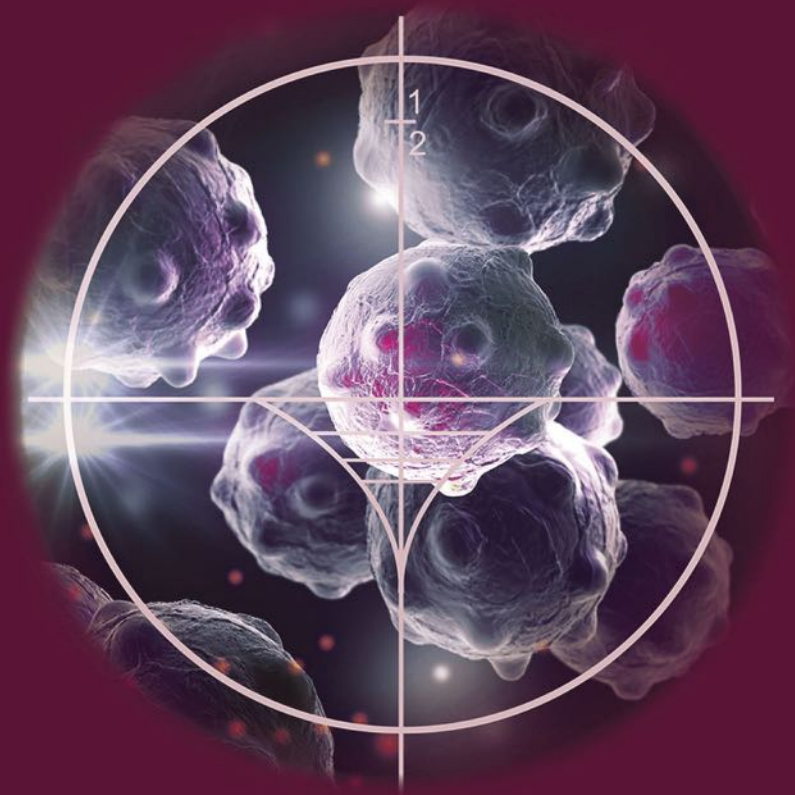


ANNO XCVIII N°3 - MAGGIO/GIUGNO 2016

# La Chimica e l'Industria

 **Organo Ufficiale della Società Chimica Italiana**



## CENTRO!

L'INDIRIZZAMENTO SELETTIVO DI FARMACI NELL'ORGANISMO  
CIRCOSCRIVE L'EFFETTO BIOLOGICO A UN DETERMINATO TIPO DI CELLULE

Poste Italiane S.p.A. Spedizione in abbonamento postale D.L. 353/03 (con. in L. 27/02/2004 n°46) art. 1 comma 1 Roma Aut. C/PM/13/2014 - ISSN 0009-4315



EDITO DA  
CONSIGLIO NAZIONALE DEI CHIMICI



# Bonifiche dei Siti Contaminati e Riqualficazione del Territorio

# REM TECH

## 21 - 22 - 23

## settembre 2016



RemTech, che giunge quest'anno alla **decima edizione**, è l'evento italiano più specializzato sulle bonifiche dei siti contaminati, la protezione e la riqualficazione del territorio.

La community cui si rivolge comprende società private, enti pubblici, università e centri di ricerca, associazioni, professionisti, mondo dell'industria, comparto petrolifero e real estate.

L'area espositiva, altamente accreditata, è affiancata da una sessione congressuale tecnico-scientifica di elevato livello e da corsi di formazione per operatori, autorità e decision maker.

Il programma verte sui temi di maggiore attualità e interesse, e prevede gli **Stati Generali delle Bonifiche**, la Conferenza Nazionale dell'Industria sull'Ambiente e sulle Bonifiche, la **RemTech Europe International Conference** (prima edizione), in collaborazione con la Commissione europea, approfondimenti

tecnici e dibattiti multidisciplinari – a livello nazionale e internazionale – su casi di studio ed esperienze reali, oltre all'assegnazione dei Premi di Laurea Magistrale e di Dottorato, e dei Premi Speciali.

A RemTech partecipano delegazioni straniere, composte da buyer e interlocutori chiave, e interessate ad avviare rapporti di business con gli espositori, mediante B2B esclusivi.

Eventi paralleli: Coast, sulla gestione e la tutela della costa e del mare, Esonda, sul dissesto idrogeologico e il rischio idraulico, e Inertia, sugli appalti verdi e gli aggregati riciclati.



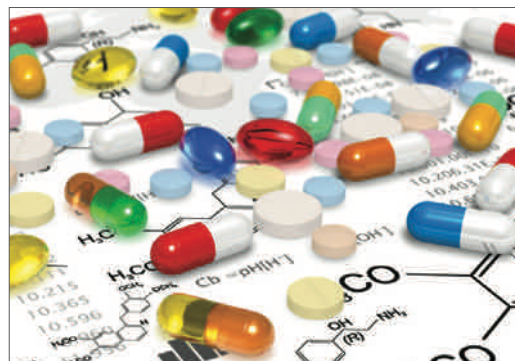
## REGISTRAZIONE ONLINE

[www.remtechexpo.com](http://www.remtechexpo.com) | [info@remtechexpo.com](mailto:info@remtechexpo.com) | 





# ALCUNI NUMERI E ASPETTI CHE CARATTERIZZANO L'INDUSTRIA FARMACEUTICA IN ITALIA



Per valore della produzione e numero di imprese l'industria farmaceutica italiana è la seconda in Europa e la prima per quantità di farmaci e vaccini prodotti per abitante. Rispetto agli altri settori industriali del nostro Paese si caratterizza per un più alto valore aggiunto, considerevoli investimenti, spese più elevate per ricerca, sviluppo e protezione ambientale, per una più rilevante esportazione per addetto e maggiori spese per il personale. Dal 2010 al 2014 il nostro Paese è stato il primo al mondo per crescita in valore dell'export di farmaci e vaccini. In Italia nella produzione di farmaci operano 64 mila addetti, tuttavia, tenendo conto dell'indotto e delle filiera farmaceutica (distribuzione e farmacie), si arriva fino a 224 mila. Le industrie farmaceutiche in Italia che producono materie prime e specialità farmaceutiche sono 304, delle quali 277 sono attive nella produzione di specialità medicinali. Di queste il 40% è composto da aziende italiane e il 60% da aziende straniere, la percentuale più alta fra i settori industriali che operano nel nostro Paese. Le imprese farmaceutiche straniere sono, tra l'altro, le prime per investimenti in Italia. I laureati nell'industria farmaceutica sono il 54% degli addetti, tra laureati e diplomati sono il 90%, le donne sono il 44% e tutte queste percentuali sono superiori agli altri settori industriali presenti nel nostro Paese. Le imprese della farmaceutica nel 2014 hanno investito 1.350 milioni di euro, il 10,7% in più rispetto al 2013. Gli addetti alla ricerca sono 5.950, il 9,5% del totale degli addetti presenti nel nostro Paese. Questi valori sono molto superiori a quelli delle industrie manifatturiere. La farmaceutica rappresenta il 7%

degli investimenti in ricerca in Italia, dove nove imprese su dieci hanno introdotto innovazioni di processo, di prodotto o d'altra natura.

Nel mondo sono presenti 7.000 medicinali in sviluppo, grazie soprattutto ad una migliore comprensione dei meccanismi biologici delle malattie, della genomica e della proteomica.

La biotecnologia gioca un ruolo primario nell'industria farmaceutica e, infatti, le aziende farmaceutiche nel nostro Paese rappresentano il 90% del comparto biotecnologico. Tra i farmaci in commercio quelli ottenuti tramite biotecnologie sono il 20%, tra i nuovi autorizzati sono il 40% e tra quelli in fase di sviluppo sono il 50%.

L'Italia occupa un ruolo importante in questo settore e ci sono 303 farmaci in sviluppo di origine biotech. In Italia ci sono diversi centri di eccellenza sulle biotecnologie, coinvolte, fra le altre attività, nella ricerca nell'area oncologica, delle malattie rare e delle terapie avanzate. Questo ruolo primario dell'Italia nel settore biotecnologico è bene evidenziato dal fatto che il primo farmaco a base di cellule staminali approvato nel mondo è stato sviluppato nel nostro Paese. Tra i farmaci prodotti in Italia, i vaccini, che sono prodotti biologici, e gli emoderivati, che sono farmaci salva vita e servono per integrare componenti mancanti nel sangue, rappresentano un'eccellenza.

Dopo tutti questi dati entusiasmanti non si può fare a meno di ricordare alcuni aspetti negativi: dal 2005 il mercato italiano del farmaco è sceso nel mondo dal quinto al sesto posto e nel 2017 è previsto che scenderà all'ottavo; la scomparsa di molti centri di ricerca di base di un certo rilievo; la promulgazione di leggi restrittive,

rispetto alla legislazione europea, in materia di sperimentazione animale.

Dopo questa carrellata di numeri ed aspetti che caratterizzano l'industria farmaceutica in Italia, di seguito sono riportate le principali tecnologie prioritarie che devono essere sviluppate: la genomica, che include anche l'area della nutrigenetica, che studia i rapporti fra il patrimonio genetico e gli alimenti e il sequenziamento del DNA; la proteomica e la metabolomica, che stanno dando un grande impulso allo sviluppo di tecnologie che permettono lo studio delle proteine e dei metaboliti, senza la necessità di un loro isolamento e purificazione; le nuove tecnologie applicate al *drug discovery*, che servono a dare un contributo all'identificazione e alla caratterizzazione di nuovi prodotti farmaceutici e diagnostici più selettivi ed efficaci; la diagnostica *in vitro*, che consiste nel percorso per lo sviluppo di nuove tecniche non invasive e per la produzione di sistemi che abbassano il limite di rivelabilità e quindi la precocità delle diagnosi; le nanotecnologie, utilizzate anche per la realizzazione di nuove forme farmaceutiche nanostrutturate per farmaci già in uso, ma poco efficaci; la produzione di biomolecole a base di proteine, fondamentali soprattutto nella produzione di anticorpi monoclonali e loro derivati, enzimi e proteine ricombinanti e vaccini ricombinanti; l'*imaging* molecolare, che consente di visualizzare dettagli interni dell'organismo e trarre informazioni su determinate funzioni e processi; infine, i prodotti medicinali per terapie avanzate, ossia farmaci e trattamenti emergenti costituiti da cellule o da acidi nucleici ricombinati ed utilizzati nella ricerca clinica.



# Misura altamente precisa della portata di fluidi anche non conduttivi

**bürkert**  
FLUID CONTROL SYSTEMS

FLOWave è il nuovo sensore di portata di Bürkert, ideato per l'industria farmaceutica, cosmetica e alimentare e delle bevande, con un design compatto e un peso ridotto, che consente ai costruttori e utilizzatori finali un notevole risparmio in termini di spazio, oltre alla facilità di installazione. FLOWave risponde anche alla crescente domanda di un basso consumo energetico, può essere montato in orizzontale o verticale e ha una precisione della misura della portata del 0,4%.

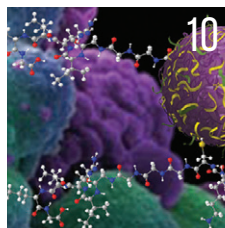
FLOWave non è sensibile alla conducibilità, quindi può essere utilizzato per la misura di fluidi non conduttivi come l'acqua demineralizzata.

Contattateci per ulteriori informazioni.





# SOMMARIO



## 1. EDITORIALE

**ALCUNI NUMERI E ASPETTI CHE CARATTERIZZANO L'INDUSTRIA FARMACEUTICA IN ITALIA**

Ferruccio Trifirò

## 4. CHIMICA &...

**FARMACEUTICA**

**FORMULATING MEDICINES FOR CHILDREN: CHALLENGES AND ISSUES**

Paola D'Andria - Viviana Giannuzzi

Fedele Bonifazi - Adriana Ceci

Nunzio Denora - Cosimo D. Altomare

## 10. BIOCONIUGATI PER IL DELIVERY ATTIVO DI FARMACI

Paolo Caliceti

## 18. SISTEMI TERAPEUTICI MICRO E NANOPARTICELLARI INIETTABILI

Ida Genta - Rossella Dorati

Tiziana Modena - Bice Conti

## 24. LO SVILUPPO DI UN FARMACO PER INALAZIONE

Tomaso Guidi - Francesca Schiaretti

## 28. CHIMICA &...

**ALIMENTAZIONE**

**PUÒ LA DIETA MODIFICARE L'ESPRESSIONE DEL DNA?**

Alessandra Vilmercati - Felicia Carotenuto

Luigi Campanella - Laura Teodori

## 30. CHIMICA &...

**MATERIALI**

**DA PICCOLE MOLECOLE A DERIVATI SOLFORATI E SELENATI AD ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE**

Damiano Tanini - Alessandro Latino

Giulia Barchielli - Antonella Capperucci

## 34. TECNICHE DI LIGHT SCATTERING E TURBIDIMETRIA PER LA CARATTERIZZAZIONE DI BIOMATERIALI: L'ESEMPIO DEI GEL DI FIBRINA

Fabio Ferri - Matteo Molteni

Gabriele Re Calegari - Mattia Rocco

## 40. TECNICHE DI "X-RAY TOTAL SCATTERING" PER LA CARATTERIZZAZIONE DI NANOMATERIALI

Norberto Masciocchi - Federica Bertolotti

Antonietta Guagliardi

## 44. CHIMICA &...

**SICUREZZA**

**ATMOSFERE POTENZIALMENTE ESPLOSIVE: VALUTAZIONE DELLA DISTANZA PERICOLOSA DERIVANTE DA RILASCIO DA ACCOPPIAMENTO FLANGIATO**

Roberto Lauri

## 48. RIVISITANDO

**PROBABILE ORIGINE DELLA VITA DALL'ANIDRIDE FOSFORICA VULCANICA**

Graziano Baccolini

## 54. PAGINE DI STORIA

**UN LEGAME LUNGO UN SECOLO**

Francesco Neve

## 56. UNA LETTERA DI LIEBIG SULL'ISTORIA DELLA CHIMICA

Alberto Ansaloni

## 59. DALLA LETTERATURA

a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

## 61. TECNOLOGIE INNOVATIVE

a cura di Pierfausto Seneci

## 64. LA CHIMICA ALLO SPECCHIO

**LA PICCOLA PRINCIPESSA, ELSEVIER E ACS**

Claudio Della Volpe



**Chimica e Industria**

EDITO DA

CONSIGLIO NAZIONALE DEI CHIMICI

DIRETTORE RESPONSABILE

NAUSICAA ORLANDI

VICE - DIRETTORE

FERRUCCIO TRIFIRÒ

anna.simonini@soc.chim.it

COMITATO DI REDAZIONE

Ferruccio Trifirò (vice-direttore)

Anna Simonini (segreteria di redazione)

Alessandro Abbotto - Nicola Cardellicchio

Martino di Serio - Daniele Donati - Matteo Guidotti

Oreste Piccolo - Giuseppe Sant'Unione

Marco Taddia - Paolo Zanirato - Fiorenza Viani

COMITATO SCIENTIFICO

Alberto Albinati - Angela Agostiano

Luigi Ambrosio - Roberto Ballini

Vincenzo Barone - Luigi Campanella

Girolamo Cirrincione - Silvia Colombo

Salvatore Coluccia - Carlo Giavarini

Gianluca Giorgi - Roberto Gobetto

Benedetta Mennucci - Marco Musiani

Nausicaa Orlandi (Direttore)

Giuseppe Palleschi - Fabrizio Passarini

Michele Pavone - Roberto Purrello

Raffaele Riccio - Silvana Saiello - Giorgio Strukul

Ferruccio Trifirò (vice-direttore)

COMITATO D'ONORE

Sergio Carrà

Alberto Girelli

Italo Pasquon

REDAZIONE SCIENTIFICA

Anna Simonini

Piazzale R. Morandi, 2 - 20121 Milano

tel. +39 345 0478088

anna.simonini@soc.chim.it

PROGETTO GRAFICO

Segni e Suoni srl

IMPAGINAZIONE

Sara Moscardini

STAMPA

Grafica Ripoli snc

CONCESSIONARIA DI PUBBLICITÀ

AGICOM srl

La Chimica e l'Industria è online:

[www.soc.chim.it](http://www.soc.chim.it)

(solo per gli associati e abbonati)

La quota di iscrizione dei singoli iscritti è comprensiva del costo e delle spese di spedizione della rivista in misura pari al 5%.

Una copia: € 8,00. Abbonamento annuo (6 numeri):

Italia € 40,00. Estero: € 80,00

# FORMULATING MEDICINES FOR CHILDREN: CHALLENGES AND ISSUES

The development of child-appropriate drug formulations still represents a challenge. It is clearly important to improve public-private partnerships that progress in creating technological platforms for developing pediatric formulations which allow better drug delivery and decrease of safety risks in child, in line with the guidelines of the regulatory agencies.



Children are commonly considered “therapeutic orphans” because the majority of medicines on the market have not been studied in the pediatric population, nor have been approved by regulatory authorities for use in children. For years, the lack of information on safety, efficacy and dosing of pediatric drugs, as well as the lack of child-appropriate formulations, resulted in the unsatisfactory treatment of pediatric patients [1]. Among others, the lack of children tailored formulations has a huge impact. *Ad hoc* formulations are necessary in order to deliver the right dose also assuring the right level of absorption, plasma concentration, metabolism and drug excretion. It also would remove the need to manipulate medicines, e.g. splitting tablets that are designed for adults into smaller fractions that provide the appropriate dose for children or using untested solutions of the existing forms.

So far, healthcare professionals had no therapeutic alternatives and often use off label medicinal products in children, with the associated risks of inefficacy or increased adverse reactions. This use is particularly high in case of ‘off-patent’ drugs (perhaps as much as 70%) but encompasses innovative drugs as well. The “pediatric off-label use” specifically includes all pediatric uses of a marketed drug not detailed in the *Summary of Product Characteristics*, with particular reference to therapeutic indication, appropriate strength (dosage by age), pharmaceutical form, route of administration. It is a widespread phenomenon in all the countries and in many therapeutic areas [2-4], and it has become an important issue for the safeguard of children’s health.

## Current regulatory status

To fill in the gap, in the past decades, legislative and regulatory acts have been issued to promote the development and availability of medicines for pediatric patients. In particular, in Europe the Regulation on “medicinal products for pediatric use” (EC No. 1901/2006 [5] as amended [6]) has been released with the aim of assuring high quality research for pediatric medicines development, increasing the availability of information on the safe and effective use of medicinal products in the pediatric population, and avoiding unnecessary repetition of studies. According to the Pediatric Regulation, it is mandatory for pharmaceutical companies to prepare and submit a Pediatric Investigation Plan (PIP) to the European Medicine Agency (EMA) - Pediatric Committee (PDCO), when they plan to applying for a new Marketing Authorization (MA) or for any MA variation (including new indications, new pharmaceutical forms and new routes of administration). The introduction of the PIP in the legal European framework aims at ensuring that the pediatric development of any medicinal products becomes an integral part of the development program for adults. Moreover, it aims at ensuring that appropriate pediatric studies are performed to obtain the necessary quality, safety and efficacy data to support the authorization of a medicine for use in children. The absence of an approved PIP in a Marketing Authorization Application (MAA) will result in automatic rejection. A PIP shall specify the timing and the measures proposed to assess the quality, safety and efficacy of the medicinal product in all subsets





of the pediatric population that may be concerned. In addition, it shall describe any measures to adapt the formulation of the medicinal product so as to make its use more acceptable, easier, safer or more effective for different subsets of the pediatric population.

In case of an 'off-patent' drug, this obligation does not apply, but a specific voluntary MA procedure (the 'Pediatric Use Marketing Authorization'-PUMA) is foreseen. The PUMA benefits from 10 years data protection. Applications for PUMAs, which must contain the results from an agreed PIP, can refer to published literature and/or dossier data even if the product is only approved in one or more Member State and not in the whole community.

To increase the interest of Health Authorities, commercial sponsors and other interested parties in developing drugs for children, the EMA has released two important instruments:

- the list of the medicines of Therapeutic Interest for children, divided by therapeutic area, age of children and therapeutic indication;
- the list of 'priority' [7] for developing and funding medicines that are off-patent but that are used off-label in children due to their consolidated use and the recognized therapeutic interest.

Active substance	Therapeutic needs	Priority	PAED. Formulation needed	PK and/or PD needed	Efficacy/Safety needed
Allopurinol	2007			x	x
Amiodarone	2013		x	x	x
Atropin	2006				
Bisacodyl	2007		x		x
Carvediol	2013		x	x	x
Chloralhydrate	2006		x		x
Ciclosporin	2006		x	x	
Diclofenac	2005	x	x	x	x
Flecainide	2013		x	x	x
Hydrochlorothiazide	2014		x	x	x
Hydrocortisone <sup>1</sup>	2006		x	?	
Hydroxychloroquine		x	x	x	
Hydroxyurea			x		
Ibuprofen	2005		x	?	
Indomethacin	2006		x	?	
Isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide		x	x	x	
ketoconazole	2014		x	x	x
Ketoprofene			x		x
Lamotrigine	2007		x	x	x
Lithium	2007		x		x
Low molecular weight heparins	2013		x	x	x
Metoprolol	2013		x	x	x
Nifedipine	2014		x	x	x
Prednisolone	2006		x	?	
Topiramate	2007		x (neonatal seizures)	x	x

<sup>1</sup>A) adrenal insufficiency; B) aphthous ulcers as occurring in colitis ulcerosa

Tab. 1 - Examples of active substances and related pediatric therapeutic need, priority status, studies needed (Source: TEDDY, Recommendation for Drug Development for Children, November 2015)

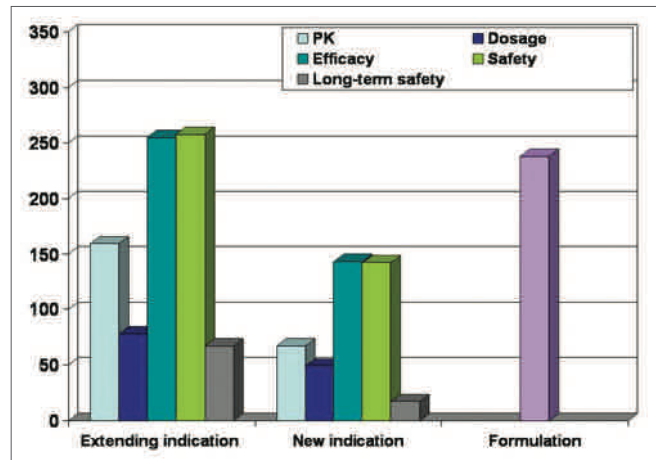


Fig. 1 - Type of study requested for the medicinal products included in the EMA Therapeutic Needs Lists (Source: TEDDY, Recommendation for Drug Development for Children, November 2015)

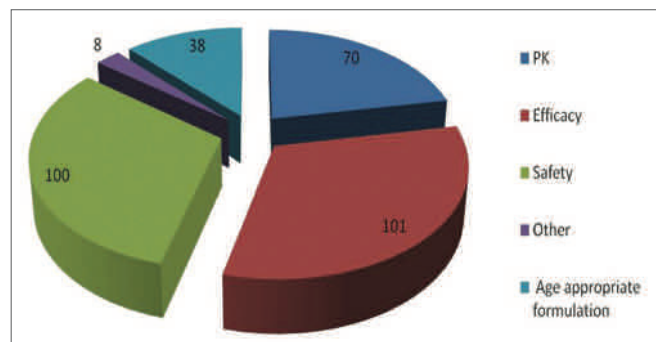


Fig. 2 - Specific needs in terms of study needed to develop the 135 active substances, as derived from Priority Lists (Source: TEDDY, Recommendation for Drug Development for Children, November 2015)

Both the lists, *Therapeutic needs list* and *Priority List*, include details on the existing formulations and on *the need* to identify a new formulation to cover the pediatric gap.

