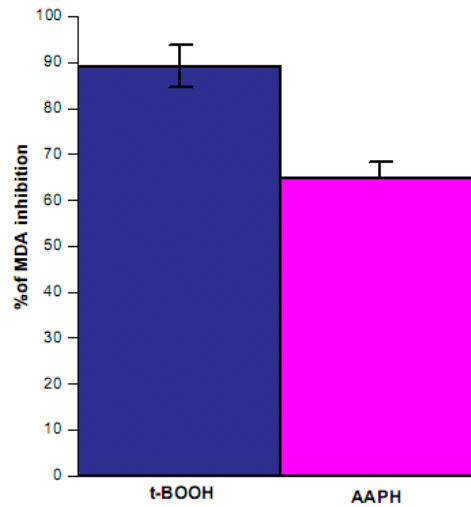


Fig. 9.4. Inibizione della formazione di MDA indotta da *ter*-BOOH e AAPH in presenza dell'idrogel ferulato nelle membrane microsomiali di fegato di ratto.

Dai risultati ottenuti risulta che l'idrogel ferulico ha una maggiore azione antiossidante nel proteggere le membrane dal proossidante *ter*-BOOH che dall'AAPH (figura 9.4). Inoltre, in entrambi i casi l'idrogel mostra una massima efficienza a 30 minuti di incubazione e preserva la sua attività antiossidante fino a 2 h, confermando i risultati ottenuti precedentemente¹¹ (capitolo 7).

9.8 Conclusioni

L'idrogel con proprietà antiossidanti a base di cellulosa è stato preparato introducendo residui ferulici sulla catena polimerica della cellulosa, mediante legame covalente.

Per una valutazione completa delle sue proprietà antiossidanti, sono stati eseguiti su questo biomateriale due test: uno utilizzando il radicale stabile DPPH, che permette di testare l'azione diretta di *scavenger* sui radicali liberi, ed il secondo inducendo *in vitro* la perossidazione lipidica delle membrane microsomiali, che permette di saggiare l'attività antiossidante. I risultati suggeriscono che il materiale ferulato possiede un'eccellente attività *scavenger* e antiossidante e potrebbe essere utilizzato come *carrier* capace di proteggere, trasportare e rilasciare farmaci instabili all'esposizione prolungata di aria e luce. Inoltre, questo idrogel può trovare applicazione come profarmaco dell'acido trans-ferulico, permettendone il rilascio mediante una specifica esterasi. Questo biopolimero potrebbe, quindi, essere utilizzato in campo farmaceutico e cosmetico e ridurre sostanzialmente il danno ossidativo causato dalla formazione di radicali liberi.

Bibliografia

- ¹ Jung, B. O., Chung, S. J., & Lee, S. B. (2006). Preparation and characterization of eugenol-grafted chitosan hydrogels and their antioxidant activities. *J. Appl. Pol. Sci.*, 99, 3500–3506.
- ² Wang, W., Liu, X., Xie, Y., Zhang, H., Yu, W., & Xiong, Y. , et al. (2006). Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J. Materials Chem.*, 16, 3252–3267.
- ³ Sannino, A., Madaghiele, M., Lionetto, M. G., Schettino, T., & Maffezzoli, A. (2006). A cellulose-based hydrogel as a potential bulking agent for hypocaloric diets: An in vitro biocompatibility study on rat intestine. *J. Appl. Polym. Sci.*, 102, 1524–1530.
- ⁴ Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- ⁵ McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1034–1053.
- ⁶ Pinchuk, I., & Lichtemberg, D. (2002). The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progress in Lipid Research*, 41, 279–319.
- ⁷ Steinbrecher, U. P. (1999). Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1436, 279–298.
- ⁸ Ortiz, C., Vázquez, B., & San Román, J. (1998). Synthesis, characterization and properties of polyacrylic systems derived from vitamin E. *Polymer*, 39, 4107–4114.
- ⁹ Plasencia, M. A., Ortiz, C., Vázquez, B., San Román, J., López-Bravo, A., & López-Alonso, A. (1999). Resorbable polyacrylic hydrogels derived from vitamin E and their application in the healing of tendons. *J. Mat. Sci. Mat. in Medicine*, 10, 641–648.
- ¹⁰ Jung, B. O., Chung, S. J., & Lee, S. B. (2006). Preparation and characterization of eugenol-grafted chitosan hydrogels and their antioxidant activities. *J. Appl. Pol. Sci.*, 99, 3500–3506.
- ¹¹ Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Leta, S., & Puoci, F., et al. (2008). Design and synthesis of cellulose derivatives with antioxidant activity. *Macromol. Biosci.*, 8, 86–95.
- ¹² Trombino, S., Serini, S., Di Nicuolo, F., Celleno, L., Andò, S., & Picci, N., et al. (2004). Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: Synergistic interactions with alpha-tocopherol, beta-carotene, and ascorbic acid. *J. Agric. and Food Chem.*, 52, 2411–2420.