PDCCO set up at EMA, published and periodically updates these lists and for each substance indicates the need in term of studies to be performed in order to develop the pediatric indication and the appropriate pediatric form. Currently more than 400 active substances [8] have been identified in 15 therapeutic areas: anesthesiology, cardiovascular, diabetes (types I and II), endocrinology, gastroenterology, immunology, infectious diseases, nephro-urology, neurology, obstructive lung disease, oncology, ophthalmology, pain, psychiatry, rheumatology. About 1,500 studies are required on a total and 1/4 of this studies corresponds to a new pediatric formulation. In addition, 135 'off-patent' drugs are included in the 'Priority List'. Also for this group of drugs the total request in terms of studies is relevant and includes the provision of 70 new pediatric formulations. Moreover studies to develop 22 off-label drugs have been funded in 20 pediatric research projects by the European Commission [9] and in the context of these projects new age-appropriate formulations or dosage forms are under development. Of these ten are oral new formulations (six liquid, three tablets soluble or effervescent and one granule), seven new intravenous formulations and three intravenous dosage forms.

Tab. 1 provides some examples of active substances mentioned in the lists and the studies required by the PDCO whereas Figs. 1 and 2 show the number and the type of studies globally considered in the Therapeutic Needs and Priority Lists, respectively.

These lists do not mention the type of formulation that could result more appropriate to the specific pediatric use. However, many collaborative proposals are under discussion and this sector seems very promising in the next future both for academia and commercial sponsors. It should be also highlighted that recently the scientific community, and the public and private funding bodies as well, agree on the necessity to undertake a more precise selection of drugs of therapeutic interest to be developed for children. This selection is aimed at focusing scientific and human resources, as well as to assess the added market value for the sponsors of the future marketing authorizations.

### Challenges and issues

The development of appropriate drug formulations for pediatrics still represents a challenge for the pharmaceutical industry. While in this paper only some key issues are discussed, for in-depth discussion on the topic the reader can refer to some recent excellent reviews [10-12].

A suitable formulation for each of the age groups must be optimized taking into account differences in the physiology and anatomy of pediatric populations, hence pharmacodynamics (PD) and pharmacokinetics (PK), as well as issues related to therapy acceptability and handling. Pediatric patients differ from adults and within age groups (i.e., newborns, infants, children, adolescents) with respect to drug action (receptor expression and function), greater regenerative potential and unique disease processes. From the PK point of view, determinants of the type of formulation for children are the differences in the age groups and ability to handle dosage forms. The design of formulations in pediatrics should carefully consider that patients with chronic diseases undergo growth and developmental changes during therapy. In addition, the disease/disorder being treated, genetic makeup and environmental influences must also be carefully considered.

Pediatric patients are dynamic with respect to drug disposition, due to developmental changes in body composition, drug metabolism and organ function.

For instance, infants (1 month-2 years) and children (2-11 years) may absorb, distribute, metabolize and eliminate (ADME parameters) pharmaceutical products with significant differences [13]. Moreover, particular toxicities in the active principle and excipients (see below) can be observed in infants and children. The ability to achieve target ADME parameters is critical. With reference to oral formulations, for example, age-related differences in ADME are very important to optimize drug efficacy and minimize toxicity. Among others, the following factors are worthy of special attention [14]:

- i) gastric pH and gastric emptying time during the neonatal period leading to variation in the absorption of many drugs;

Excipient	Use	Adverse effects
<b>Aspartame</b>	Sweetener (synthetic) in chewable tablets and liquid sugar-free formulations	As a source of phenylalanine, it can be harmful in pediatric patients affected by phenylketonuria; rare hypersensitivity reactions, cross-reactivity with sulfonamides
<b>Benzalkonium chloride</b>	Bactericidal preservative frequently found in beclomethasone and ipratropium bromide nebulizer solutions	Associated with bronchospasm in asthmatic children after inhalation; ocular toxicity in ophthalmic preparations
<b>Benzyl alcohol</b>	Solvent, preservative in several medicinal products and solutions, including dexamethasone, benzodiazepines (midazolam, lorazepam) and multivitamins	Due to accumulation of metabolites in blood and brain, toxicities include metabolic acidosis, neurotoxicity (seizures) and gasping syndrome
<b>Ethanol</b>	Solvent, preservative in oral liquid preparations (e.g. iron, ranitidine, phenobarbital)	CNS depressant; respiratory and cardiovascular adverse reactions at high concentrations
<b>Lactose</b>	Diluent in tablets, capsules, lyophilized powders, sweetener in liquid formulations, carrier in dry powders	Gastrointestinal symptoms and metabolic acidosis in lactose-intolerant subjects
<b>Propylene glycol</b>	Solvent with antimicrobial properties for oral and parenteral use (e.g., diphenhydramine, furosemide, prednisone, pseudoephedrine liquids, lorazepam injection)	High doses have been associated with hyperosmolarity causing laxative effects, metabolic acidosis, cardiovascular, hepatic and respiratory events, and neurotoxic effects in newborns and infants, with severe brain damage and life-long handicaps
<b>Saccharin</b>	Sweetener (synthetic) in both solid and liquid formulations	Cross-reactivity with sulfonamides; main adverse effects are dermatological (e.g., dermatitis, pruritus, photosensitivity) and systemic reactions (e.g., irritability, insomnia).
<b>Sorbitol</b>	Diluent in tablets, plasticizer for gelatin in capsules, vehicle and stabilizer in oral liquid formulations (e.g., diphenhydramine, ferrous sulphate, furosemide, prednisone, pseudoephedrine)	Osmotic diarrhea; contraindicated in pediatric patients with hereditary fructose intolerance and hypoglycemia
<b>Sucrose</b>	Sweetener in many pharmaceutical preparations (above all syrups)	Decrease in dental plaque pH, dissolving tooth enamel and promoting dental caries; contraindicated in pediatric patients with hereditary fructose intolerance and diabetes
<b>Sulfites</b>	Antioxidants	Possibly responsible for appearance of symptoms like dyspnoea and chest tightness in asthmatic children

Tab. 2 - Examples of excipients used in oral formulations, and related toxicity and safety risks in pediatric patients





- ii) differences in the apparent volume of distribution compared to adults and within the age groups of pediatric population;
- iii) slow total drug clearance in premature infants and neonates, due to immature hepatic and renal function;
- iv) under-expression of the hepatic microsomal enzymes, resulting in slower biotransformation of many drugs in premature infants and neonates;
- v) greater microsomal enzyme activity in prepubertal age, which requires higher mg/kg dosage to achieve suitable plasma levels of some drugs.

Besides PK/PD aspects, there are a number of important factors to be considered in developing pediatric drug formulations:

- i) palatability (i.e., good taste and texture) is a major determinant of oral formulations, chewable or dispersible preparations;
- ii) children are often unable to swallow capsules and tablets (until they are at least 6 years old), whereby the need of alternative options to the solid form;
- iii) drug solubility;
- iv) greater dose flexibility (drug dosing requires change as the child grows);
- v) small volumes of parenteral preparations to be administered with small needles [10]. The EMA guidelines suggest the following aspects to be taken into account in designing suitable formulations for pediatric use [15]:
  - the relevant developmental physiology of the patients in the target age group(s);
  - the condition to be treated and the characteristics of the child under pharmacological treatment (e.g., physical and mental disabilities, fluid restriction, co-medication, inability to swallow due to critical illnesses);
  - the critical dose (i.e., steep dose/PD response curve, narrow therapeutic range) and the dosing regimen (i.e., dose calculation, dose titration, dosing flexibility);
  - the age-associated activities of children in the target age group(s) (e.g., school, nursery);
  - the duration of the therapy and the dosing frequency;
  - the environment setting where the pharmaceutical product is likely to be used (e.g., hospital, community);
  - the characteristics and behaviors of the child and caregiver.

Historically, the inadequate appreciation of the developmental changes has led to many adverse outcomes. Examples include infant deaths from choking on albendazole tablets, lethal use of benzyl alcohol or diethylene glycol in sulfanilamide elixirs, electrolyte imbalance caused by high contents of sodium or potassium in parenteral formulations [16-18].

The oral route is the main route of administration in children for long-term treatments, whereas the parenteral route is the main route for neonates and emergency cases [10]. Oral dosage forms include liquid preparations (suspensions, solutions, syrups, drops, powder and granules for reconstitutions) and solid dosage forms (tablets, capsules, sprinklers, multiparticulates, orodispersible/chewable preparations). Parenteral forms includes intravenous, subcutaneous and intramuscular injections, and pump systems. Alternative nonoral routes of administration include rectal, dermal, nasal, pulmonary, and ocular routes. Recommended drug formulations for infants and children are oral solutions, oral suspensions, rapidly dissolving tablets, sprinkles/sachets, transcutaneous delivery systems, implantable reservoirs.

Oral formulations, albeit being pharmaceutical products of choice in pediatrics, have a noteworthy down side [11]. Solutions may contain potentially toxic excipients, whereas suspensions may often result in unequal delivery

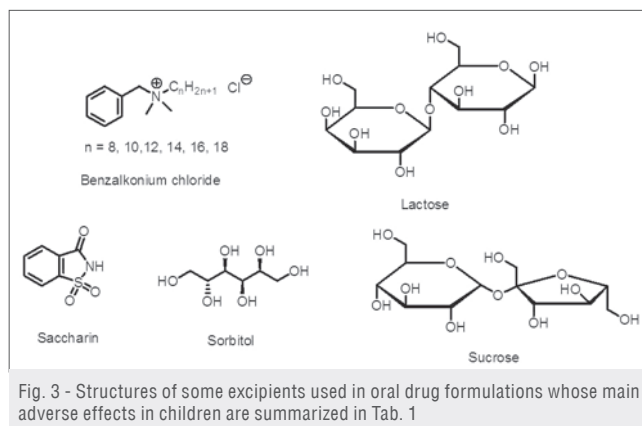


Fig. 3 - Structures of some excipients used in oral drug formulations whose main adverse effects in children are summarized in Tab. 1

over time or be affected by palatability limits, due to taste and consistency. In addition, liquid forms raise issues regarding stability (chemical, physical, or microbiological). Oral solids are associated with the risk of choking or chewing and with limited dose flexibility. Sprinklers and sachets may result in erratic absorption, whereas transcutaneous delivery systems much depend on uniform nature and composition of the coating.

The use of parenteral administration may be hampered by difficult application, local irritation, fluid overload, electrolyte imbalance, or poor drug acceptability. In neonates, intravenous administration may lead to volume overload, whereas measuring small dose volumes may cause large dosage variations and errors.

#### Focus on age-related toxicity of excipients

Excipients have been considered for a long time inert agents and their age-related toxicity largely underestimated [19, 20]. Excipients are used in almost all drugs as diluents, solvents, emulsifiers, glidants, disintegrants, sweeteners, preservatives, stabilizing, flavoring or coloring agents. They confer suitable shape, volume and consistency to the pharmaceutical preparation, allowing the drug to be easily administered and the active substance to be properly delivered to its site of action. A relevant source of information about the excipient-related toxicity and safety risks in pediatric drug formulations is the STEP database [21, 22]. Developed in collaboration by European Pediatric Formulation Initiative (EuPFI) and United States Pediatric Formulation Initiative (USPFI), the STEP database aims at improving systematic data collection on excipient toxicity and tolerance in children. STEP stands for 'Safety and Toxicity of Excipients for Pediatrics'. Accessible via EuPFI website, the STEP database holds general information, clinical and non-clinical data, *in vitro* data, regulatory references and reviews on the safety and toxicity of excipients. Major toxicity issues related to some excipients used in oral pediatric formulations are summarized in Tab. 2 (some structures in Fig. 3).

Aspartame, a synthetic sweetener used in some oral formulations, is a dipeptide of aspartic acid (Asp) and the methyl ester of phenylalanine (Phe). It is metabolized by three major pathways (Fig. 4) in the intestinal lumen and mucosal cells, releasing Asp (an excitotoxin), methanol (a neurotoxin) and Phe in the portal blood [23]. Aspartame, as a source of Phe in blood, should be totally avoided in children affected by phenylketonuria.

Benzyl alcohol (BA) is a solvent with antimicrobial properties. The BA-associated adverse reactions can include metabolic acidosis, CNS and respiratory toxic effects, which led the regulatory agencies to recommend

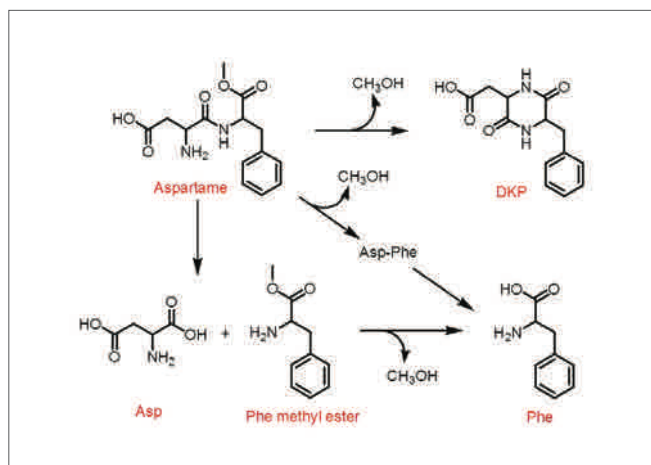


Fig. 4 - Metabolic pathways of the artificial sweetener aspartame. Asp: L-Aspartic acid; Phe: L-Phenylalanine; DKP: Diketopiperazine metabolite

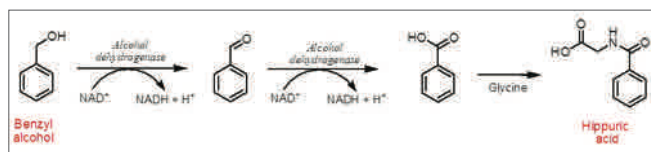


Fig. 5 - Metabolic pathway of benzyl alcohol in adults. The conversion of benzoic acid into hippuric acid decreases in neonates

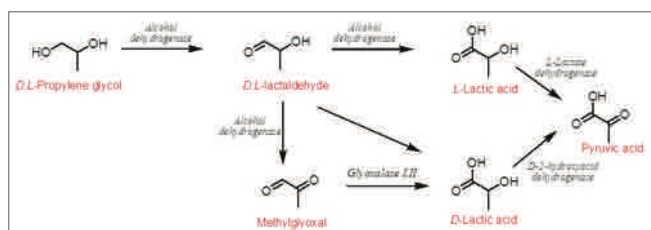


Fig. 6 - Metabolic transformation of propylene glycol into pyruvic acid

its exclusion from formulations for newborns [17, 18]. In adults, BA is metabolized to benzoic acid, followed by the conjugation with glycine to form hippuric acid (Fig. 5) which is excreted in the urine. The conjugation of benzoic acid with Gly is substantially decreased in neonates with rising toxicities [24-26].

Ethanol and propylene glycol (PG) are used as solvents in a variety of pharmaceutical products. Ethanol is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and metabolized to acetaldehyde, which is then oxidized to acetate. PK of ethanol in infants is not well understood. Ethanol is a CNS depressant and can cause respiratory and cardiovascular toxic effects at high concentrations [27, 28]. In OTC products, the maximum concentrations allowed are 0.5% v/v for children younger than 6 years, 5% v/v for 6-12 year of age and 10% v/v for adolescents (>12 years old). PG is metabolized to lactic and pyruvic acid (Fig. 6) and also excreted unchanged in the urine. In neonates PG is more accumulated ( $t_{1/2}$ =16.9 h) than in adults ( $t_{1/2}$ =5 h), thus provoking hyperosmolarity [29], CNS toxicities [30, 31] and other adverse effects. WHO established 25 mg/kg/day as an acceptable intake limit for adults. Acceptable limits in neonates are unknown. However, because of the serious toxicities, products with high levels of PG

must not administered in children <4 year and in pediatric dialysis patients. In Tab. 2 essential information is reported on adverse reactions of some other excipients in oral formulations for pediatric patients, such as the antimicrobial preservative benzalkonium chloride, the antioxidant sulfites, the artificial sweetener saccharin, and the natural sweeteners sucrose, sorbitol and lactose [11].

Cyclodextrins (CDs) are being investigated as excipients to help overcome drug delivery problems in pediatric medicine [32, 33]. CDs (Fig. 7) are cyclic oligosaccharides formed by a number of dextrose units of ( $\alpha$ -1,4)-linked  $\alpha$ -D-glucopyranose. They are characterized by a lipophilic central cavity and a hydrophilic outer surface. The parent CDs are made up of six ( $\alpha$ -CD), seven ( $\beta$ -CD) or eight dextrose units ( $\gamma$ -CD). CDs, which have central cavities of different diameters, form inclusion complexes with hydrophobic drug molecules and can be used to improve the aqueous solubility of the drug. For  $\beta$ -CD, which itself has a relatively low aqueous solubility, substitution of the hydroxyl groups results in a marked improvement in the aqueous solubility of the derivative. Examples of  $\beta$ -CD derivatives are the sulfobutylether of  $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD), the hydroxypropyl derivative of  $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), and the randomly methylated  $\beta$ -CD (RM- $\beta$ -CD).

Many drugs in the EMA priority list are hydrophobic (e.g., proton pump inhibitors, such as lansoprazole) or unstable (e.g., ganciclovir is stable in water for just 12 h at room temperature). CDs can actually help improving pediatric drug formulations, overcoming limitations of some drugs such as poor solubility and stability, and unpleasant taste [34]. CDs have indeed been used as complexing agents to increase the aqueous solubility of drugs poorly soluble in water, in order to improve their bioavailability and stability. In addition, CDs can be used to reduce or prevent gastrointestinal and ocular irritation, to reduce or eliminate unpleasant tastes, to provide better stability, to prevent drug-drug or drug-additive interactions within a formulation, or to convert oils and liquid drugs into microcrystalline or amorphous powders.

As regards toxicity and safety risks, although the oral availability of CDs is very low, high doses may cause reversible diarrhea and cecal enlargement

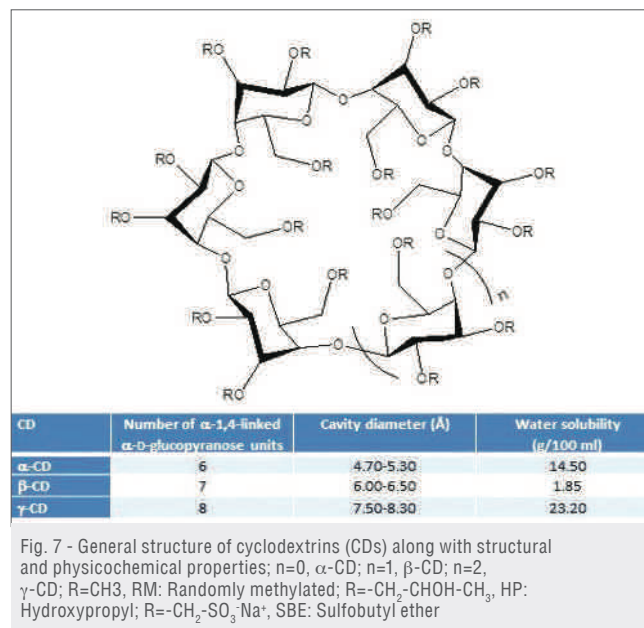


Fig. 7 - General structure of cyclodextrins (CDs) along with structural and physicochemical properties; n=0,  $\alpha$ -CD; n=1,  $\beta$ -CD; n=2,  $\gamma$ -CD; R=CH<sub>3</sub>, RM: Randomly methylated; R=-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>3</sub>, HP: Hydroxypropyl; R=-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>, SBE: Sulfobutyl ether





Administration route	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	RM- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD/ SBE- $\beta$ -CD2
<b>Oral</b>					
PDE, mg/kg/day	120	<sup>10</sup>	200	N	160
TH adult	120	10	200	-	160
TH neonate	12	1	20	-	16
<b>Parentera</b>					
PDE, mg/kg/day	0.2	N	0.8	N	300
TH adult	0.2	-	0.8	-	300
TH neonate	0.02	-	0.08	-	10

<sup>1</sup>Data taken from EMA, Background review for cyclodextrins used as excipients, November 20, 2014 (ref. [35]); N: No data for the respective route of administration  
<sup>2</sup>Although different for their physicochemical properties, HP- $\beta$ -CD and SBE- $\beta$ -CD can be taken together from the toxicological viewpoint ulcerosa

Tab. 3 - Permitted Daily Exposures (PDEs) and suggested thresholds (THs) above which adverse reactions may occur in cyclodextrin (CD)-containing oral and parenteral pharmaceutical formulations<sup>1</sup>

in animals, and to minimum extent in humans. Depending on the amount, CDs may influence the permeability of tissues and therefore the bioavailability of active substances given topically. In addition, CDs can cause nephrotoxic effects in animals at high systemic exposure, but there is no proof of these effects in humans so far. Data in children less than 2 years old are scarce. In Tab. 3 the Permitted Daily Exposures (PDEs) and suggested thresholds (THs), above which adverse effects may occur in CD-containing oral and parenteral pharmaceutical formulations. PDEs and THs are taken from the EMA draft report [35] are based on human data and, when not available, estimated on the basis of animal data.

## Conclusions

The design and development of appropriate pharmaceutical formulations for the different age groups of pediatric patients still represents a challenge for pharmaceutical scientific community and industry. Neonates and infants below 6 months are the most vulnerable groups, because of the highest differences in drug action and ADME compared to adults. The EMA Therapeutic Needs List and the studies requested for optimizing appropriate formulations and dosage forms (Fig.s 1 and 2) indicate need and urgency to promote studies on child-appropriate formulations allowing better drug delivery, decrease of safety risks, including those related to excipients, and improved therapy compliance and dosage form handling. While many scientific proposals under discussion promise real advances in the sector, it appears important to improve public-private partnerships that progress in creating technological platforms for pharmaceutical pediatric formulations that support the applications to the pediatric pharmaceuticals of innovative technologies developed for adults (e.g., nanoparticle-targeted therapy, novel smart polymer-based drug delivery systems), while prioritizing unmet therapeutic formulation needs.

## REFERENCES

- [1] A. Ceci *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2002, **58**, 495.
- [2] E. Kimland, V. Odlind, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012, **91**, 796.
- [3] M.C. Sturkenboom *et al.*, *BMJ*, 2008, **337**, a2245.
- [4] European Medicines Agency, Report on the survey of all pediatric uses of medicinal products in Europe, 2010 EMA/794083/2009
- [5] European Parliament and Council of the European Union. Regulation

(EC) No 1901/2006 of 12 December 2006 on medicinal products for pediatric use and amending Regulation (EEC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *Official Journal of the European Union*, 2006, L 378/1.

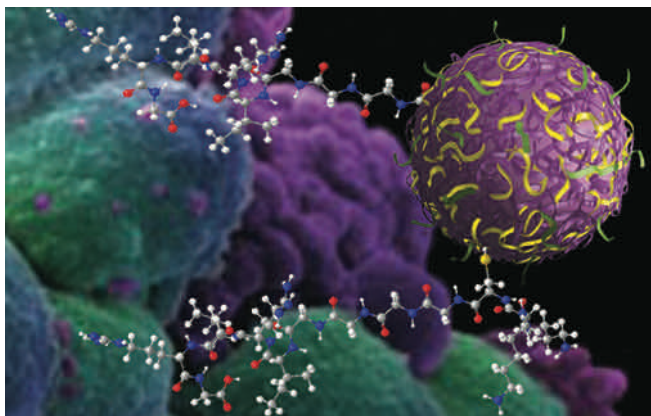
- [6] European Parliament and Council of the European Union. Regulation (EC) EC No 1902/2006 of 20 December 2006 amending Regulation 1901/2006 on medicinal products for pediatric use. *Official Journal of the European Union*, 2006, L 378/20.
- [7] European Medicine Agency. Revised priority list for studies on off-patent pediatric medicinal products (EMA/PDCO/98717/2012). Aug 2013.
- [8] A. Ceci *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2006, **62**, 947.
- [9] L. Ruggieri *et al.*, *Eur. J. Pediatr.*, 2015, **174**, 481.
- [10] V. Ivanovska *et al.*, *Pediatrics*, 2014, **134**, 361.
- [11] H.K. Batchelor *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014, 102
- [12] J.L. Kaye. *Int. J. Clin. Pharm.*, 2011, **33**, 20.
- [13] I.H. Bartelink *et al.*, *Clin. Pharmacokin.*, 2006, **45**, 1077.
- [14] E. Fernandez *et al.*, *Pharmaceutics*, 2011, **3**, 53.
- [15] European Medicine Agency. Guideline on pharmaceutical development for pediatric use (EMA/CHMP/QWP/805880/2012) Rev. 2. Aug. 2013.
- [16] E.M.K. Geiling, P.R. Cannon, *JAMA*, 1938, **111**, 919.
- [17] J.L. Hiller *et al.*, *Pediatrics*, 1986, **77**, 500.
- [18] W.J. Brown *et al.*, *Lancet*, 1982, **1**, 1250.
- [19] V. Fabiano *et al.*, *Pharmacol. Res.*, 2011, **63**, 362
- [20] M.C. Nahata. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal*, 2009, **94**, F392.
- [21] S. Salunke *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 2012, **435**, 101.
- [22] S. Salunke *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 2013, **457**, 310.
- [23] L.D. Steging *et al.*, *Metabolism*, 1990, **39**, 1076.
- [24] M. LeBel *et al.*, *Dev. Pharmacol. Ther.*, 1988, **11**, 347.
- [25] J. Lopez-Herce *et al.*, *Ann. Pharmacother.*, 1995, **29**, 632.
- [26] J. Gershanik *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1982, **307**, 1384.
- [27] American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, *Pediatrics*, 1984, **73**, 405.
- [28] S. Pughac, I.Z. Pughac. *South. Med. J.*, 2009, **4**, 440.
- [29] C.L. Fligner *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.*, 1985, **253**, 1606.
- [30] K. Arulanantham, M. Genel. *J. Pediatr.*, 1978, **93**, 515
- [31] M.G. MacDonald *et al.*, *Pediatrics*, 1987, **79**, 622.
- [32] D. Mathiron *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 2013, **102**, 2102.
- [33] M. Orlu-Gul *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2013, **39**, 1028
- [34] R. Challa *et al.*, *AAPS PharmSciTech.*, 2005, **6**, E329.
- [35] European Medicine Agency. Background review for cyclodextrins used as excipients (EMA/CHMP/333892/2013). Nov. 2014.

## Formulazioni farmaceutiche in pediatria: sfide e problematiche

Lo sviluppo di formulazioni farmaceutiche appropriate per i pazienti pediatrici rappresenta tuttora una sfida per la comunità scientifica e l'industria farmaceutica. È di tutta evidenza l'importanza di promuovere partenariati pubblico-privati che consentano di progredire nella creazione di piattaforme tecnologiche per lo sviluppo di formulazioni pediatriche in grado di ottimizzare il drug delivery e migliorare la sicurezza dei farmaci in età pediatrica, nel rispetto delle linee guida delle agenzie regolatorie.

# BIOCONIUGATI PER IL *DELIVERY* ATTIVO DI FARMACI

Il risultato della ricerca nell'ambito del *drug delivery* ha portato allo sviluppo di numerose formulazioni colloidali capaci di ottimizzare la veicolazione di farmaci facilmente degradabili o poco solubili e farmaci che per la loro limitata capacità di superare le barriere biologiche non sono in grado di raggiungere inalterati il sito d'azione. Più recentemente, una nuova classe di sistemi colloidali per il *drug delivery* sono stati progettati per il direccionamento attivo di farmaci. Tali sistemi sono in grado di riconoscere specifici bersagli cellulari e subcellulari ed accumularsi nel distretto d'azione dove il farmaco viene liberato.



I progressi della ricerca scientifica nel settore delle nanotecnologie hanno portato negli ultimi cinquant'anni ad un rapido sviluppo di sistemi terapeutici innovativi che da un lato consentono di ottimizzare l'impiego e la performance di farmaci e dall'altro di aprire nuove prospettive al trattamento di patologie fino ad oggi difficilmente curabili.

Attraverso la combinazione fisica o chimica di materiali con peculiari caratteristiche chimico-fisiche, biologiche e biofarmaceutiche sono stati sviluppati vari sistemi terapeutici colloidali più o meno complessi e sofisticati quali, ad esempio, sistemi polimerici solubili, liposomi, micelle e nanoparticelle lipidiche, polimeriche o inorganiche. Tali sistemi permettono di superare problemi di utilizzo di farmaci che presentano inadeguate caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche, migliorandone così il profilo terapeutico. I sistemi colloidali complessi e multifunzionali permettono infatti di ottimizzarne e personalizzare la somministrazione di farmaci in termini di dosaggio e regime di impiego, fungere da trasportatori (*carrier*) di numerose molecole di farmaco (*cargo*), sommi-

nistrare contemporaneamente farmaci diversi (*combination therapy*), somministrare farmaci poco solubili e poco stabili, superare barriere biologiche epiteliali ed endoteliali e mantenere livelli terapeutici prolungati. Inoltre, per la loro natura nanometrica, questi sistemi possono localizzarsi in alcuni tessuti particolarmente permeabili, come ad esempio i tessuti infiammati o tumorali, questi ultimi caratterizzati da un'elevata ma incompleta vascolarizzazione e da un basso drenaggio linfatico. Pertanto, tali sistemi possono accumularsi preferenzialmente in tumori solidi attraverso un processo di direccionamento definito "passivo" noto come effetto di Enhanced Permeation and Retention (EPR).

Doxil è una formulazione di liposomi PEGilati contenenti doxorubicina approvata da FDA nel 1995 per il trattamento della sindrome di Kaposy correlata all'Aids. Sebbene l'idea originaria fosse quella di avere un maggiore accumulo di doxorubicina nel tessuto tumorale attraverso l'effetto EPR, il maggiore vantaggio di questa formulazione è il migliorato profilo farmacocinetico del farmaco, con una significativa riduzione della cardiotoxicità.

Abraxane è una formulazione costituita da paclitaxel adsorbito su nanoparticelle di albumina approvata da FDA nel 2005. Per questo prodotto è stata riportata la selettività per tumori solidi attraverso un processo di accumulo multi-step. L'albumina è infatti in grado di riconoscere il recettore GP60 espresso sulle membrane delle cellule endoteliali che ne promuove la transitosi e l'accumulo nella massa tumorale attraverso il processo che coinvolge la Caveolina 1. Successivamente il sistema viene internalizzato nella cellula tumorale grazie al riconoscimento del sistema SPARC espresso sulla superficie cellulare.

Tuttavia, nonostante l'Abraxane presenti un meccanismo di veicolazione di farmaco attivo e direccionato, questa formulazione consente sostanzialmente di superare i problemi formulativi di paclitaxel, molecola poco solubile, evitando l'impiego di Cremofor EL, un eccipiente fortemente sensibilizzante. Si ritiene infatti che le molecole di paclitaxel adsorbi-



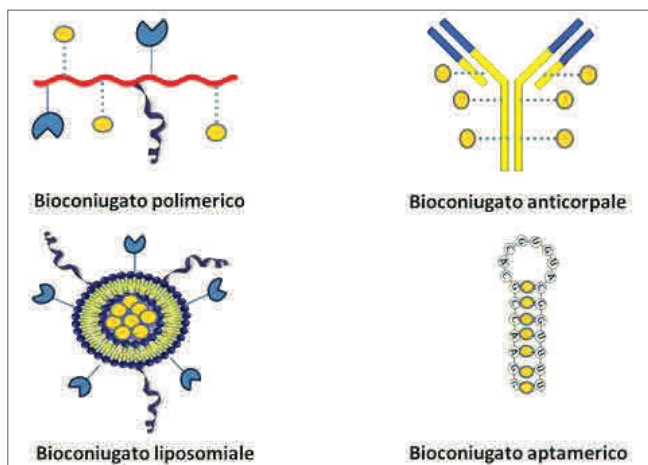


Fig. 1 - Principali sistemi colloidali bioconiugati per il drug delivery attivo

te sulla proteina vengano rilasciate nel circolo sanguigno subito dopo somministrazione.

L'inserimento di agenti direzionanti nelle strutture colloidali attraverso tecniche di bioconiugazione chimica e fisica permette di ottenere prodotti ibridi multifunzionali con peculiari caratteristiche biofarmaceutiche di sito-specificità che consentono la veicolazione e il rilascio di farmaci in modo spazialmente e temporalmente controllato nei distretti target. In Fig. 1 sono riportati alcuni esempi di bioconiugati colloidali per il delivery attivo di farmaci.

L'efficacia di questi sistemi dipende da numerose variabili correlate sia alla natura chimico-fisica del bioconiugato che all'espressione delle funzioni bersaglio (*target* o *biomarker*) a livello cellulare o subcellulare. Per quanto riguarda l'espressione cellulare delle funzioni bersaglio, al fine di ottenere un'elevata selettività ed efficienza di direzionamento è necessaria un'espressione cellulo-specifica del *biomarker* con bassa eterogeneità e con un'elevata densità di espressione. La mancanza di questi requisiti rende il bioconiugato inefficace in termini di selettività, mentre possono prevalere meccanismi di direzionamento passivo. Nel caso di immuno-liposomi direzionati a cellule metastatiche del tumore al seno ERBB2 positive, ad esempio, è stato dimostrato che è necessaria una densità recettoriale di  $10^5$  ERBB2 per avere un reale vantaggio rispetto ai liposomi non direzionati.

I principali ambiti di applicazione di bioconiugati per il direzionamento attivo sono il sistema nervoso centrale (*brain delivery*) e i tessuti tumorali. Il sistema nervoso centrale è un organo difficilmente penetrabile soprattutto nel caso di macromolecole biotech, quali oligonucleotidi e proteine, mentre nel caso delle cellule tumorali il basso indice terapeutico che caratterizza molti farmaci antitumorali rende particolarmente interessante il poter accumulare selettivamente i farmaci in questi tessuti.

### Agenti direzionanti

Nel corso degli anni sono stati utilizzati numerosi agenti direzionati, come ad esempio anticorpi, frammenti anticorpali, altre proteine e peptidi, oligonucleotidi come gli aptameri, oligosaccaridi e zuccheri semplici, e piccole molecole organiche sintetiche e naturali come metaboliti e vitamine. In Tab. 1 sono riportati solo alcuni esempi dei molti agenti direzionanti utilizzati nella preparazione di bioconiugati per il *drug delivery* attivo.

Gli anticorpi monoclonali rappresentano una delle prime e più importanti classi di agenti direzionanti, costituita da anticorpi interi e loro frammenti. Gli anticorpi interi sono più utilizzati nella preparazione di immunocongiugati definiti come *antibody drug conjugates* (ADC) in cui un numero limitato di molecole di farmaco o di radionuclide è legato alla proteina attraverso un piccolo *linker*. Nella preparazione di sistemi più complessi vengono invece utilizzati più spesso frammenti anticorpi che non contengono la frazione effettrice Fc ma mantengono la frazione anticorpale variabile per il riconoscimento antigenico, quali  $F(ab')_2$  (circa 110 kDa),  $Fab'$  (circa 55 kDa) e  $scF_v$  (circa 28 kDa). Frammenti di anticorpi sono oggi facilmente ottenibili attraverso ingegneria genetica e *cleavage* enzimatica. Rispetto all'anticorpo intero presentano i vantaggi di avere una dimensione ridotta, essere meno immunogenici, più stabili, di più facile produzione e manipolazione. Frammenti di anticorpi sono stati utilizzati nella preparazione di sistemi per il rilascio di farmaci nel trattamento di numerosi tumori.

Direzionante	Bersaglio cellulare	Bersaglio terapeutico
<b>Peptidi</b>		
RGD	Molecole di adesione cellulare $\alpha_v\beta_3$ integrine	Cellule endoteliali vascolari di tumori solidi
NGR	Amminopeptidasi	Cellule endoteliali vascolari di tumori solidi
<b>Metaboliti</b>		
Acido folico	Recettore folato	Cellule tumorali
Purine	Recettori di membrana	SNC
<b>Proteine</b>		
Transferrina	Recettore transferrina	Cellule tumorali, SNC
Insulina	Recettore insulina	SNC
<b>Zuccheri</b>		
Galattosio, mannosio, lattosio, glucosio	Asialoglicoproteine di membrana	Epatociti
<b>Peptidi</b>		
GE11	Recettore di membrana	Cellule carcinoma colon-rettale
preS1	Recettore di membrana	Cellule epatocarcinoma
<b>Altri</b>		
Alendronato	Idrossiapatite	Matrice ossea
Acido gambogico	Recettore di transferrina	Tumore, SNC
<b>Anticorpi</b>		
Anti-VEGF	Recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare	Endotelio tumorale
scFv anti- transferrina	Recettore transferrina	SNC
Brentuximab	CD30	Linfoma Hodgkin
Gemtuzumab	CD33	Mieloma linfatico acuto
Trastuzumab	Her2	Tumore al seno
Inotuzumab	CD22	Linfoma Non-Hodgkin
<b>Aptameri</b>	vari	vari
<b>Polimeri</b>		
Acido ialuronico	CD44	Linfociti

Tab. 1 - Alcuni esempi di agenti direzionanti utilizzati nella preparazione di bioconiugati per il *drug delivery* attivo

Agenti direzionanti non anticorpali presentano spesso il vantaggio di essere facilmente sviluppabili e ottenibili con una produzione poco costosa e facili da manipolare. Tuttavia, risultano spesso meno selettivi dei direzionanti anticorpali. Arginina-glicina-acido aspartico (RGD), acido folico e transferrina, ad esempio, possono legarsi ad alcuni tessuti *non-target*. In alcuni casi, come ad esempio nel caso dell'acido folico, agenti direzionanti che fanno parte della dieta o sono metaboliti abbondanti nei fluidi fisiologici possono competere nel riconoscimento del *target*.

## Immunoconiugati

Le consolidate tecnologie di ingegnerizzazione anticorpale, ibridoma e *phage-display* consentono oggi di ottenere anticorpi monoclonali (MoAb) ad elevata specificità e affinità di legame verso antigeni selezionati.

In breve tempo, numerosi MoAb sono entrati come tali in terapia e un elevato numero di queste molecole proteiche sono in fase avanzata di studi clinici per il trattamento di numerose patologie. Trastuzumab (anti-ERBB2, Herceptin) o rituximab (anti-CD20, Rituxan), ad esempio, hanno un'intrinseca citotossicità in quanto interferiscono con molecole che stimolano la proliferazione cellulare. La combinazione con farmaci antitumorali rappresenta una strategia per ottenere una sinergia tra l'azione selettiva e citotossica dell'anticorpo e dei chemioterapici.

Gli immuno-bioconiugati rappresentano una delle classi di nuovi farmaci più interessanti e innovative per il trattamento di una grande varietà di patologie, in particolare per la cura di varie forme tumorali. La tecnologia della immunoconiugazione permette di migliorare significativamente il profilo terapeutico di farmaci antitumorali. In particolare, farmaci molto potenti con un basso indice terapeutico, quali auristatine, maritansine e calicheamicine, sono ottimi candidati per la produzione di immuno-bioconiugati. Alla classe degli immuno-bioconiugati appartengono immunoconiugati semplici in cui l'agente terapeutico e/o diagnostico è direttamente legato all'anticorpo, come nel caso di immunoradionuclidi, immuno-farmaci, immunotossine, immunoderivati e immunoconiugati più complessi in cui l'anticorpo è legato a trasportatori colloidali.

Il riconoscimento anticorpo-antigene è, in alcuni casi, seguito dall'internalizzazione del bioconiugato attraverso un processo clatrina-dipendente. La velocità di internalizzazione dipende dalla struttura del bioconiugato, ma alcuni studi hanno dimostrato che spesso è più rapida rispetto all'anticorpo non coniugato.

Nello sviluppo di immunoconiugati vengono utilizzati anticorpi monoclonali (MoAb) interi ingegnerizzati, principalmente umanizzati o chimerici, e loro frammenti che non contengono la frazione effettrice Fc.

Uno dei vantaggi dell'uso di MoAb interi è l'elevata stabilità, la prolungata permanenza in circolo e l'elevata affinità dovuta alla cooperatività dei due siti di riconoscimento antigenico, mentre il farmaco può essere convenientemente coniugato alla frazione Fc. D'altra parte, la frazione Fc può interferire con l'efficacia del bioconiugato in quanto può legarsi ai recettori per questa frazione presenti su cellule come i macrofagi con conseguente captazione ed eliminazione da parte del fegato e della milza. Rispetto ai MoAb, i frammenti  $F(ab')_2$ , Fab' and  $scF_v$  (*single-chain variable*) hanno il vantaggio, di avere un ridotto potenziale immunogenico dovuto alla mancanza della frazione proteica effettrice Fc. I frammenti  $F(ab')_2$  hanno due regioni di riconoscimento anticorpale tra loro legate attraverso un ponte disolfuro la cui riduzione porta alla formazione di due frammenti Fab' con funzioni tioliche che possono essere utilizzate come siti di legame di farmaci.

I frammenti  $scF_v$  sono particolarmente interessanti perché facilmente identificabili attraverso la tecnologia *phage-display*, sono facilmente ottenibili per fermentazione da *Escherichia coli* e posseggono una bassa immunogenicità. Sono tuttavia meno stabili degli anticorpi interi e vengono rapidamente eliminati dal circolo.

Normalmente gli immuno-bioconiugati semplici ottenuti con anticorpi interi contengono da 1 a 8 molecole di farmaco, che può essere legato alla frazione proteica dell'anticorpo attraverso un legame idrolizzabile o meno frequentemente attraverso un legame stabile. Spesso il farmaco è legato attraverso semplici metodiche chimiche ai numerosi residui lisinici esposti sulla superficie dell'anticorpo o a cisteine rese disponibili dopo riduzione. Un MoAb IgG contiene circa 100 lisine e 8 cisteine impegnate in legami intracatena. Pertanto, il processo di bioconiugazione può portare a prodotti altamente eterogenei in termini di rapporto farmaco/anticorpo, di distribuzione del farmaco nella struttura proteica e di attività biologica. Di conseguenza, i bioconiugati possono contenere popolazioni di prodotti con diverse caratteristiche chimico-fisiche, profili farmacocinetici, proprietà biofarmaceutiche, immunoreattività ed efficacia terapeutica.

Il legame di un elevato numero di molecole di farmaco all'anticorpo può portare a prodotti poco solubili che tendono ad aggregare oppure al mascheramento dei siti variabili dell'anticorpo deputati al riconoscimento antigenico. Oltre al numero di molecole di farmaco legato all'anticorpo, anche il sito di legame è un elemento importante per l'attività e la performance terapeutica del bioconiugato. È riportato che il legame alla catena leggera, così come il legame a siti proteici non esposti al solvente, producono bioconiugati più stabili.

Recentemente sono state sviluppate nuove metodiche chimiche ed enzimatiche per la coniugazione selettiva di farmaci all'anticorpo in grado di produrre immuno-bioconiugati con composizione omogenea e struttura definita.

Tra le metodiche enzimatiche, Sanofi-Genzyme ha sviluppato una procedura di *glycoengineering* che prevede l'introduzione nella frazione Fc dell'anticorpo residui di acido sialico attraverso galattosil e sialil transferasi. Innate Pharma e Rinat Pfizer hanno sviluppato metodiche basate sull'uso di transglutaminasi per legare selettivamente farmaci a funzioni guanidiniche introdotte artificialmente nella struttura anticorpale. Redwood Bioscience utilizza un processo enzimatico attraverso il quale cisteine inserite geneticamente nella sequenza consenso CXPXR vengono trasformate in formilglicine, successivamente utilizzate per la coniugazione di farmaci.