-
- ¹³ Bojanic, V., Jovanovic, S., Tabakovic, R., & Tabakovic, I. (1996). Synthesis and electrochemistry of grafted copolymers of cellulose with 4-vinylpyridine, 1-vinylimidazole, 1-vinyl-2-pyrrolidinone, and 9-vinylcarbazole. *J. of Appl. Polym. Sci.*, 60, 1719–1725
- ¹⁴ R. Cassano, S. Trombino, E. Bloise, R. Muzzalupo, F. Iemma, G. Chidichimo, N. Picci. (2007). New broom fibers (*Spartium junceum* L.) derivatives: Preparation and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (23) 9489-9495
- ¹⁵ Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- ¹⁶ Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., & Zubí k, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. *J. Agric. and Food Chem.*, 46, 3630–3634
- ¹⁷ Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relations to wine aging. *American J. Enology and Viticulture*, 25, 119–126.
- ¹⁸ Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., La Voie, E. J., & Huang, C.-T. H. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4869–4873.
- ¹⁹ Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25–30.
- ²⁰ Trombino, S., Serini, S., Di Nicuolo, F., Celleno, L., Andò, S., & Picci, N., et al. (2004). Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: Synergistic interactions with alpha-tocopherol, beta-carotene, and ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2411–2420.

ALLEGATO A al Verbale del collegio di dottorato di ricerca in Metodologie per lo Sviluppo di Molecole di Interesse Farmacologico del 07 Ottobre 2008

Relazione del collegio dei docenti sull'attività svolta durante il corso dal dottorando BLOISE Ermelinda

Il Collegio dei Docenti ha valutato l'attività di ricerca della candidata che si è sviluppata nel campo POLIMERI NATURALI DA UTILIZZARE IN CAMPO FARMACEUTICO, e ha preso in esame i risultati conseguiti, riportati in n° 4 lavori a stampa o in corso di stampa su riviste internazionali con referee a buon IF, n° 3 comunicazioni in congressi internazionali e n° 1 comunicazioni in congressi nazionali.

Il Collegio ha inoltre valutato:

- l'attività svolta dalla candidata durante il periodo di stage condotto presso la PR Chimica s.r.l. (Galatina -Lecce) dal FEBBRAIO al OTTOBRE 2007.
- l'attività formativa della candidata che si è realizzata attraverso la partecipazione al 6° Corso della Scuola Dottorale per la Formazione Avanzata in Discipline Tecnologico-Farmaceutiche, Rende (CS), 09-15 Settembre 2006.
- l'attività formativa della candidata che si è realizzata a seguito della assidua frequenza all'attività didattica proposta dal Collegio.

Con riferimento a quanto sopra richiamato, il Collegio dei Docenti del corso di Dottorato di Ricerca in *Metodologie per lo Sviluppo di Molecole di Interesse Farmacologico*, giudica l'attività della Dr.ssa Ermelinda Bloise positiva e la presenta con soddisfazione al giudizio della Commissione.



Il Presidente e Segretario Verbalizzante

Prof. Bartolo Gabriele