Per quanto riguarda le vie chimiche di coniugazione selettiva, Sutro Biopharma Ambrx ha sviluppato una procedura di ingegneria genetica che prevede l'introduzione di aminoacidi non naturali nella struttura anticorpale seguita dalla coniugazione del farmaco attraverso *click-chemistry*. Una metodica messa a punto dal National Cancer Institute prevede il legame di farmaci a funzioni selenolo-cisteiniche introdotte in anticorpi ingegnerizzati.

Altre tecnologie messe a punto da UCL Cancer Institute e PolyTherics prevedono processi di riduzione selettiva di ponti disolfuro e coniugazione ai gruppi tiolici neo-formati.

Ad oggi vi sono numerosi immuno-bioconiugati in avanzata fase di studio clinico per il trattamento di varie forme tumorali, che si differenziano per i vari elementi che li compongono, specificità dell'anticorpo, tipo di linker e tipo di farmaco.



## Radioimmunocongiugati

I radioimmunocongiugati vengono ottenuti per complessazione di anticorpi con radionuclidi ad emissione di radiazione ad alta energia come ad esempio beta emettitori,  $^{131}\text{I}$ iodio e  $^{90}\text{T}$ ritrio, o alfa emettitori,  $^{213}\text{B}$ ismuto e  $^{211}\text{A}$ statina. Tali biocongiugati sono utilizzati principalmente per patologie ematopoietiche, quali linfoma o leucemia acuta mieloide, mentre sono risultati poco efficaci nel trattamento di tumori solidi.

GSK e Bayer Schering Pharma AG/Spectrum Pharmaceuticals hanno sviluppato rispettivamente due radioimmunocongiugati, Bexxar e Zevalin<sup>®</sup>, approvati per il trattamento del linfoma non-Hodgkin. Entrambi i radioimmunocongiugati sono prodotti con anticorpi murinici monoclonali verso i recettori linfocitari CD20.

Bexxar (Tositumab) è un radioimmunocongiugato di  $^{131}\text{I}$  approvato nei primi anni del 2000 per il trattamento del linfoma non-Hodgkin in pazienti CD20-positivi con recidive o refrattari alla terapia con Rituximab. GSK ha però interrotto la produzione di questo prodotto nel 2014 perché non è risultato competitivo con altre forme di trattamento terapeutico. Infatti Bexxar può essere utilizzato per un solo ciclo di trattamento e non è stato definito un chiaro profilo di efficacia e sicurezza. Tra i principali effetti collaterali vi sono manifestazioni allergiche gravi anche letali dovute alla natura murinica dell'anticorpo.

Zevalin (ibritumomab) è un radioimmunocongiugato di  $^{90}\text{Y}$  con un diverso profilo farmacocinetico e attività rispetto a Bexxar ma che presenta problematiche di impiego molto simili.

Altri radio-immunocongiugati a base di  $^{177}\text{Lu}$  e  $^{211}\text{At}$  sono attualmente in fase di sviluppo per il trattamento del cancro al colon.

## Anticorpo-farmaco

Tra gli immunocongiugati anticorpo-farmaco entrati nel mercato vi sono Adcetris<sup>®</sup>, Kadcyla<sup>®</sup> e Mylotarg<sup>®</sup> sviluppati rispettivamente da Seattle Genetics, Genentech e Wyeth/Pfizer.

Adcetris<sup>®</sup> (brentuximab vedotin) è utilizzato nel linfoma Hodgkin e nel linfoma anaplastico (*systemic anaplastic large cell lymphoma*, ALCL). Questo immunocongiugato è stato ottenuto coniugando monometil auristatina E (MMAE), un inibitore della polimerizzazione del microtubulo, a MoAb anti-CD30 (cAC10). Il farmaco viene legato all'anticorpo attraverso un legame dipeptidico sensibile all'idrolisi da parte di catepsine, enzimi altamente espressi sia nella matrice extracellulare tumorale che a livello lisosomiale. La coniugazione del farmaco avviene a livello dei ponti disolfuro delle cisteine nelle catene pesanti e leggere degli anticorpi che vengono ridotti senza alterare la biospecificità dell'anticorpo. Sebbene il processo chimico consenta di ottenere un prodotto omogeneo con un elevato grado di caricamento di farmaco, 8 molecole di MMAE per cAC10 selettivamente legate a cisteine ridotte, vari studi hanno dimostrato che la massima efficacia terapeutica è ottenuta con 4 molecole di farmaco per molecola di anticorpo mentre il prodotto con 2 molecole di farmaco è inefficace. Inoltre studi condotti con molecole di anticorpi mutate hanno dimostrato che ai fini dell'efficacia terapeutica è più importante il numero di molecole di farmaco caricate piuttosto che il sito in cui sono legate.

Kadcyla<sup>®</sup>, sviluppato da Genentech, è un immunocongiugato del trastuzumab (Herceptin), un anticorpo monoclonale anti-HER2 utilizzato per il cancro metastatico al seno. Trastuzumab è stato il primo anticorpo utilizzato come tale nella terapia antitumorale ed è stato approvato da FDA nel 1998. In Kadcyla<sup>®</sup>, la mertansina (DM1), un inibitore della tubu-

lina con potente attività citotossica, è legata alle lisine del trastuzumab attraverso succinimidil-4-*N*-maleimidometil)cicloesano-1-carbossilato. Questo consente di ottenere un prodotto omogeneo costituito da 2 a 8 molecole di farmaco per molecola di anticorpo.

Mylotarg<sup>®</sup> (gemtuzumab ozogamicin) prodotto da Wyeth/Pfizer è stato approvato nel 2000 per il trattamento della leucemia mieloide acuta. Gli studi clinici post-approvazione hanno però dimostrato una scarsa efficacia terapeutica e l'insorgenza di vari effetti collaterali che hanno indotto l'azienda ad interrompere la produzione. Come nel caso di Kadcyla, il farmaco viene coniugato all'anticorpo a livello dei residui lisinici. Tuttavia, contrariamente a Kadcyla<sup>®</sup>, Mylotarg<sup>®</sup> è un prodotto altamente eterogeneo in cui il 50% delle molecole proteiche contengono da 4 a 6 molecole di farmaco e il 50% delle molecole di anticorpo non è coniugato con il farmaco. Nel caso di Mylotarg<sup>®</sup>, il farmaco è coniugato all'anticorpo attraverso un legame idrazonico idrolizzabile in maniera pH dipendente. Sebbene da un lato tale legame garantisca il rilascio del farmaco in forma attiva dall'altro può essere la ragione della mancata efficacia del prodotto. Infatti, la corretta cinetica di rilascio del farmaco rappresenta un elemento chiave per l'efficacia terapeutica del biocongiugato.

## Immunotossine

Le immunotossine sono biocongiugati di anticorpi internalizzanti con tossine di origine batterica, fungina e vegetale che inattivano la sintesi di proteine o i segnali di trasduzione. Le tossine più usate sono la ricina, la tossina difterica o l'esotossina da *pseudomonas*.

Ontak (denileukin diftotox) è una proteina di fusione simile ad una immunotossina ottenuta dalla fusione di interleuchina (IL)-2-tossina difterica ed è stata approvata per uso clinico sebbene non abbia dimostrato un'elevata efficacia, mentre gli effetti collaterali, quali edema, ipotensione, ipoalbuminemia e aumento di transaminasi epatiche, sono piuttosto importanti.

## Immunoliposomi

Rispetto ai radioimmunocongiugati, immunocongiugati anticorpo-farmaci e immunotossine dove l'agente diagnostico e/o terapeutico è direttamente coniugato all'anticorpo per via chimica o enzimatica o per fusione, gli immunoliposomi sono sistemi vescicolari di tipo *reservoir* che contengono un'elevata quantità di molecole di farmaco (decine di migliaia) e alla cui superficie vengono legate direttamente o attraverso un *linker* polimerico o attraverso *post-insertion* MoAb o frammenti anticorpali. Oltre alla capacità di trasportare elevate quantità di farmaco al sito d'azione, gli immunoliposomi presentano un'elevata avidità per il *target* e *up-take* cellulare dovuti alla presenza sulla superficie di numerose molecole direzionanti. Dall'altro lato le grandi dimensioni (usualmente oltre 100 nm) prevengono la localizzazione passiva nel tessuto tumorale mentre facilitano l'eliminazione attraverso il sistema del reticolo endoteliale. Quest'ultimo problema è stato in parte risolto con la preparazione di liposomi *stealth*, ovvero liposomi rivestiti con PEG. Come gli altri immunocongiugati, gli immunoliposomi possono essere internalizzati e rilasciare il farmaco nell'endosoma oppure rilasciare il farmaco nella matrice extracellulare.

## Aptameri-farmaci

Gli aptameri, noti anche come anticorpi chimici, sono molecole oligonucleotidiche in grado di riconoscere e legare con grande selettività un'ampia varietà di *biomarkers*. Rispetto ad altri agenti direzionati, gli



aptameri hanno un profilo di azione unico che li rende particolarmente interessanti per la veicolazione selettiva di farmaci di diversa natura e di piccole molecole organiche od oligonucleotidi, per la chemioterapia, la *gene therapy*, l'immunoterapia, la terapia fotodinamica e la terapia fototermica, principalmente nel trattamento del cancro.

Tra i vantaggi degli aptameri vi sono:

- 1) possibilità di selezione *in vitro* dell'aptamero attraverso la tecnologia Selex per ogni tipo di *target* senza le limitazioni tipiche dei protocolli che implicano l'uso di cellule o animali. Questo consente di ottenere agenti direzionati anche verso *target* non immunogenici o tossici;
- 2) possibilità di sintesi con alta riproducibilità, purezza e quantità;
- 3) possibilità di modifica chimica della struttura per coniugare farmaci o trasportatori di farmaci, come ad esempio polimeri, liposomi e nanoparticelle;
- 4) stabilità e rinaturazione reversibile dopo denaturazione termica.

La preparazione di bioconiugati aptamero-farmaco o aptamero-*carrier* colloidale può essere condotta con tecniche di coniugazione fisica o chimica. Un tipico esempio di coniugazione non covalente aptamero-farmaco è dato da aptameri-doxorubicina. Per la sua capacità di intercalarsi nel DNA, doxorubicina può intercalarsi nella struttura dell'aptamero per essere selettivamente veicolata nelle cellule tumorali. In questo modo sono stati ad esempio ottenuti complessi direzionati a cellule prostatiche LNCaP. Allo scopo di aumentare il carico di farmaco nella struttura dell'aptamero sono stati preparati derivati detti *nanotrains* in grado di intercalare un elevato numero di molecole di doxorubicina.

Sebbene il legame non-covalente sia una procedura di coniugazione aptamero-farmaco semplice ed efficiente, il rilascio del farmaco dal complesso è spesso poco predicibile e avviene facilmente prima di raggiungere la cellula bersaglio. Per superare questo problema è possibile produrre bioconiugati in cui il farmaco viene covalentemente legato all'aptamero attraverso un legame scindibile per via chimica, come ad esempio legami esterei, ammidici, idrazonici o disolfuro. Comunque, il numero di molecole di farmaco che in questo caso possono essere legate all'aptamero è limitato e il basso peso molecolare del complesso ne facilita la rapida eliminazione dal circolo.

Bioconiugati covalenti aptameri-siRNA (*small interfering RNA*) sono stati ottenuti attraverso diverse semplici tecnologie chimiche. Vista la simile natura chimica dell'aptamero e siRNA, questi bioconiugati vengono usualmente definiti come chimere. Vari studi hanno dimostrato come le chimere aptamero-siRNA direzionate alle cellule cancerose sono caratterizzate da un efficiente riconoscimento del *target* ed elevato silenziamento dell'mRNA con una significativa efficacia terapeutica. Per ottenere derivati chimerici più semplici e più efficaci il numero di sequenze dell'aptamero può essere ridotto senza sostanziale perdita di efficienza di riconoscimento del *target*. Inoltre, l'ulteriore coniugazione di PEG 20 kDa al siRNA ne prolunga la permanenza in circolo.

Un'altra strategia impiegata per legare siRNA ad aptameri prevede la modifica di entrambi con molecole di biotina e quindi il loro assemblaggio in presenza di streptavidina, una proteina che riconosce e lega biotina con alta affinità. Sebbene tale tecnica porti a complessi attivi, streptavidina è una molecola altamente immunogenica e il suo uso clinico presenta molte difficoltà.

Infine, aptameri sono stati anche coniugati a nanoparticelle di silice, liposomi, polimeri sia per la veicolazione di farmaci che a scopo diagnostico.

## Sistemi polimerici

L'uso di polimeri per la preparazione di sistemi colloidali per il *drug delivery* è iniziato con le scoperte di Robert Langer e del premio Nobel Judah Folkman che, negli anni Settanta, hanno dimostrato come con tali materiali fosse possibile ottenere sistemi in grado di rilasciare farmaci in modo spazialmente e temporalmente controllato, ovvero in siti specifici dell'organismo con cinetiche di liberazione del farmaco predeterminate. I bioconiugati polimerici rappresentano oggi una delle classi più varie ed affascinanti dello sviluppo farmaceutico, con ampie prospettive di sviluppo per l'ottenimento di sistemi innovativi per la veicolazione attiva e selettiva di farmaci. I bioconiugati polimerici consentono di coniugare in un'unica macromolecola numerose unità di farmaci e combinare farmaci con diversa attività. Inoltre, i bioconiugati polimerici consentono di migliorare il profilo biofarmaceutico e farmacocinetico di farmaci, superare problemi di solubilità e stabilità di farmaci, favorire la localizzazione di farmaci attraverso meccanismi passivi in tumori solidi.

Opaxio (paclitaxel poliglumex) è un bioconiugato polimerico sviluppato da Cell Therapeutics per il trattamento del tumore non-microcitoma del polmone e del tumore dell'ovaio. In Opaxio il farmaco poco solubile paclitaxel è stato coniugato al polimero solubile poliglutammino attraverso un legame idrolizzabile. Studi hanno dimostrato che questo bioconiugato, di per sé inattivo, si accumula passivamente nella massa tumorale solida dove rilascia il farmaco.

Polimeri solubili multivalenti sono stati utilizzati sulla base dello schema sviluppato da Helmut Ringsdorf negli anni Ottanta, per coniugare in una stessa macromolecola, oltre a farmaci, elementi con diverse funzioni: agenti direzionanti e modulatori delle caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche del sistema terapeutico. Sulla base di questo concetto sono state proposte diverse piattaforme di sviluppo che differiscono per tipo di elementi inseriti nella macrostruttura molecolare e architetture, offrendo la possibilità di progettare sistemi per diversi tipi di impieghi terapeutici.

In Tab. 2 sono riportate le principali classi di polimeri utilizzati per la preparazione di bioconiugati per il direzionamento passivo ed attivo. Tali materiali possono essere naturali, semisintetici o sintetici, con diversa composizione chimica, dimensione, stabilità solubilità, struttura (lineare, ramificata o dendritica in Fig. 2) e capacità di disperdersi in soluzione

Poliesteri	Polieteri	Poliacrilili	Polipeptidi	Polisaccaridi	Poliammidi
Polilattidi	Polossameri	Polimetacrilati	Poliglutammino	Destrano	Poliammidoammine
Polilattidi-co-glicolidi	PEG	Poliacrilammidi	Poliaspartico	Eparina	
Policaprolattoni		Poliacrilati	Polilisine	Chitosano	

Tab. 2 - Principali classi di polimeri utilizzati per la preparazione di bioconiugati

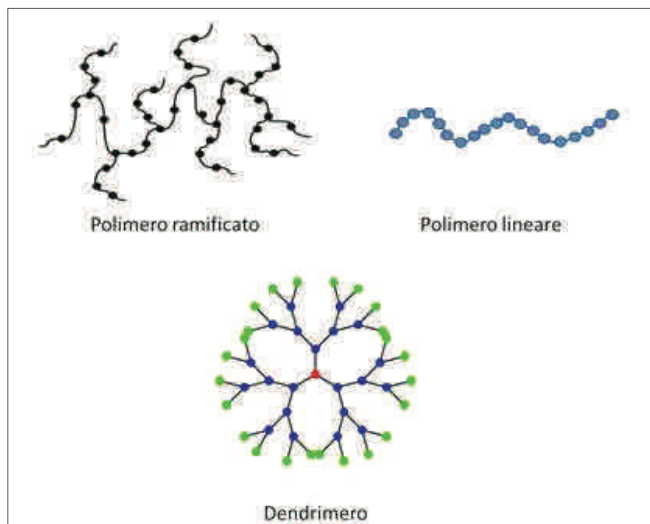


Fig. 2 - Strutture di polimeri

come singoli unimeri o autoassemblarsi formando sistemi colloidali di tipo nanoparticellare o micellare.

Le caratteristiche principali dei polimeri per la preparazione di bioconjugati polimerici sono:

- multivalenza per consentire la coniugazione delle altre funzioni molecolari (farmaci, agenti direzionanti, modulatori chimico-fisici e biofarmaceutici);
- solubilità;
- biocompatibilità sistemica e locale;
- inerzia biologica;
- eliminabilità.

Per essere eliminato un polimero deve avere un peso molecolare non troppo elevato, oppure deve essere preliminarmente degradato in frammenti. In generale, i polisaccaridi, ampiamente usati nella veicolazione di farmaci, hanno un'intrinseca affinità per le cellule epatiche e per questo tendono ad accumularsi rapidamente e massivamente nel fegato, rendendo il loro impiego complicato. L'acido ialuronico è un polimero della matrice extracellulare ubiquitario coinvolto in numerosi processi biologici, come ad esempio nella proliferazione cellulare. Poiché l'acido ialuronico è in grado di riconoscere selettivamente il recettore di membrana CD44 espresso in numerose cellule tumorali, ha di per sé interessanti caratteristiche direzionanti. Tuttavia la sua attività biologica a livello tumorale, come ad esempio l'effetto metastatico dovuto alla sua azione sulla mobilità cellulare, può rappresentare un limite al suo impiego.

Per quanto riguarda le modifiche alla struttura polimerica con modulatori delle caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche, al *backbone* vengono spesso coniugate molecole che aumentano la solubilità della struttura macromolecolare in modo da bilanciare l'idrofobicità impartita dal legame di molte molecole di farmaco. Altri modulatori sono molecole che rispondono a stimoli endogeni o esogeni microambientali che inducono variazioni di struttura in funzione del pH o della temperatura e promotori della permeabilità cellulare.

Un aspetto particolarmente rilevante nella costruzione dei bioconjugati polimerici è la modalità di coniugazione del farmaco al *backbone* polimerico. Usualmente il bioconjugato è un profarmaco macromolecolare inattivo

che deve rilasciare il farmaco per svolgere la sua azione terapeutica. Pertanto il farmaco viene coniugato direttamente o attraverso selezionati *linker* attraverso legami idrolizzabili. In questo senso sono state sviluppate numerose strategie di coniugazione attraverso semplici legami amidici ed esterei con diverse cinetiche di rilascio del farmaco.

Legami disolfuro sono stati proposti sulla base dell'evidenza che il potere riducente intracellulare è maggiore di quello extracellulare per la presenza dell'elevata concentrazione di glutazione che consente il rapido rilascio del farmaco. Particolarmente interessanti sono i legami pH sensibili, come i legami acetalici e idrazonici che vengono scissi in condizioni acide. Questo tipo di coniugazione viene in particolare utilizzato per il rilascio del farmaco nella massa tumorale in cui il pH è debolmente acido (pH≈6,5) e nella cellula a livello lisosomiale (pH≈4,5).

Nella tecnologia PDEPT (*Polymer Directed Enzyme Prodrug Therapy*), legami più complessi ma altamente specifici sono realizzati con l'impiego di brevi sequenze peptidiche riconosciute selettivamente da enzimi, come ad esempio la sequenza Gly-Phe-Leu-Gly selettivamente riconosciuta e idrolizzata da catepsina B nel compartimento lisosomiale.

Idrossipropil-metacrilammide (HPMA) è stato uno dei primi polimeri utilizzati per la realizzazione di bioconjugati per il direccionamento attivo di farmaci attraverso la tecnologia PDEPT. Questo polimero non degradabile è stato funzionalizzato con vari agenti direzionanti tra cui con MoAb, Fab', lectine, galattosio, acido folico per il direccionamento a diversi tipi di cellule tumorali, mentre i chemioterapici sono stati coniugati al *backbone* polimerico con peptidi degradabili per via enzimatica.

Nonostante la loro tossicità, le polietilenimine sono state ampiamente utilizzate per la veicolazione di farmaci oligonucleotidici con cui si possono facilmente associare con legami di carica. Con lo stesso principio sono stati preparati bioconjugati di polietilenimina con aptameri e siRNA.

Polimeri auto-aggreganti, quali PEG-PLGA, PEG-PLA, Pluorinic, PEG-PE e PEG-PCL, sono stati derivatizzati con diversi agenti direzionanti, come ad esempio acido folico, RGD, zuccheri (galattosio, mannosio, glucosio, lattosio), aptameri e anticorpi per la veicolazione di farmaci antitumorali. Tra i polimeri polisaccaridici, numerosi studi sono stati condotti con acido ialuronico a basso peso molecolare che è di per sé direzionato a cellule linfatiche CD44+, ma anche con polimeri inerti, quali destrano, chitosano e pullulano. Con quest'ultimo in particolare sono stati preparati bioconjugati pullulano modificato con alendronato alle metastasi ossee del tumore al seno, che si manifestano con grande frequenza negli stadi avanzati della patologia, e pullulano modificato con acido folico direzionato a cellule tumorali che sovraesprimono questo recettore.

### Bioconjugati polimerici vs bioconjugati-liposomiali

Come riportato sopra, le piattaforme tecnologiche oggi disponibili consentono di progettare vari tipi di bioconjugati colloidali per il direccionamento attivo di farmaci, che differiscono per materiali, struttura supra-molecolare, dimensione, forma, quantità e modalità di caricamento del farmaco, modalità di coniugazione del direzionante ecc. La fase di progettazione sulla base di un'analisi preliminare degli elementi fondamentali del sistema, anche attraverso una valutazione *in silico*, rappresenta un punto chiave per l'ottenimento del prodotto con le caratteristiche richieste. Tuttavia, la complessità di questi sistemi rende complicato un esaustivo esame di tutte le variabili che possono influenzare l'efficacia terapeutica del prodotto finale. Ad esempio, è difficile conoscere a prio-

ri con buona approssimazione il grado di derivatizzazione ottimale per il direzionamento, la quantità di farmaco che deve essere caricata nel sistema e la cinetica con cui viene rilasciato nel sito d'azione. Inoltre il profilo biofarmaceutico del prodotto finale è determinato dall'insieme delle caratteristiche chimico-fisiche dei singoli moduli che compongono il sistema supramolecolare. Pertanto, la progettazione di un bioconjugato per il *drug delivery* è generalmente basata su dati sperimentali di letteratura con un approccio empirico.

Sulla base di queste considerazioni, è possibile concludere che è difficile prevedere il sistema più efficiente tra le varie piattaforme proposte. È inoltre complicato confrontare sistemi strutturalmente molto diversi tra loro per raccogliere informazioni sull'effetto che i singoli elementi strutturali possono avere sulla performance dei diversi prodotti. Invece, studi comparativi possono essere svolti per esaminare a valle la diversa performance terapeutica in modelli *in vivo*.

Uno studio comparativo fra bioconjugati strutturalmente diversi tra loro è stato condotto utilizzando pullulano funzionalizzato con acido folico per il direzionamento a cellule tumorali e covalentemente coniugato con doxorubicina attraverso un legame acido-sensibile e liposomi PEGilati funzionalizzati sulla superficie con acido folico e caricati con doxorubicina (Doxil folato), Fig. 3.

Lo studio *in vitro* ha dimostrato che il sistema liposomiale ha una spiccata selettività per le cellule tumorali, contrariamente al prodotto polimerico che è risultato poco selettivo. Studi *in vivo* condotti con modelli animali in cui era stato impiantato un tumore sovraesprimente il recettore dell'acido folico hanno invece dimostrato che i due bioconjugati hanno un profilo di efficacia e tossicità che dipendono dal protocollo di somministrazione. Nel caso di somministrazione singola i liposomi sono risultati molto più efficaci del bioconjugato polimerico. Nel caso invece di somministrazioni multiple, l'elevata tossicità dei liposomi ne impedisce l'impiego mentre il bioconjugato polimerico è risultato avere un'eccezionale attività antitumorale.

### Direzionamento al sistema nervoso centrale

Tra gli agenti direzionanti al sistema nervoso centrale (SNC) vi sono numerose molecole e macromolecole con diversa complessità strutturale e composizione chimica come ad esempio zuccheri, purine, amminoacidi, e proteine.

Transferrina e scF<sub>v</sub>, anti recettore della transferrina, sono stati largamente utilizzati per trasportare sistemi colloidali al SNC attraverso un processo attivo di transitosi. Grazie alla tecnologia di *phage-display* sono stati sviluppati anche piccoli ligandi peptidici di 7-12 aminoacidi che legano selettivamente il recettore di transferrina.

Insulina è un altro polipeptide utilizzato come agente direzionante per *drug delivery* al SNC. Tuttavia, come nel caso della transferrina, per ottenere una concentrazione terapeutica di farmaco è necessaria una elevata quantità di direzionante che risulta essere tossica. Pertanto, in alternativa ad insulina può essere usato un MoAb che riconosce il recettore di insulina. Questo anticorpo è stato utilizzato per la preparazione di immunoliposomi sia per il *gene delivery* che per il *drug delivery*.

I recettori megalinici (glicoproteina 330) LRP1 and LRP2 sono stati utilizzati come bersaglio per il *delivery* al SNC in modo analogo ad insulina e transferrina. Agenti *targeting* per questi recettori includono numerose molecole con singolari diversità e complessità strutturali. BioMarin Pharmaceuticals Inc. ha sviluppato NeuroTrans™, una tecnologia basta

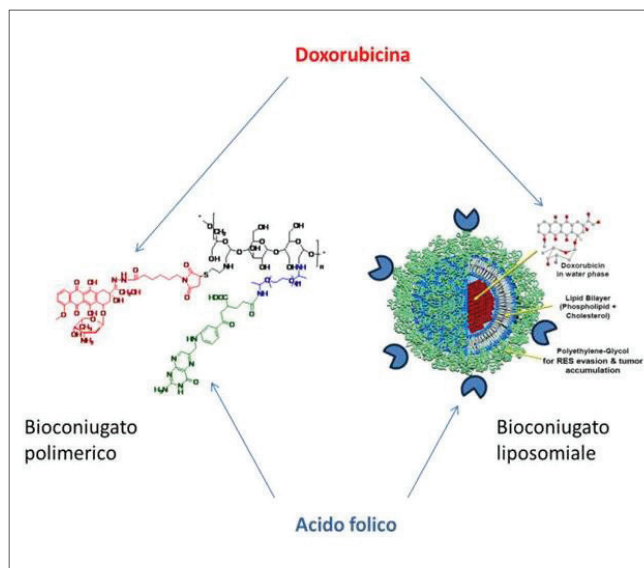


Fig. 3 - Bioconjugato polimerico acido folico-pullulano-doxorubicina e immunoconjugato acido folico-liposoma PEGilato-doxorubicina

sull'uso di melanotransferrina per veicolare selettivamente farmaci al SNC attraverso i recettori LRP. Con questa tecnologia sono stati sviluppati sistemi colloidali per veicolare doxorubicina a tumori cerebrali ed enzimi per terapie sostitutive. BioMarin ha sviluppato anche sistemi di *delivery* selettivo basati sull'uso dell'agente direzionante RAP, una proteina di 39 kDa *chaperone* che induce il *foldig* e *trafficking* dei recettori per LDL.

### Conclusioni

La tecnologia della bioconiugazione consente oggi di ottenere nuovi sistemi complessi supramolecolari multifunzionali per il direzionamento attivo di farmaci. Tali bioconjugati trovano particolare impiego per veicolare farmaci a tessuti ed organi poco raggiungibili dai farmaci, come il sistema nervoso centrale, e per il *delivery* di molecole con un basso indice terapeutico che può portare ad un'elevata tossicità sistemica. Tuttavia, sebbene l'uso dei bioconjugati per il direzionamento attivo di farmaci presenti evidenti vantaggi rispetto alle forme farmaceutiche tradizionali, a causa della complessità strutturale lo sviluppo di prodotti efficienti richiede una attenta e complessa progettazione e caratterizzazione. Pertanto, la sfida tecnologica che l'industria farmaceutica è chiamata a raccogliere per poter proporre sistemi terapeutici innovativi è lo sviluppo di prodotti non solo efficaci ma anche semplici e ben caratterizzati facilmente ottenibili a livello industriale con costi contenuti.

### Bioconjugates in Drugs Active Delivery

To date, an arsenal of colloidal formulations have been developed to deliver fragile and poorly soluble drugs, as well as therapeutics with limited ability to cross the biological barriers and reach the disease site. More recently, colloidal drug delivery systems have been harnessed with targeting agents to yield active recognition of specific cellular or subcellular targets and accumulate in the disease site where the drug is released.





# Specialists in gaskets

# TEXPACK®

Richiedete il nuovo catalogo generale al nostro Customer Service

Texpack® srl - unipersonale

Azienda certificata UNI EN ISO 9001: 2008

Via Galileo Galilei, 24 - 25030 Adro (BS) Italia

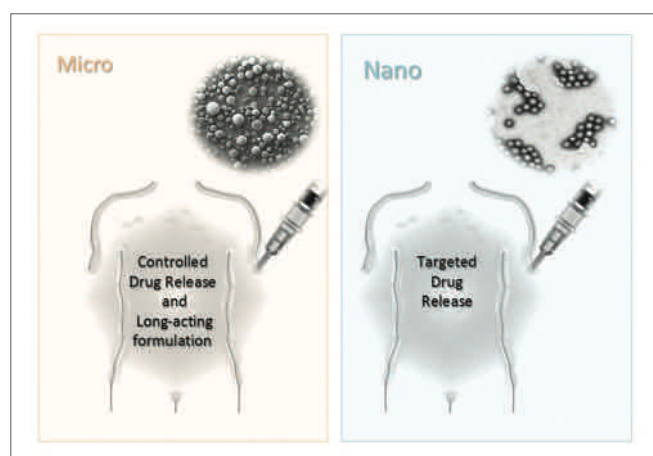
Tel. +39 030 7480168 - Fax +39 030 7480201

info@texpack.it - www.texpack.it



# SISTEMI TERAPEUTICI MICRO E NANOPARTICELLARI INIETTABILI

Attualmente l'area del drug delivery ha raggiunto un ragguardevole sviluppo ed i sistemi terapeutici innovativi, alcuni dei quali consolidati ed ormai sul mercato, altri tuttora in studio, hanno portato a diversi miglioramenti nelle terapie, quali incremento nell'efficacia e diminuzione degli effetti collaterali e tossici di farmaci. L'articolo prende in esame due sistemi terapeutici iniettabili: microsfeere e nanoparticelle costituite da poli-alfa-idrossiacidi.



I termine drug delivery si riferisce a sistemi terapeutici progettati e sviluppati per rilasciare il principio attivo nelle quantità e nei tempi necessari ad ottimizzarne l'azione terapeutica, nonché direttamente al sito d'azione. La tecnologia dei sistemi terapeutici permette quindi di ottimizzare l'efficacia terapeutica di un attivo, diminuendone gli effetti collaterali e migliorandone la *compliance* da parte del paziente. Tutto ciò porta a degli innegabili vantaggi, soprattutto per quei principi attivi che presentano criticità dovute alla loro bassa solubilità e stabilità e, come accade spesso per i nuovi attivi di origine biotecnologica, con elevata attività.

L'importanza dei sistemi terapeutici è nota e consolidata. I primi studi in questo ambito, attorno al 1960, evidenziano l'utilità di ottenere un rilascio costante di farmaci per anestesia [1]. Langer e Folkman sono stati tra i primi ricercatori ad ottenere il rilascio controllato di macromolecole con attività anticancro ed a dimostrarne i vantaggi nella terapia oncologica [2]. Negli anni Ottanta del XX secolo si sviluppa in modo

esponenziale la ricerca su sistemi terapeutici microparticellari per rilascio controllato di farmaci, finalizzata soprattutto ad ottenere sistemi terapeutici in grado di promuovere cinetiche di rilascio costanti di ordine zero. Tali studi portano allo sviluppo, a partire dagli anni Novanta, di sistemi terapeutici e prodotti farmaceutici caratterizzati da dimensioni micrometriche. Contemporaneamente, sempre in questo periodo, nascono gli studi su sistemi terapeutici di dimensioni nanometriche.

La letteratura è estremamente ampia e si riferisce in particolare a: sistemi microparticellari a base polimerica, sistemi vescicolari (liposomi) a base fosfolipidica, micelle, polimeri dendritici multifunzionali, cristalli liquidi, nanocapsule e nanosfere (Fig. 1). Data la numerosità e la varietà dei sistemi terapeutici in studio, questa breve review foca-

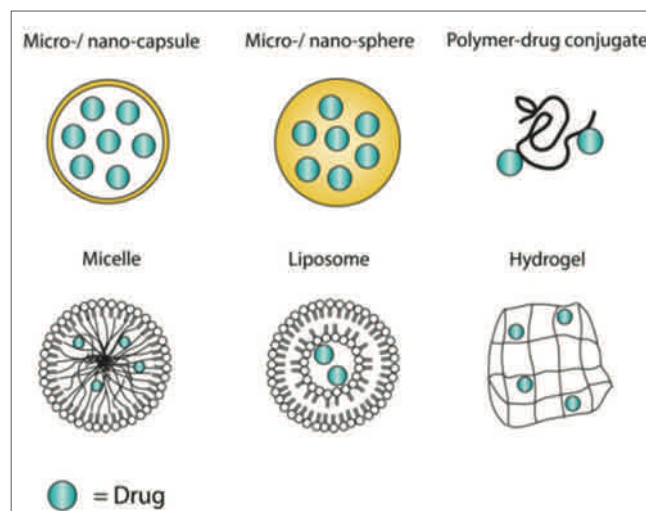


Fig. 1 - Differenti strutture di sistemi terapeutici micro e nano dimensionati (da M. Jansen, 2014)



lizza l'attenzione ai sistemi terapeutici micro e nanoparticellari a base di poli-alfa-idrossiacidi, loro derivati e copolimeri per uso iniettabile. Questi polimeri hanno ottenuto un ampio riscontro come prodotti farmaceutici in commercio. Il polimero gioca un ruolo fondamentale nella progettazione di un sistema micro e nanoparticellare perché permette di modulare la farmacocinetica e la sitospecificità del sistema terapeutico e quindi del farmaco [3]. In particolare, nel caso di sistemi terapeutici per somministrazione iniettabile biodegradabilità e biocompatibilità del polimero rappresentano dei requisiti essenziali unitamente alla sterilità del prodotto finito.

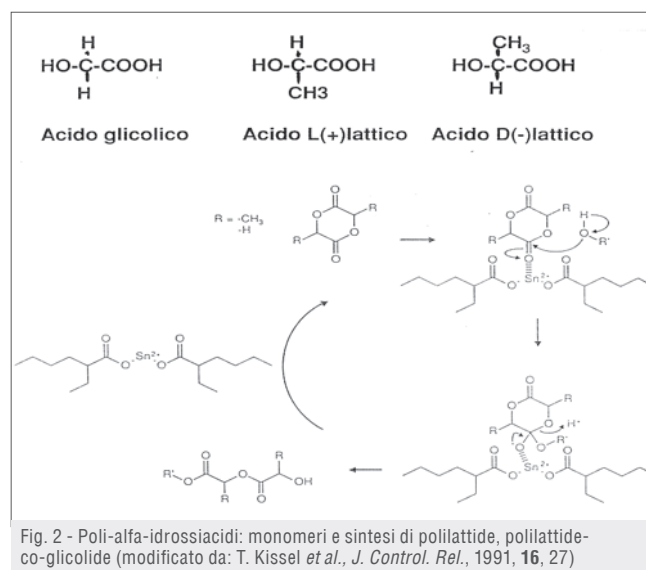
In questi anni si è passati da sistemi terapeutici in grado di agire come *carriers* passivi con prevalente funzione di rilascio prolungato dell'attivo e di protezione dello stesso con aumento della sua stabilità (sistemi di prima generazione), a sistemi terapeutici sensibili a stimoli fisiologici (sistemi di seconda generazione) ed a sistemi in grado di direzionare attivamente il farmaco e rilasciarlo al sito d'azione (terza generazione). La distinzione tra micro e nanoparticelle fa riferimento alla dimensione del carrier, rispettivamente micrometrica e nanometrica. Va tuttavia considerato che la differenza dimensionale determina differenze a molti livelli, dalla formulazione, all'impiego *in vivo*, al meccanismo d'azione del sistema terapeutico.

Particolare importanza rivestono gli studi relativi alle tecniche di preparazione e successivo scale-up per la fabbricazione industriale di sistemi terapeutici micro e nanoparticellari. Infatti il metodo di fabbricazione deve essere studiato opportunamente in funzione del polimero e del farmaco impiegati, in modo da garantire l'uniforme distribuzione del farmaco nella matrice polimerica, l'incapsulazione di una congruente quantità di farmaco, una buona resa di processo. Inoltre deve essere un metodo di preparazione che garantisca la riproducibilità del processo e sia facilmente scalabile a livello industriale. Lo scale-up risulta particolarmente critico nella produzione industriale di sistemi terapeutici nanoparticellari. I metodi tradizionali per la preparazione di micro e nanoparticelle sono molteplici, quali: emulsione (singola o doppia) con evaporazione del solvente, spray-drying, solvent displacement. Metodi di preparazione innovativi ed attualmente in fase di studio sono: microfluidic based nanoassembler, electrospinning. Saranno qui discussi i seguenti aspetti relativi a sistemi terapeutici micro e nanoparticellari a base di poli-alfa-idrossiacidi: tipi di polimeri e caratteristiche che ne influenzano la scelta e l'impiego; microsfe, caratteristiche, metodi di produzione, sterilità e problematiche legate alla sterilizzazione, prodotti in commercio; nanoparticelle, caratteristiche, metodi di preparazione, criticità principali, prodotti in studio ed in commercio.

### I poliesteri biodegradabili

Polilattide e polilattide-co-glicolide sono stati in assoluto i polimeri biodegradabili di sintesi più studiati nello sviluppo di micro e nanoparticelle per il drug delivery, date le loro proprietà molto vantaggiose quali: l'elevata biocompatibilità, l'assenza di potenziali rischi di trasmissione di infezioni, assenza di reazioni immunologiche, approvazione FDA per l'uso nell'uomo, biodegradazione modulabile [4, 5].

L'acido polilattico (PLA) a basso peso molecolare si può ottenere per policondensazione dell'acido lattico, che a sua volta è prodotto per fermentazione batterica di zuccheri estratti da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento [6]. Questo tipo di reazione non permette di ottenere polimeri con pesi molecolari elevati né di con-



trollare la stereoregolarità della catena polimerica. Pertanto, per sintetizzare PLA ad elevato peso molecolare (>10.000 Da) si utilizza una reazione di polimerizzazione per apertura dell'anello del dimero dilattide in presenza di un catalizzatore, quale lo stagno octoato o l'alluminio.

In generale la nomenclatura differenzia i polimeri ottenuti dall'acido lattico per policondensazione, definiti acido polilattico, da quelli ottenuti per polimerizzazione del lattide, definiti polilattidi. Con sintesi simile, partendo da lattide e glicolide ciclici, si produce il copolimero polilattide-co-glicolide (PLGA) (Fig. 2). Gli studi preliminari nel campo del drug delivery considerarono anche l'acido poliglicolico (PGA), un polimero ugualmente biodegradabile e biocompatibile, altamente cristallino, scarsamente solubile in solventi organici [6, 7]. La rapida degradazione in soluzione acquosa o *in vivo* del PGA (circa 2 settimane a seconda del peso molecolare) unitamente alla solubilità dello stesso solo in solventi organici altamente tossici, quali esafluoroisopropanolo (HFIP) ed esafluoroacetone sesquidrato (HFASH), ne ha limitato l'uso per problemi legati alla produzione su larga scala ed alla scarsa stabilità dei sistemi microparticellari.

PLA e PLGA sono polimeri termoplastici, vetrosi a temperatura ambiente e con una temperatura di transizione vetrosa nell'intervallo compreso tra 45-60 °C. La degradazione dei poli-alfa-idrossiacidi avviene per scissione idrolitica casuale della catena polimerica, i monomeri acido lattico ed acido glicolico generati dal processo di degradazione entrano nel ciclo di Krebs e vengono eliminati mediante le normali vie metaboliche. La velocità di degradazione di questi polimeri può essere estremamente lenta (fino a 6-8 mesi), essa dipende dal peso molecolare del polimero, dalla sua composizione (nel caso del copolimero) e dalla percentuale di cristallinità della molecola. L'acido poli-D,L-lattico (PDLLA) è un polimero amorfo mentre il poli-L,L-lattico (PLLA) è cristallino, ne consegue che, a parità di peso molecolare il PDLLA degrada più rapidamente rispetto al PLLA. Anche se i poli-alfa-idrossiacidi si definiscono generalmente idrofobi, la presenza dell'acido glicolico nella molecola del polilattide-co-glicolide rende quest'ultimo meno idrofobo. L'idrofilia del copolimero e, di conseguenza, in parte anche la sua velocità di degradazione, aumentano all'aumentare della percentuale di



Nome commerciale	Produttore	Polimero	Principio attivo	Indicazione terapeutica	Intervallo di somministrazione
Enantone 3,75, 11,75 (Lupron Depot® in USA)	Takeda	PLA o PLGA	Leuprolide	Cancro alla prostata	1, 3, 4, 6, mesi
Trelstar™ Depot	Pfizer	PLGA	Triptorelina	Cancro alla prostata	1 mese
Decapeptyl® SR	Ipsen-Beaufour	PLA o PLGA	Triptorelina	Cancro alla prostata	1-3 mesi
Suprecur® MP	Aventis	PLGA	Buserelina	Cancro alla prostata	2-3 mesi
Nutropin Depot®	Genentech	PLGA	Ormone della crescita (HGH)	Deficienza nella crescita	15 giorni
Sandostatin® LAR	Novartis	PLGA-glucose	Octreotide	Acromegalia	1 mese
Somatuline® LA	Ipsen-Beaufour	PLGA	Lancreotide	Acromegalia	10-28 giorni
Parlodel SRO		PLGA	Bromocriptina	Iperprolattinemia	1 mese
Arestin®	OraPharma	PLGA	Minociclina	Periodontite	>21 giorni
Risperdal Consta®	Janssen Pharmaceutica	PLGA	Risperidone	Schizofrenia	15 giorni
Bydureon®	Astra Zeneca	PLGA	Exanetide	Diabete tipo2	1 settimana
Vivitrol®	Alkermes Inc.	PLGA	Naltrexone	Alcolismo	mese

Tab. 1 - Prodotti farmaceutici in commercio, in Europa e Stati Uniti, costituiti da microsfele di PLA and PLGA (l'elenco non è esaustivo)

acido glicolico presente nella molecola.

Poli-alfa-idrossiacidi di grado medico, altamente purificati, molto noti ed utilizzati per la produzione di microsfele iniettabili sono i Resomer®, prodotti a livello mondiale da Evonik. Diversi studi hanno riguardato modifiche chimiche dei poli-alfa-idrossiacidi focalizzate a permettere un rilascio di farmaco più controllato, evitando il *burst effect*, come per esempio i poli-alfa-idrossiacidi ramificati in cui le catene polimeriche sono legate ad un nucleo centrale costituito da una molecola di glucosio, mannitolo, β-ciclodestrina [8], o polilattide legato a poli(ammido-ammina) dendrimeri [9].

Di particolare interesse risultano i poli-alfa-idrossiacidi pegilati (PEG), quali i copolimeri a blocchi PLA-PEG e PLGA-PEG, la presenza delle catene di PEG conferisce proprietà *stealth* alle micro e nano-particelle [10-12]. Questa strategia permette di modulare ulteriormente l'attività del sistema terapeutico in quanto la micro-nanoparticella a base di PLA-PEG viene fagocitata più lentamente dai macrofagi e permettendo di prolungare ulteriormente l'effetto del farmaco.

**Microsfele**

I sistemi microparticellari biodegradabili a base di poli-alfa-idrossiacidi per uso iniettabile sono a tutti gli effetti dei sistemi depot iniettabili che permettono di ottenere rilasci di farmaco estremamente prolungati, fino a 3 mesi. La letteratura in questo ambito è estremamente ampia e si è sviluppata maggiormente dagli anni Ottanta del XX secolo. Questi studi hanno portato all'immissione

in commercio di diversi prodotti farmaceutici, come riportato in Tab. 1. Si tratta di prodotti prevalentemente per la terapia oncologica o per terapie ormonali, che veicolano molecole di natura peptidica/proteica con ridotta emivita plasmatica. La somministrazione avviene per iniezione intramuscolare, ad eccezione del prodotto Arestin che prevede somministrazione locale nella tasca periodontale. Il termine microsfele, utilizzato per identificare questi sistemi microparticellari, sta ad indicare la loro struttura a matrice polimerica, all'interno della quale è omogeneamente disperso il principio attivo solido o solubilizzato (soluzione solida), e si differenzia dal termine microcapsule utilizzato per indicare

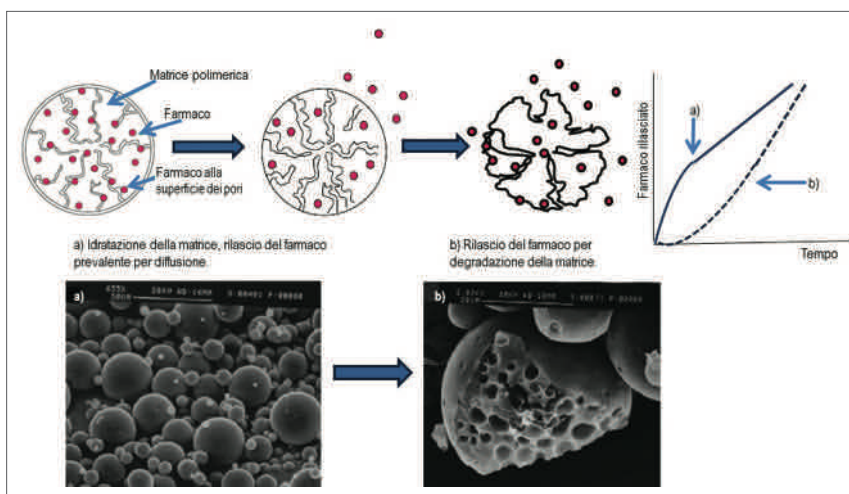


Fig. 3 - Meccanismi di rilascio di farmaci da microsfele di poli-alfa-idrossiacidi. Immagini al microscopio elettronico (SEM) di microsfele di PLA: a) immediatamente dopo incubazione; b) dopo 20 giorni di incubazione in condizioni fisiologiche simulate



i sistemi microparticellari costituiti da una membrana polimerica all'interno della quale è presente il principio attivo. Il termine microsfera si riferisce a particelle di dimensione comprese tra 1-1000  $\mu\text{m}$ , la dimensione particellare rappresenta un parametro critico in quanto:

- i) influenza la velocità ed i tempi di cessione del principio attivo;
- ii) deve essere controllato e dimensionato in funzione della modalità di somministrazione della formulazione iniettabile.

Per iniezione intramuscolare (i.m.) e sottocutanea (s.c.) si utilizzano microsfele di dimensione compresa tra 50-100  $\mu\text{m}$ , l'iniezione intraarteriale utilizzata nella chemioembolizzazione richiede microsfele di dimensioni maggiori (300-500  $\mu\text{m}$ ).

Data la sensibilità all'umidità dei poli-alfa-idrossiacidi, una criticità è la stabilità allo stoccaggio della formulazione microparticellare. I prodotti farmaceutici sono perciò formulati e commercializzati come polvere o liofilizzato da risospesione estemporaneamente; generalmente la formulazione è costituita dalle microsfele, da un agente sospendente (es. carbossimetil cellulosa) e/o un agente formante massa e da un crioprotettore (es. PVP).

Il rilascio del farmaco da microsfele biodegradabili a base di poli-alfa-idrossiacidi avviene con due meccanismi che intervengono a tempi diversi dopo la somministrazione (Fig. 3): diffusione dell'attivo dalla matrice polimerica e degradazione della stessa. Nella prima fase, a seguito dell'iniezione, la microsfera si idrata ed il principio attivo viene ceduto per diffusione. Questa fase di rilascio è regolata dalla solubilità in acqua del principio attivo e dalla sua presenza nella zona superficiale della matrice polimerica; quest'ultima può portare al "burst effect", cioè al rilascio entro le prime 6 ore dalla somministrazione di una quantità di farmaco anche  $\geq 20\%$  del contenuto totale.

Nella seconda fase la diffusione del farmaco è influenzata dalla degradazione della matrice polimerica della microsfera. La velocità con cui compare e procede la degradazione della matrice polimerica dipende dalle proprietà del polimero utilizzato (peso molecolare e composizione del polimero) e dalla porosità della matrice e dalla dimensione delle microsfele. Questi parametri devono essere definiti in fase di progettazione del sistema microparticellare e sono controllabili selezionando il metodo di produzione e condizioni di processo idonee.

Diversi metodi sono stati studiati per la preparazione di microsfele a base di poli-alfa-idrossiacidi, quali: emulsione (singola o doppia) con evaporazione del solvente, spray-drying, spray congealing, separazione di fase, estrusione, criomacinazione, fluidi supercritici. Tutti i metodi di fabbricazione, ad eccezione di estrusione, criomacinazione, fluidi supercritici, coinvolgono l'impiego di solventi organici a volte tossici (es. cloruro di metilene, classe 2 Linee Guida ICH) e sottopongono polimero e principio attivo a condizioni relativamente stressanti (emulsione, spray drying) che possono portare a degradazione dell'attivo. L'ottenimento del requisito di sterilità, richiesto per prodotti iniettabili, rappresenta una criticità per questi sistemi terapeutici. Infatti non è possibile sottoporre le microsfele a sterilizzazione terminale con calore in quanto il polimero è sensibile a tale trattamento. Una possibilità è la lavorazione in asepsi partendo da materie prime sterili, operatività complessa e non consigliata dalla linee guida EMA. Un'altra possibilità è la sterilizzazione terminale del prodotto finito con radiazioni ionizzanti gamma o beta. Vari ed approfonditi studi sull'effetto della sterilizzazione con radiazioni ionizzanti [13] hanno evidenziato una relativa sensibilità dei poli-alfa-idrossiacidi all'irraggiamento che porta ad una

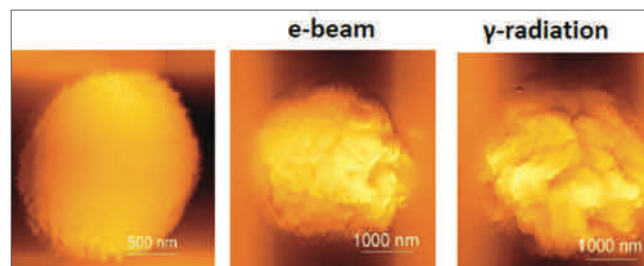


Fig. 4 - Immagini AFM di microsfele di PLGA: a) non irraggiate, b) dopo irraggiamento  $\beta$ , c) dopo irraggiamento  $\gamma$  (da: L. Montanari et al., 2003)

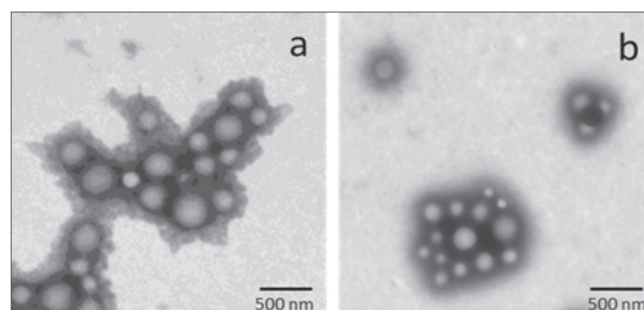


Fig. 5 - Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di nanoparticelle di PLGA: a) prima della liofilizzazione, b) dopo liofilizzazione

riduzione del peso molecolare del polimero con aumento della modifica della velocità di idrolisi e della morfologia superficiale delle microsfele, rendendola più rugosa, come evidenziato dai risultati di analisi AFM riportati in Fig. 4 [14]. Di conseguenza il processo di sterilizzazione per irraggiamento può influenzare la velocità di cessione del principio attivo [11, 15-17] ed in alcuni casi il principio attivo può interagire con il polimero, agendo come radical scavenger e riducendone l'entità della degradazione [18].

### Nanoparticelle a base di poli-alfa-idrossiacidi

I sistemi terapeutici nanoparticellari rappresentano attualmente l'ultima frontiera del drug delivery. Sono costituiti da particelle solide, colloidali di dimensione variabile da 10 nm a 1.000 nm (Fig. 5). Oltre ai vantaggi noti già evidenziati per le microsfele, la peculiarità ed il grande potenziale vantaggio di questi sistemi è la possibilità del loro direccionamento al sito d'azione e il trasporto intracellulare di attivi.

Le microsfele (25-100 micron) dopo iniezione tendono a rimanere nel sito di iniezione ed a cedere il principio attivo con la progettata cinetica, o si direccionano passivamente ad alcuni organi preferenziali (es. fegato e polmoni) in funzione della loro dimensione. Questa proprietà è sfruttata, per esempio per occludere i vasi nella chemioembolizzazione di carcinomi epatocellulari.

La dimensione delle nanoparticelle determina la distribuzione delle stesse *in vivo*: nanocarriers di dimensione 1-20 nm hanno tempi di permanenza nell'organismo lunghi con lenta extravasazione dal sistema circolatorio; quelli di dimensione tra 30-100 nm sono sufficientemente piccole da evitare la fagocitosi da parte del sistema reticolendoteliale, mentre per dimensioni maggiori si ha un'efficiente clearance attraverso tale sistema.

La funzionalizzazione di superficie dei sistemi nanoparticellari consente di controllare l'estensione della localizzazione ai siti interstiziali e

limitarne la *clearance*. Per esempio nanoparticelle pegilate (a base di PLGA-PEG) possono divenire sistemi di deposito circolanti di farmaco. La distribuzione *in vivo*, al sito d'azione, e l'efficacia terapeutica di nanoparticelle cariche di farmaco dipende anche dalla cinetica di rilascio del farmaco dal carrier, che deve essere progettata e controllata in modo che la nanoparticella ceda il farmaco solo una volta che ha raggiunto il sito d'azione. Questo parametro è fondamentale per l'efficacia della terapia. La piccola dimensione determina un elevato rapporto superficie/volume delle nanoparticelle rispetto alle microsfele, cosa che può modificare la farmacocinetica dell'attivo contenuto nelle nanoparticelle con conseguenti cinetiche di rilascio più rapide rispetto a microsfele costituite dallo stesso polimero. Questo fattore va considerato attentamente nella progettazione di sistemi nanoparticellari.

Alterazioni dell'endotelio possono modificare i parametri di distribuzione delle nanoparticelle. Stati infiammatori, tumori solidi e rottura deliberata dell'endotelio possono contribuire a creare dei varchi che facilitano l'accesso delle nanoparticelle a bersagli extravascolari. Nanoparticelle di dimensioni 100-150 nm tendono ad accumularsi nei tessuti tumorali a causa delle più ampie fenestrate del tessuto tumorale. Questo meccanismo passivo di direzionamento selettivo delle nanoparticelle nei tessuti tumorali è stato molto studiato e sfruttato nella formulazione di antitumorali [19].

In generale, il direzionamento passivo di nanoparticelle sfrutta la presenza di barriere fisiologiche che agiscono da filtri.

Il direzionamento attivo delle nanoparticelle ad un determinato sito d'azione è stato ampiamente investigato legando alla superficie della nanoparticella polimerica un marker biologico, come il peptide RGD, un anticorpo o un aptamero; la stessa molecola di direzionamento attivo può svolgere un'azione sinergica ed implementare il meccanismo di direzionamento passivo. Questo risulta particolarmente importante nella somministrazione di chemioterapici, la cui tossicità spesso ne limita il dosaggio con conseguente diminuita efficacia. I sistemi nanoparticellari, data la loro capacità di veicolare molecole anche complesse nei principali siti di metastasi come fegato, polmoni, linfonodi, presentano molte potenzialità in diagnosi e terapia di tumori metastatici. Il direzionamento di nanoparticelle polimeriche può essere ottenuto per sintesi di nanoparticelle direzionate biointegrate che, combinando polimeri con biomolecole quali peptidi, proteine o anticorpi monoclonali, permettono la progettazione di sistemi in scala nanometrica precisi e utili nel trattamento di patologie, quali il cancro e malattie di origine immunologica. La combinazione di biomolecole si può ottenere per adsorbimento, coniugazione o incapsulazione in materiali polimerici, può determinare l'uptake cellulare selettivo delle nanoparticelle con controllo della farmacocinetica, dell'attività e della sicurezza del sistema. La coniugazione chimica di peptidi/proteine a polimeri porta ad ingegnerizzazione precisa della superficie di nanoparticelle ed è un approccio promettente per formulare in modo riproducibile nanoparticelle direzionate.

Le procedure di coniugazione e purificazione di biomateriali prefunzionalizzati sono facilmente scalabili con buona riproducibilità da lotto a lotto. La sfida principale di questi materiali "intelligenti" è l'interazione ottimale dei parametri biochimico-fisici che conferiscono il direzionamento molecolare, l'evasione dal sistema immunitario e il rilascio del farmaco idoneo al superamento delle barriere fisiologiche *in vivo* [20]. I metodi di preparazione delle nanoparticelle di poli-alfa-idrossiacidi si basano sulla variazione della solubilità del polimero in diversi sol-

venti che ne determina la precipitazione controllata ed, in generale, presentano criticità nello scale up industriale a causa principalmente delle basse rese di produzione. Alcuni nuovi metodi di produzione più facilmente scalabili e che permettano una maggiore riproducibilità di processo sono attualmente in studio, quali un metodo che si basa sulla tecnologia microfluidica [21] ed uno ottenuto modificando la tecnica di electrospinning [22].

La formulazione del prodotto finito deve prevedere la liofilizzazione delle nanoparticelle per ottenere un prodotto stabile nel tempo, facilmente conservabile e risospesibile al momento dell'uso (Fig. 5). Anche questa fase di produzione va studiata e ottimizzata in funzione delle caratteristiche delle nanoparticelle.

Nonostante le numerose pubblicazioni scientifiche, non sono ancora in commercio prodotti farmaceutici a base di nanoparticelle di poli-alfa-idrossiacidi, mentre sono in commercio alcuni prodotti costituiti da nanoparticelle a base di albumina (Ambraxane®) con paclitaxel per la terapia oncologica (cancro al seno, polmoni e metastasi pancreatiche).

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] A.S. Hoffman, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 153.
- [2] R. Langer, J. Folkman, *Nature*, 1976, **263**(5580), 797.
- [3] W.B. Liechty *et al.*, *Annu. Rev. Chem. Biomol.*, 2010, **1**, 149; M. Janssens *et al.*, *Polymers*, 2014, **6**(3), 799.
- [4] K.A. Athanasiou, G.G. Niederauer, C. Agrawal, *Biomaterials*, 1996, **17**(2), 93.
- [5] L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 762.
- [6] D. Bendix, *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**(1-3), 129.
- [7] S.-H. Hyon, K. Jamshidi, Y. Ikada, *Biomaterials*, 1997, **18**, 1503.
- [8] T. Kissel, *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1991, **16**, 27.
- [9] Q. Cai *et al.*, *Biomacromolecules*, 2003, **4**(3), 828.
- [10] <http://www.resomer.com/product/biodegradable-polymers/en/Pages/biomaterials.aspx>
- [11] R. Dorati *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 2005, **78**.
- [12] R. Dorati *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2015, **41**, 1182.
- [13] B. Conti *et al.*, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 2009, **19**(2), 99.
- [14] R. Dorati *et al.*, *Journal of Microencapsulation*, 2006, **23**(2), 123.
- [15] R. Dorati *et al.*, *AAPS PharmSciTech*, 2008, **9**, No. 2.
- [16] R. Dorati *et al.*, *AAPS PharmSciTech*, 2008, **9**, 1110.
- [17] R. Dorati *et al.*, *AAPS PharmSciTech*, 2015, **16**, 5.
- [18] L. Montanari *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 2003, **90**, 281.
- [19] D.S. Kohane, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **96**, 203.
- [20] A. Schroeder *et al.*, *Nature Reviews: Cancer*, 2012, **12**, 39.
- [21] E. Chiesa *et al.*, Proc. of NanotechItaly 2015 International Conference.
- [22] C.L. Zhang, S.H. Yu, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4423.

#### Injectable Micro and Nanoparticulate Drug Delivery Systems

The development of drug delivery technologies led to significant therapy improvements such as better efficacy, lower drug side effects and toxicity. The paper is focused on two types of injectable drug delivery systems based on poly-alfa-hydroxyacids: microspheres and nanoparticles.



# ECOMONDO

THE GREEN TECHNOLOGIES EXPO



## GREEN & CIRCULAR ECONOMY

MARTEDÌ VENERDÌ  
**08-11**

**NOVEMBRE 2016**  
**RIMINI ITALY**

20ª FIERA INTERNAZIONALE DEL RECUPERO DI MATERIA ED ENERGIA E DELLO SVILUPPO SOSTENIBILE

Organizzato da



In contemporanea con

## KEY ENERGY

Con il patrocinio di



[www.ecomondo.com](http://www.ecomondo.com)

# LO SVILUPPO DI UN FARMACO PER INALAZIONE

La via inalatoria consente di somministrare farmaci sia localmente che per via sistemica in modo non invasivo, rapido ed efficace. Tuttavia ci sono ancora molti spazi di miglioramento per favorirne l'uso da parte del paziente. Per gli addetti ai lavori è un'arena ideale per fare innovazione.



**D**al polline alle spore prodotte dalla natura, dal fumo agli agenti chimici inquinanti prodotti dall'uomo, gli aerosol esistono ovunque ci sia aria da respirare. Il "delivery" polmonare si basa sull'inalazione di un aerosol, composto di particelle disperse in un veicolo gassoso e contenenti il principio attivo [1]. Un aerosol costituisce un potenziale pericolo e il nostro apparato respiratorio, per proteggere i polmoni, ha sviluppato sistemi di filtrazione ed eliminazione delle particelle inalate. La scienza alla base della terapia inalatoria si occupa, quindi, di sviluppare le tecnologie per somministrare, efficacemente e in sicurezza, i farmaci nel polmone, superando i sistemi naturali di difesa.

## La terapia inalatoria

Le malattie respiratorie croniche hanno un notevole impatto sulla qualità della vita dei pazienti e sono riconosciute come una tra le principali cause di morte, la terza in Italia [2]. L'asma, ad esempio è una delle patologie più diffuse al mondo e si stima che ne siano affetti circa 300 milioni di persone [3].

La terapia inalatoria è disponibile da molti anni per il trattamento locale di queste patologie ed oggi è ampiamente accettata come l'approccio più razionale per malattie quali asma e BPCO (Bronco-Pneumopatia Cronica Ostruttiva) consentendo di trattare direttamente l'organo bersaglio, evitando i problemi legati alla somministrazione sistemica e all'assorbimento gastro-intestinale.

Le principali categorie di farmaci impiegate per via inalatoria, per il trattamento delle patologie respiratorie, comprendono antibiotici, mucolitici, corticosteroidi e broncodilatatori. Le molecole cortico-steroidee (es. beclometasone dipropionato, fluticasone propionato, ecc.) sono tra i principi attivi più utilizzati in assoluto per via aerosolica, rappresentando il presidio farmacologico più efficace per la terapia dell'asma. Somministrati per via inalatoria questi farmaci consentono una maggiore efficacia nella riduzione dello stato flogistico locale e degli effetti collaterali rispetto agli steroidi somministrati per via sistemica.

Anche i broncodilatatori sono largamente utilizzati nella terapia locale delle malattie respiratorie. I meccanismi d'azione principali per ottenere la dilatazione delle vie aeree sono quello anticolinergico (es. Ipratropio, Tiotropio, ecc.) e quello  $\beta_2$ -adrenergico (es. Salbutamolo, Salmeterolo, Formoterolo, ecc.).

È bene sottolineare che sul mercato esistono molti prodotti in combinazione, nei quali si ritrovano contemporaneamente presenti due principi attivi appartenenti a classi diverse per ottenere un effetto sinergico dei singoli componenti.

Più recentemente la via polmonare è stata considerata anche per la somministrazione di farmaci per utilizzo sistemico e per macromolecole come i peptidi. La regione alveolare del polmone, infatti dispone di un'enorme superficie di assorbimento (circa 100 m<sup>2</sup>) ad alta permeabilità, caratteristiche favorevoli anche per l'assorbimento di macromolecole biologiche solitamente poco assorbibili. Il recente lancio nel 2015 di Afrezza® (insulina per via inalatoria) da parte di Sanofi, per il trattamento del diabete mellito, è un buon esempio di delivery sistemico di un peptide. Questa via di somministrazione riduce l'invasività della comune terapia insulinica per via sottocutanea. La Fig. 1 riassume vantaggi e svantaggi della via inalatoria. Nonostante negli ultimi anni ci siano stati considerevoli progressi, la deposizione del farmaco inalato è ancora una frazione relativamente bassa rispetto alla dose totale e la sua riproducibilità

Via di Somministrazione	Parenterale	Orale	Inalatoria
Facilità di Somministrazione (😊 facile, 😞 difficile)	😊	😊	😞
Effetti Collaterali (😊 pochi, 😞 molti)	😊	😊	😊
Dose Terapeutica Efficace (😊 piccola, 😞 grande)	😊	😊	😊
Rapidità Azione (😊 veloce, 😞 lenta)	😊	😊	😊
Costo (😊 economico, 😞 costoso)	😊	😊	😊

Fig. 1 - Confronto della via inalatoria rispetto a quella parenterale e orale

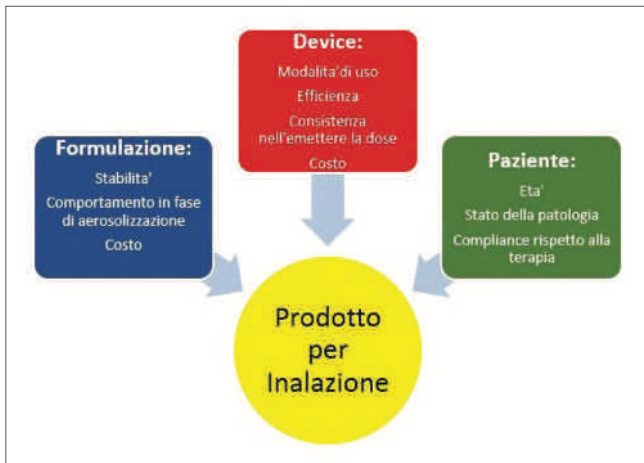


Fig. 2 - Le componenti principali per un prodotto per inalazione

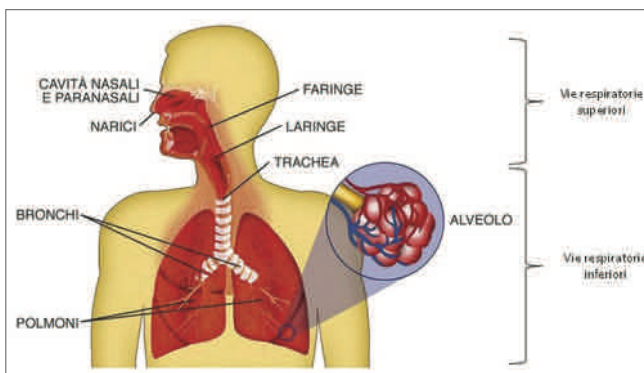


Fig. 3 - Schema del Sistema Respiratorio (modificato da www.flaem.it/it/le-vie-respiratorie)

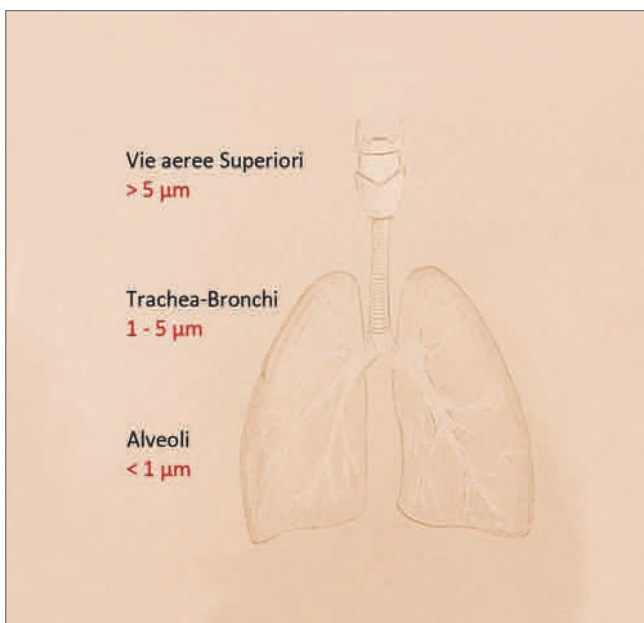


Fig. 4 - Profondità di penetrazione in rapporto alle dimensioni delle particelle

può essere influenzata da molte variabili legate alla capacità respiratoria del paziente e da un uso non corretto del dispositivo inalatore (device). La presenza sul mercato di un numero consistente di device diversi, unitamente alla mancanza di conoscenza circa il loro corretto uso, da parte sia del paziente che del medico, costituiscono ancora oggi uno dei principali problemi legati all'aerosolterapia. Un'ulteriore criticità è rappresentata dal fatto che non essendoci sufficienti dati *in vitro* e farmacocinetici per predire l'efficacia clinica, gli studi clinici sono molto complessi e onerosi fin dalle prime fasi di sviluppo [4]. La manifattura richiede specifici requisiti ambientali (contaminazione particellare, microbica e controllo dell'umidità) a salvaguardia sia degli operatori che del prodotto.

### I prodotti per via inalatoria

Il successo di un prodotto per inalazione dipende dall'interazione tra formulazione, sistema di erogazione (device) e paziente (Fig. 2).

Tra i fattori legati al paziente possiamo senz'altro citare il profilo respiratorio che deve essere modulato attraverso un training adeguato a seconda del tipo di prodotto che si sta utilizzando. Determinanti sono anche le caratteristiche anatomiche delle vie respiratorie, che variano notevolmente in funzione dell'età e nel corso di patologie come asma e BPCO.

Dal punto di vista anatomofisiologico l'apparato respiratorio è composto da due regioni principali: le vie respiratorie inferiori e superiori come schematizzato nella Fig. 3.

Il parametro principale da tenere in considerazione è la dimensione delle particelle da cui dipende il destino del farmaco all'interno dell'apparato respiratorio, e cioè la sua deposizione, come descritto dalla Fig. 4. È la quantità del farmaco che si deposita lungo le vie aeree inferiori che generalmente condiziona l'effetto clinico.

Per prodotti inalatori, il diametro a cui ci si riferisce è chiamato diametro aerodinamico che viene misurato *in vitro* con gli impattatori a cascata, riportati dalle principali farmacopee (USP Chapter <601>, Ph. Eur. 2.9.18) per la specifica caratterizzazione di questo tipo di prodotti. Questo test analitico cerca di mimare il sistema respiratorio facendo percorrere all'aerosol una serie di *stage* che simulano le varie parti anatomiche dello stesso. Le particelle si fermano in *stage* differenti a seconda del loro diametro aerodinamico.

Da questo test si possono ricavare una serie di indici molto importanti per caratterizzare un aerosol terapeutico. Il diametro medio aerodinamico di massa (MMAD) è il valore di diametro aerodinamico al di sopra e al di sotto del quale è contenuto il 50% delle particelle. Quindi più grande è il MMAD più grande è il diametro delle particelle. Altri parametri importanti sono descritti in Fig. 5.



Fig. 5 - Principali parametri per la valutazione delle performance di un prodotto per inalazione





## Le principali forme di dosaggio per via inalatoria

Ci sono tre principali tecnologie che si utilizzano per generare aerosol terapeutici:

- i nebulizzatori (noti in inglese come SVN - Small Volume Nebulizers);
- gli inalatori pressurizzati (pMDI - pressurized Metered-Dose Inhaler);
- le polveri inalatorie (DPI - Dry Powder Inhaler).

I jet-nebulizers sono i nebulizzatori più comuni nonché i primi ad essere stati impiegati per generare aerosol terapeutici. Essi convertono soluzioni o sospensioni di principio attivo in aerosol attraverso l'utilizzo di aria compressa. Consentono di aerosolizzare una vasta gamma di farmaci anche in combinazione e ad alti dosaggi. Un altro grande vantaggio per questi dispositivi, è la minima richiesta di cooperazione del paziente, e per questo motivo sono largamente utilizzati in popolazioni di pazienti anziani o debilitati, oppure nelle fasi pediatriche.

A loro svantaggio va sicuramente menzionato il lungo tempo di trattamento e la potenziale instabilità delle formulazioni liquide, a volte gestita con formulazioni solide da ricostituire al momento dell'uso.

Il considerevole ingombro e la necessità di una fonte di energia ne compromettono la portabilità. Inoltre la pulizia può essere critica, per il rischio di contaminazioni crociate quando il nebulizzatore è usato con più di un medicamento. L'efficienza di questi dispositivi è stata recentemente migliorata dall'introduzione di nebulizzatori breath-actuated (es. AeroEclipse), che consentono di erogare il farmaco solo in conseguenza dell'atto inspiratorio. Un'altra categoria di nebulizzatori sono quelli ultrasonici che generano l'aerosol attraverso la vibrazione ad alta frequenza (1-3 MHz) di un cristallo piezoelettrico. Questi dispositivi non sono adatti a nebulizzare liquidi troppo viscosi e molecole termolabili, generando un certo riscaldamento della formulazione. Recentemente sono apparsi sul mercato dispositivi a membrana vibrante (es. Pari eFlow Rapid) che usano una micropompa per generare l'aerosol forzando il liquido attraverso un piatto con aperture multiple. Questi dispositivi, essendo portabili, silenziosi e migliorando il tempo e l'efficacia della somministrazione, hanno rilanciato negli ultimi anni l'utilizzo dei nebulizzatori [5]. Il loro costo resta però una barriera per una loro più ampia diffusione.

I pMDI sono dispositivi che contengono il farmaco in soluzione o sospensione, combinato con un propellente. Si tratta della tipica "bomboletta" multi-dose, conosciuta sul mercato sin dagli anni Cinquanta. Il tratto distintivo dei pMDI, è la compattezza e la leggerezza del device che ne consente una portabilità eccellente.

Questi tipi di prodotti sono costituiti da tre principali componenti: un serbatoio, la formulazione, una valvola ed un interruttore per rilasciare lo "spruzzo". La formulazione è generalmente composta da un propellente a base di idrofluoroalcani. Co-solventi e tensioattivi vengono aggiunti per migliorare la dispersione del farmaco e/o per dissolvere farmaci parzialmente solubili, oltre che a lubrificare il meccanismo a valvola.

Quando il paziente attiva la valvola attraverso l'interruttore, mette in comunicazione l'ambiente interno alla bomboletta, ad alta pressione, con quello esterno. La pressione del propellente si equilibra a quella atmosferica e questo consente al gas compresso di uscire in modo esplosivo, passando rapidamente dallo stato liquido a quello gassoso e fornendo l'energia necessaria per espellere il farmaco dalla valvola sotto forma di goccioline che evaporano facilmente fino a dare particelle con diametri di 1,5-2,5  $\mu\text{m}$ .

Nelle soluzioni pMDI è relativamente semplice, a confronto delle altre preparazioni inalatorie, generare dei modelli matematici empirici per stimare l'MMAD a partire dalla concentrazione dei componenti non volatili in soluzione [6]. A tal proposito Chiesi Farmaceutici ha introdotto sul mercato Foster® pMDI basato sulla tecnologia formulativa Modulite®, che permette di erogare particelle extrafini particolarmente indicate per trattare le vie respiratorie più profonde.

Molti principi attivi sono insolubili nei comuni sistemi propellente/co-solvente e spesso la stabilità chimica è uno dei principali problemi delle soluzioni pMDI, essendo influenzata da numerose variabili [7]. Dal basso potere solubilizzante dei pMDI in soluzione deriva anche l'incapacità di erogare alte dosi. Con i pMDI in sospensione, si può aumentare il dosaggio fino a 5 mg a singola erogazione, migliorando anche la stabilità alla degradazione chimica. La stabilità fisica (aggregazione e deposizione delle particelle) resta tuttavia, un'importante limite. Nei pMDI, è assolutamente necessaria la coordinazione tra l'attuazione del device e l'atto inspiratorio. Per migliorare questo aspetto esiste la possibilità di utilizzare dei distanziatori, che si interpongono fra l'erogatore predosato pMDI e la bocca del paziente, costituendo una camera di espansione. Questo assetto è molto usato per il trattamento dei bambini.

Le polveri inalatorie, note con l'acronimo inglese DPI (Dry Powder Inhalers), generano aerosol a partire da polveri secche contenenti principio attivo. Il loro sviluppo ha subito una forte accelerazione in conseguenza del protocollo di Montreal (1987) che ha posto forti limitazioni nell'uso dei propellenti a causa del loro impatto sulla deplezione dell'ozono atmosferico. Questi prodotti sono ancora più sensibili al tipo di device con cui viene accoppiata la formulazione, e spesso è necessario sviluppare simultaneamente formulazione e device. Si possono avere molti tipi di device, in genere piccoli e trasportabili, in configurazioni monodose (es. a capsule pre-dosate) o multi-dose. La stabilità chimica è un punto di forza, anche se quella fisica è molto influenzata dall'umidità a cui è esposto il prodotto. I DPI non dispongono di un propellente per generare l'aerosol e l'energia necessaria è prodotta direttamente dal paziente quando inspira nell'inalatore. I DPI, pertanto, risolvono il problema della coordinazione ventilo-motoria, ma è indispensabile generare flussi inspiratori sufficientemente elevati per consentire l'attivazione del DPI. Ogni inalatore ha una propria resistenza intrinseca: quelli dotati di una resistenza particolarmente elevata sono utilizzati con difficoltà da pazienti con modesto flusso inspiratorio quali bambini, anziani e pazienti severamente ostruiti. Per risolvere questo problema, oltre a device con bassa resistenza, esistono anche device attivi che forniscono un'energia esterna (es. vibrazioni, impeller, aria compressa) per agevolare l'aerosolizzazione delle polveri inalatorie. La diffusione di questi ultimi ha, tuttavia, avuto un modesto successo per la complessità di sviluppo del device stesso e per la reintroduzione degli stessi problemi di coordinazione che si hanno nei pMDI. Le linee guida regolatorie [8] raccomandano che i prodotti DPI mostrino performance costanti se sottoposti a flussi inspiratori variabili e che sono supposti essere rappresentativi della popolazione di pazienti che si intende trattare. Ad esempio il device Chiesi NEXThaler® è un device attivato dall'inspirazione del paziente (breath-actuated) ed è stato messo in commercio con il prodotto Foster®. A confronto con altri prodotti analoghi ha dimostrato un'ottima consistenza di performance se sottoposto ad un ampio range di flussi inalatori [9].



Lo sviluppo dei prodotti DPI è tra i più complessi, sia per gli studi di performance inalatoria richiesti per la sottomissione regolatoria sia per lo sviluppo tecnologico vero e proprio. I DPI richiedono uno stringente controllo dello stato solido dei materiali, a partire dal principio attivo, che deve necessariamente avere diametri inferiori a 10 µm. Manipolare e controllare polveri di questo tipo comporta una notevole difficoltà dovuta all'alta propensione ad aggregare di queste particelle micrometriche, particolarmente adesive e coesive. Nei DPI il principio attivo deve essere unito alla formulazione finale già con i parametri dimensionali richiesti. La tecnica più utilizzata per ottenere principi attivi con granulometrie inferiori ai 10 µm è la micronizzazione a getto fluido. Controllare questo processo costituisce una delle criticità più importanti per questa forma farmaceutica, date le ripercussioni sulle caratteristiche del principio attivo e conseguentemente su quelle del prodotto finale. Dato il numero consistente di variabili da controllare, approcci chemiometrici e modellistici si stanno sempre più diffondendo a tale scopo [10].

Nella stragrande maggioranza dei casi il farmaco richiede di essere diluito con un eccipiente (carrier) per facilitare sia le operazioni di manufacturing, sia il "metering" e la dispersione dell'aerosol. Il carrier utilizzato è tipicamente il lattosio. Oggi sono a disposizione del tecnologo farmaceutico anche approcci di "particle engineering" (es. spray drying), che permettono di ottenere particelle di diametro respirabile, caratterizzate da minore tendenza all'agglomerazione di quanto non facciano le tradizionali particelle micronizzate, consentendo in molti casi anche di sviluppare formulazioni DPI prive di carrier. I DPI possono erogare facilmente bassi e medio-alti dosaggi mentre gli alti dosaggi sono ancora sfidanti e generalmente vengono affrontati con formulazioni senza carrier.

#### Nuovi trend

La via inalatoria è dunque utilizzata con successo sia per il trattamento locale delle malattie respiratorie sia come via di somministrazione per l'azione sistemica per varie patologie. I suoi punti di forza sono la rapidità di assorbimento, la bassa invasività (rispetto alla via parenterale) e la possibilità di somministrare farmaci labili come i peptidi e le proteine. Numerose sono le sfide aperte sia negli aspetti tecnologici (device-formulazione), sia nell'applicazione a nuove richieste terapeutiche verso le quali i ricercatori stanno focalizzando gli sforzi negli ultimi anni.

Sono stati sviluppati dispositivi pMDI con un sensore che, captando l'atto inspiratorio del paziente, attua automaticamente l'erogazione (es. Easibreathe®), eliminando il problema della coordinazione ventilo-motoria.

Nei DPI i nuovi inalatori passivi sono concepiti per favorire la dispersione della polvere anche per pazienti con capacità inspiratorie ridotte (es. Conix™) oppure per erogare alti dosaggi (>100 mg) come nel caso di TOBI® Podhaler™ [11].

Un dose counter (meccanico od elettronico) per tenere traccia delle dosi erogate è presente nella maggior parte dei device multidose per DPI, mentre per i pMDI questa implementazione è piuttosto recente. Molto interessante è anche l'evoluzione di dispositivi di erogazione elettronici, capaci di controllare, monitorare e registrare i dati sull'aderenza alla terapia, consentendo al medico di seguire con maggiore consapevolezza e in certi casi di personalizzare, la terapia del paziente anche in remoto. A questo riguardo possono essere segnalati AKITA® e I-Neb® per i nebulizzatori e DOSER™ per i pMDI.

Minimizzare la deposizione nelle vie aeree superiori e conseguentemente migliorare la deposizione nei polmoni è un aspetto ancora oggetto di ottimizzazione. Segnaliamo la tecnologia Resimat® Soft-Mist™ Inhaler e il crescente interesse per le nanoparticelle.

Sebbene in considerevole ritardo rispetto ad altre forme farmaceutiche anche per la terapia inalatoria c'è un crescente interesse per il rilascio modificato del principio attivo nel sito d'azione, attraverso l'uso di polimeri biocompatibili e degradabili. Nei pMDI i campi di maggiore interesse sono quelli di trovare sistemi atti a sciogliere una platea più ampia di principi attivi (soluzioni) o di stabilizzare le sospensioni con l'uso di opportuni eccipienti. Da tenere presente che ad oggi il numero di eccipienti tossicologicamente qualificati per uso inalatorio è notevolmente inferiore a quello di altre vie di somministrazione (es. orale) e costituisce una forte limitazione alla sperimentazione di formulazioni innovative. Dal punto di vista clinico restano molto interessanti le combinazioni sinergiche di più di un principio attivo e la somministrazione sistemica di antibiotici, antitumorali, proteine, plasmidi di DNA e vaccini.

Teva Pharmaceuticals ha recentemente lanciato la loxapina per la terapia della schizofrenia, utilizzando il sistema Staccato®, che consente un'esposizione sistemica rapidissima (2 minuti) attraverso un aerosol prodotto termicamente quando il paziente inala.

Per concludere, il "delivery" polmonare è una scienza multidisciplinare già consolidata, ma con ancora numerosi ambiti di espansione. In questo scenario in continuo fermento, il tecnologo farmaceutico può contribuire in maniera determinante per offrire piattaforme terapeutiche innovative in grado di migliorare la qualità della vita dei pazienti.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] D.S. Gardenhire *et al.*, A Guide to Aerosol Delivery Devices for Respiratory Therapists, 3rd Ed., American Association for Respiratory Care, 2013, 1.
- [2] *Italian Journal of Public Health*, 2010, Volume 7, Number 2, Suppl. 3.
- [3] A. Viscardi *et al.*, *Bollettino della Società Medico Chirurgica di Pavia*, 2013, **126**(1), 153.
- [4] P. Bäckman *et al.*, *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 2014, **95**(5), 509.
- [5] A. Ari, *Eurasian Journal of Pulmonology*, 2014, **16**, 1.
- [6] D. Lewis, Intrinsic Particle Size Distribution: A New Metric to Guide the Design of pMDIs, Proc. Respiratory Drug Delivery Europe, Berlin, 21-24 May 2013.
- [7] D. Copelli *et al.*, *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, December 2013.
- [8] EMEA/CHMP/QWP/49313/2005corr. (2005): Committee For Medicinal Products For Human Use (CHMP). Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products.
- [9] I. Pasquali, G. Brambilla, D. Copelli, Effect of Flow Rate on Dose Delivery of NEXThaler®, Turbohaler® and Diskus®, Proc. Respiratory Drug Delivery Europe, Berlin, 21-24 May 2013.
- [10] D. Copelli *et al.*, Multivariate approach for micronization of Active Pharmaceutical Ingredient, poster presented at Scandinavian Symposium on Chemometrics, Cagliari, 14-17 June, 2015.
- [11] J.G.Y. Chan *et al.*, *AAPS PharmSciTech*, 2014, **15**(4), 882.

#### Inhalation Drug Development: An Overview

Drug therapy via inhalation is a non-invasive, rapid, and effective way to deliver therapeutic agents both locally and systemically. However, there are still challenges influencing patient usability and clinical effectiveness. This is an exciting opportunity to make innovation for the researchers in this field.

# PUÒ LA DIETA MODIFICARE L'ESPRESSIONE DEL DNA?

Alcuni composti bioattivi, presenti nella dieta, come acidi grassi polinsaturi, minerali, vitamine e polifenoli, possono indurre modifiche epigenetiche con effetti a lungo termine sulla salute e sul rischio di incidenza di patologie umane, attraverso la metilazione del DNA, modificazioni istoniche ed espressione di microRNA. Questi composti bioattivi potrebbero essere affiancati o in alcuni casi anche sostituire i classici trattamenti terapeutici per combattere e prevenire, in maniera anche personalizzata, l'insorgenza di patologie, quali cancro, diabete, malattie cardiovascolari, e molte altre ancora.



La scoperta delle basi scientifiche attraverso le quali alcune condizioni fisiopatologiche possono essere migliorate con l'alimentazione ha aperto nuove frontiere nella medicina preventiva e nella cura delle cosiddette *Noncommunicable diseases*. In particolare con l'allungamento della vita media, e la relativa perdita di funzioni, e l'incremento di patologie correlate all'età (come la neurodegenerazione, l'atrofia muscolare, etc.), riveste particolare importanza l'approccio nutrizionale. Per esempio il ridotto assorbimento calorico e proteico, la frequenza e la durata dei pasti, l'aumentato consumo della fibra alimentare che migliora la flora batterica intestinale, rallentano i meccanismi cellulari associati all'invecchiamento [1]. Studi di laboratorio su modelli animali hanno dimostrato che specifici interventi nutrizionali promuovono l'allungamento e il miglioramento della qualità della vita [2]. Inoltre, diversi lavori dimostrano come l'esposizione a fattori ambientali e la dieta possano modificare processi fisiologici e patologici attraverso meccanismi epigenetici nell'uomo. È stato evidenziato come la nutrizione possa indurre modifiche epigenetiche con effetti a lungo termine sulla salute e sul rischio di incidenza di patologie, come malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, ipertensione, obesità e cancro. Infatti, gli alimenti contengono molte sostanze che hanno dimostrato la capacità di determinare cambiamenti epigenetici che agiscono sul DNA.

Il termine epigenetica (dal greco "sopra il genoma") si riferisce ai cambiamenti ereditabili ma reversibili nell'espressione genica che non compor-

tano modifiche alla sequenza dei nucleotidi del DNA sottostante. In altre parole l'epigenetica cambia il modo in cui i geni vengono accesi o spenti ma non altera la loro sequenza. Le modifiche chimiche operate dai segnali epigenetici, a carico del DNA o delle regioni che lo circondano, regolano l'accesso dei fattori di trascrizione ai loro siti di legame sul DNA e regolano in modo diretto lo stato di attivazione funzionale dei geni. Le modificazioni epigenetiche sono alla base del normale funzionamento delle nostre cellule e governano la vita dallo sviluppo embrionale fino alla maturazione delle cellule nell'adulto. I segnali epigenetici regolano infatti importanti processi cellulari come il differenziamento, permettendo l'espressione specifica dei geni caratteristici di un certo tipo cellulare in un dato tessuto. Cambiamenti aberranti dell'assetto dei segnali epigenetici sono spesso associati a patologie. Sebbene i segnali epigenetici sono stabili ed ereditabili, possono essere cancellati o modificati in risposta a diversi stimoli, inclusi i fattori ambientali, uno dei più importanti dei quali è la dieta.

Le modificazioni epigenetiche possono avvenire attraverso almeno tre sistemi, comprendenti metilazione del DNA, modificazione degli istoni e influenza dei microRNA [3].

## La metilazione del DNA

Questo processo è la modificazione epigenetica più caratterizzata e consiste nell'aggiunta di gruppi metilici (-CH<sub>3</sub>) a residui di citosina in specifiche regioni del DNA chiamate isole CpG. Tali regioni sono distribuite nel genoma prevalentemente nelle regioni ripetute pericentromeriche e nelle regioni che regolano la trascrizione dei geni. Mentre in prossimità dei centromeri la metilazione delle CpG concorre a mantenere la struttura centromerica e a donare stabilità al genoma, in prossimità dei promotori genici la metilazione delle isole CpG contribuisce generalmente al silenziamento genico. Al contrario l'ipometilazione di queste regioni porta alla riattivazione della trascrizione genica [4].

## Modifiche chimiche a carico degli istoni

Gli istoni sono proteine basiche che interagiscono strettamente con il DNA formando la cosiddetta cromatina, una struttura che si presenta in diversi stati di compattezza a seconda della sua attività: in generale una cromatina aperta è indice di una fase di trascrizione dei geni, mentre una cromatina compatta indica una fase silente. Il rimodellamento della cromatina avviene





attraverso modifiche chimiche delle proteine istoniche che includono l'acetilazione, la metilazione, l'ubiquitinazione, la fosforilazione e la sumoilazione [4]. Tra queste modifiche le più caratterizzate sono l'acetilazione e la metilazione. L'acetilazione degli istoni è associata esclusivamente con stati di cromatina attivi e aperti, mentre la metilazione può attivare o reprimere la trascrizione genica a seconda dei residui di lisina all'estremità N-terminale coinvolti [5].

### Espressione di microRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante a singolo filamento (20-24 nucleotidi) principalmente attivi nella regolazione dell'espressione genica. Funzionano tramite accoppiamento base con sequenze complementari delle molecole di mRNA solitamente con conseguente silenziamento genico tramite repressione traduzionale o degradazione della molecola bersaglio. Un solo miRNA può controllare l'espressione di centinaia di geni. I miRNA sono coinvolti in molti processi, quali il ciclo cellulare, la morte programmata delle cellule, la differenziazione cellulare, lo sviluppo tumorale. L'espressione aberrante dei miRNA è implicata nell'insorgenza di numerose patologie e cambia con l'età [6].

Negli ultimi tempi il mondo scientifico ha mostrato un grande interesse a capire come i meccanismi epigenetici regolati da fattori nutrizionali, in particolare i composti bioattivi di origine vegetale (presenti in frutta, verdura, spezie e legumi), abbiano la capacità di modulare l'espressione genica, attraverso la metilazione del DNA, modificazioni istoniche ed espressione di miRNA.

Ci sono dei componenti della dieta capaci di influenzare direttamente o indirettamente lo stato di metilazione del genoma modulando la trascrizione genica, in particolare i donatori di metili (come metionina, folato, colina e betaina) che possono trasferire un gruppo metile al DNA e agli istoni.

Anche la disponibilità di alcuni cofattori, come zinco e selenio, di vitamina B6 e B12, essenziali per l'attività di questi enzimi che partecipano al ciclo del folato, incidono in maniera dose-dipendente sullo stato di metilazione del genoma.

Tra gli acidi grassi a corta catena, l'acido butirrico, prodotto dalla flora batterica in seguito all'ingestione di fibre alimentari, è un inibitore dell'attività dell'istone deacetilasi.

Invece gli acidi grassi poliinsaturi, n-3 PUFA hanno proprietà anti-infiammatorie e anti-aggreganti, favoriscono la lipolisi, inibiscono la lipogenesi, prevengono malattie cardiovascolari e muscolari [2], rallentano la crescita tumorale, sono inversamente correlati con il rischio di disturbi neurologici (es. Alzheimer).

Diversi minerali sono stati associati a cambiamenti nei meccanismi epigenetici che regolano l'espressione genica, come il magnesio, i cui bassi livelli sono associati a numerose condizioni patologiche caratterizzate da uno stato di infiammazione cronica, come aterosclerosi, ipertensione, osteoporosi, diabete e obesità. Il calcio e il cromo sembrano invece avere un effetto epigenetico sulla regolazione del peso corporeo.

Altri micronutrienti, come la vitamina C, la vitamina E e i carotenoidi, sono in grado di diminuire i livelli circolanti di marcatori infiammatori e ossidativi. La vitamina A è in grado di inibire il ciclo cellulare, mentre la vitamina D esplica, oltre ad effetti calcemici, anche effetti che includono l'apoptosi, l'angiogenesi, l'antiproliferazione, la pro-differenziazione e l'immunomodulazione cellulare.

Numerose ricerche condotte *in vitro* e su modelli animali hanno dimostrato l'efficacia di polifenoli e flavonoidi nel trattamento di vari disordini metabolici. Tra questi composti ricordiamo la *genisteina* della soia, la *curcu-*

*mina* della curcuma, l'*epigallocatechina-3-gallato* (EGCG) del tè verde, la *quercetina* (presente in cipolle, vino), il *resveratrolo* dell'uva, il *sulforafano* delle piante crucifere, il *diallil-disolfuro* dell'aglio, il *licopene* dei pomodori, la *luteolina* (presente in carote, finocchio, peperoni e sedano), l'*apigenina* (presente nelle foglie di sedano e prezzemolo), l'acido rosmarinico (presente in rosmarino, origano, salvia, etc.), l'acido anacardio (oli di guscio di anacardi). I polifenoli e i flavonoidi sono stati associati alla capacità di modificare l'espressione di alcuni geni coinvolti nella risposta infiammatoria, migliorano i parametri relativi allo stress ossidativo, il profilo lipidico e la sensibilità all'insulina, diminuiscono l'adipogenesi, sono associati a minor rischio di obesità e mostrano effetti positivi nella prevenzione e nel trattamento del cancro [7].

Inoltre i polifenoli modulano l'espressione dei microRNA con effetto anti-infiammatorio e anti-cancerogeno [8]. Una dieta ricca in acidi grassi PUFA modifica i livelli circolanti di miRNA, riducendo i segnali pro-infiammatori [9]. Infine vitamine e fitoderivati sembrano reprimere l'attività dei miRNA coinvolti nel ciclo cellulare, sopravvivenza, proliferazione, angiogenesi e metastasi [10].

### Conclusioni e prospettive

Le recenti ricerche realizzate su modelli cellulari e animali e studi sull'uomo suggeriscono che la nutrizione ha un effetto molto più rilevante di quanto ipotizzato fino ad ora nel modulare alcuni meccanismi cellulari e molecolari associati a infiammazione, invecchiamento, insorgenza e decorso di malattia. Tuttavia i dati fino ad ora disponibili suggeriscono la necessità di ulteriori studi per approfondire l'interazione degli alimenti con i meccanismi cellulari. Infine, lo sviluppo di biomarcatori/biosensori per delineare le differenze tra i vari regimi alimentari e la variabilità individuale sarebbe di grandissimo aiuto al fine di stabilire marker predittivi per poter testare l'efficacia di un intervento nutrizionale sull'insorgenza o il decorso di malattie quali il cancro, il declino cognitivo, alterazioni metaboliche ed altre ancora.

### BIBLIOGRAFIA

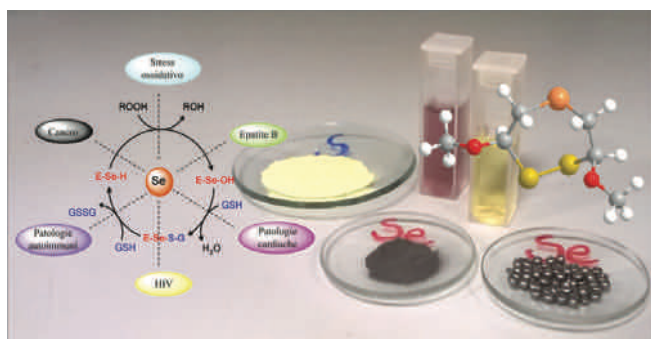
- [1] L. Fontana *et al.*, *Cell*, 2015, **161**, 106.
- [2] F. Carotenuto *et al.*, *Int. J. Med. Sci.*, 2016, **13**, 206.
- [3] K.S. Bishop *et al.*, *Nutrients*, 2015, **7**, 922.
- [4] M. Daniel *et al.*, *J. Exp. Biol.*, 2015, **218**, 59.
- [5] H. Jang *et al.*, *Clin. Nutr. Res.*, 2014, **3**, 1.
- [6] H.J. Jung *et al.*, *Curr. Genomics*, 2012, **13**, 548.
- [7] F.I. Milagro *et al.*, *Mol. Aspects Med.*, 2013, **34**, 782.
- [8] D. Milenkovic *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, **64**, 40.
- [9] F.J. Ortega *et al.*, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, **26**, 1095.
- [10] J.D. Palmer *et al.*, *Ageing Res. Rev.*, 2014, **17**, 16.

#### May Diet Modify DNA Expression?

Nutrients and their bioactive compounds, present in food, such as PUFAs, minerals, vitamins and polyphenols, can induce epigenetic changes with long-term beneficial health effects and prevent the risk of incidence of human disease, through DNA methylation, histone modifications and miRNA expression. These bioactive compounds could be used in combination with and sometimes in alternative to traditional therapy to treat and prevent, even in a personalized manner, the incidence of diseases, such as cancer, diabetes, cardiovascular disease, and many others.

# DA PICCOLE MOLECOLE A DERIVATI SOLFORATI E SELENATI AD ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Si descrive la sintesi di composti organici solforati e selenati di diverso tipo, a partire da semplici molecole per reazione con tiosilani e selenosilani. Alcuni dei prodotti ottenuti, inclusi derivati benzoselenofenici del resveratrolo, hanno evidenziato una promettente attività antiossidante.



Strutture organiche solforate sono presenti in molti composti di interesse farmaceutico ed alimentare, come ad esempio cisteina, metionina, derivati solfonamidici [1]. Tioli, solfuri, disolfuri e polisolfuri sono estratti da alimenti, come aglio, cipolla e tartufo, cui conferiscono il particolare profilo aromatico [2]. Anche i derivati ciclici rivestono particolare importanza, sia come intermedi in sintesi organica, che in ambito biologico, come ad esempio biotina, acido lipoico e tiamina [3]; in particolare composti eterociclici contenenti zolfo ed azoto trovano applicazione in ambito farmaceutico ed agrochimico, essendo presenti in molti farmaci ed alimenti (birra, cioccolato, caffè, carne) [4]. Nonostante l'elevata varietà di strutture eterocicliche, i metodi descritti per la loro sintesi sono spesso limitati dalla disponibilità dei reagenti solforati, oppure richiedono numerosi passaggi di reazione e l'uso di reagenti costosi o difficilmente accessibili. È quindi evidente come la ricerca di metodi sintetici alternativi per preparare derivati solforati, a partire da molecole semplici, risulti di particolare importanza.

Inoltre più recentemente, con la scoperta del ruolo determinante del selenio a livello biologico, anche i derivati organici selenati hanno assunto un elevato interesse da un punto di vista sia sintetico che biologico [5]. Infatti composti selenati prendono parte ad una vasta gamma di reazioni organiche e rivestono particolare importanza per il ruolo che svolgono, ad esempio come antiossidanti ed antitumorali.

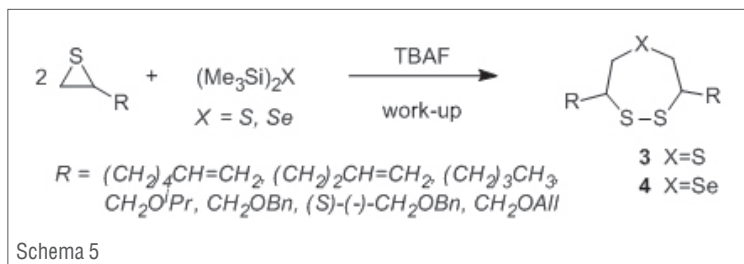
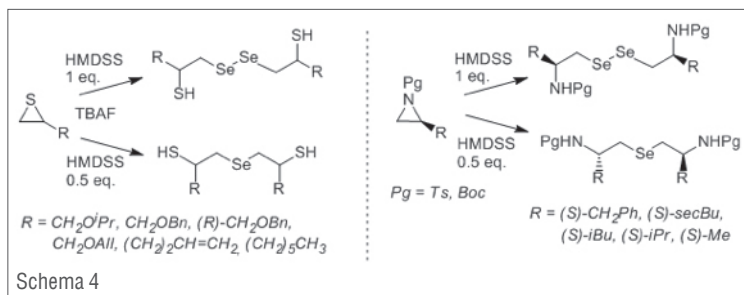
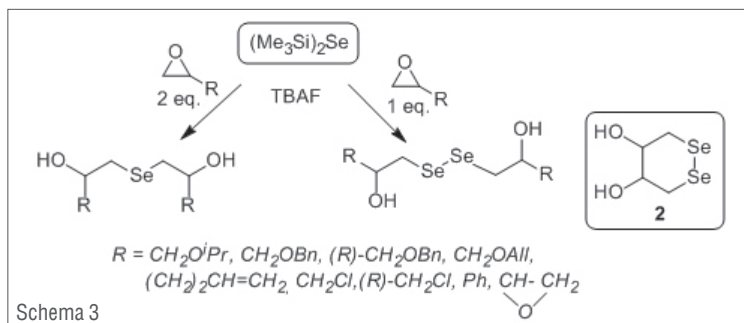
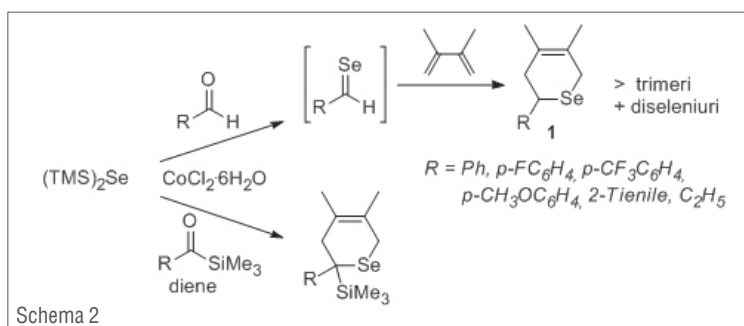
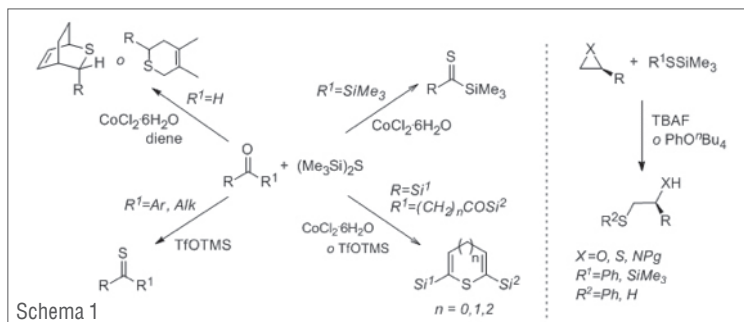
Nell'ambito della ricerca di nuovi approcci sintetici, i derivati organici del silicio trovano vasta applicazione come gruppi protettori, intermedi di sintesi e reagenti nucleofili, ed il loro utilizzo permette l'accesso a molecole difficilmente ottenibili con le classiche procedure sintetiche [6]. Inoltre, i sililsolfuri possono essere considerati formalmente simili ai tioli, ma presentano una reattività peculiare, in grado di trasferire funzionalità solforate in condizioni blande su vari substrati organici.

Il nostro interesse per lo studio di metodologie basate sulla reattività di organotiosilani ha permesso di mettere a punto un approccio sintetico che sfrutta la reattività del bis(trimetilsilil)solfuro, (TMS)<sub>2</sub>S (o HMDST), che si è rivelato un reagente efficace per l'introduzione di gruppi solforati su elettrofili di diverso tipo, come composti carbonilici e derivati eterociclici a tre termini [7]. Ha infatti permesso un accesso a tioaldeidi (come cicloaddotti di Diels-Alder), tiochetoni e tioacilsilani per tiorazione diretta dei corrispondenti composti carbonilici (Schema 1). La reazione con bis-acilsilani ha portato a derivati eterociclici a diverse dimensioni di anello (tiofeni, 4*H*-tiopirani, diidrotiepine) in funzione della lunghezza della catena fra i due gruppi acilsilanic (Schema 1) [8].

Più recentemente è stato dimostrato che la reazione di tiosilani con epossidi porta all'ottenimento di β-idrossi-solfuri e β-idrossi-tioli con elevato controllo regio- e stereochimico (Schema 1) [7]. HMDST si è dimostrato efficace anche nei confronti di tiirani ed aziridine, consentendo un accesso altamente regio- e stereocontrollato a 1,2-ditioli e β-ammino-tioli (Schema 1). Come logica, ma non ovvia, estensione, l'interesse è stato rivolto allo studio di organoselenosilani con vari elettrofili, per la sintesi di composti contenenti selenio [9]. Sulla base di quanto ottenuto con HMDST, aldeidi di diverso tipo sono state trattate con bis(trimetilsilil)seleniuro (TMS)<sub>2</sub>Se (o HMDSS), in presenza di un diene, per fornire i corrispondenti cicloaddotti (Schema 2) [10].

In maniera analoga sono stati ottenuti anche selenoacilsilani, isolati come selenopirani (Schema 2).

I silil-seleniuri si sono dimostrati efficaci anche nella reazione con epossidi, permettendo un accesso diretto a β-idrossi-fenilseleniuri e β-idrossi-diseleniuri (Schema 3) [9, 11].



Quando è stato utilizzato il diepossido dell'1,3-butadiene, è stato isolato il diseleniuro ciclico **2**. Il corrispondente *trans*-1,2-diseleno-4,5-diolo (DST<sup>ox</sup>) è riportato come un reagente selenato idrosolubile per il controllo *redox* della struttura delle proteine. La versatilità di questi reagenti è stata evidenziata usando un eccesso di elettrofilo, che ha fornito i β-idrossi-seleniuri per attacco regioselettivo del selenosilano intermedio su una seconda molecola di epossido [11]. La procedura è stata applicata ad epossidi diversamente sostituiti, confermando la sua generalità.

Per valutare l'estensione ad altri substrati, HMDSS è stato fatto reagire con tiirani (Schema 4). La reazione condotta in rapporto 1:1 ha fornito 2-mercapto-diseleniuri, mentre con 2 equiv. di episolfuro si è avuta la formazione di β-mercapto-seleniuri [11].

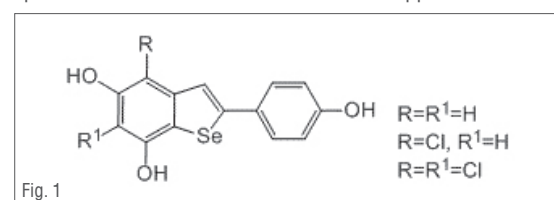
In modo analogo, con 1 equiv. di *N*-tosil- ed *N*-Boc-aziridine sono stati ottenuti β-ammino-diseleniuri come singoli stereoisomeri (Schema 4), mentre con un eccesso di aziridina sono stati isolati i β-ammino-seleniuri otticamente attivi [11], composti interessanti per l'utilizzo come catalizzatori in sintesi asimmetrica e come reagenti per l'ottenimento di amminoacidi selenati non-naturali [12].

La formazione di seleniuri e diseleniuri è stata confermata attraverso spettri di <sup>77</sup>Se NMR, con frequenze caratteristiche in un range di assorbimento di 267-310 ppm per i diseleniuri e 38-124 ppm per i seleniuri.

Un aspetto interessante è stato osservato nella reazione di HMDST ed HMDSS con episolfuri, che ha permesso di accedere a cicli solforati e selenati a sette termini, i 3,6-dialchil-1,2,5-tritiepiani **3** e -1,2,5-ditiaselenepiani **4** (Schema 5) [13], composti di interesse per la loro possibile applicazione in chimica organica, biochimica e chimica degli alimenti.

Sulla base di quanto noto sull'impiego di derivati organici selenati come mimici sintetici della glutazione perossidasi (GPx) [14], un selenoenzima di cui è ben nota l'attività antiossidante, è stata effettuata una misura dell'attività catalitica di alcuni dei prodotti selenati ottenuti, determinando l'ossidazione del ditiotreitolo DTT<sup>red</sup> a DTT<sup>ox</sup> con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> attraverso misure di <sup>1</sup>H NMR, che ha evidenziato come i derivati ciclici **1** e **4** siano effettivamente in grado di comportarsi come efficaci mimici della GPx.

Più recentemente, è stata messa a punto la sintesi di derivati selenati di sostanze naturali, come il resveratrolo, di cui sono noti i benefici grazie alla sua attività antiossidante [15]. È stata sviluppata una metodologia per un accesso diretto ad una nuova classe di derivati benzoselenofenici del resveratrolo (Fig. 1), ottenuti per trattamento del resveratrolo con una specie elettrofila selenata. In funzione dei rapporti stechiometrici





trici [Se:SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:resveratrolo] sono stati sintetizzati il benzoselenofene ed i mono- e dicloro-derivati. Dai test del DPPH e FRAP i composti selenati sono risultati più attivi del resveratrolo stesso, con attività paragonabile a quella del Trolox.

## Conclusioni

È stato dimostrato che attraverso la reattività di tiosilani e selenosilani con elettrofili si ottengono composti organici solforati e selenati di varia natura, che hanno evidenziato una promettente attività antiossidante, con possibile applicazione in diversi ambiti.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] a) M. A. Vazquez-Prieto *et al.*, *Mol. Aspects Med.*, 2010, **31**, 540;  
b) S. Parcell, *Altern. Med. Rev.*, 2002, **7**, 22.
- [2] E. Block, *Garlic and Other Alliums: The Lore and The Science*, RSC Publishing (Eds.), 2010.
- [3] a) L. Packer *et al.*, *Nutrition*, 2001, **17**, 888;  
b) A. Marquet *et al.*, *Vitam. Horm.*, 2001, **61**, 51.
- [4] a) P. Martins *et al.*, *Molecules*, 2015, **20**, 168521; b) O.A. Rakinin, *Arkivoc*, 2009, (i), 129; c) M. Garcia-Valverde, T. Torroba, *Molecules*, 2010, **10**, 318 ed articoli seguenti; d) W. Engel, P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5391;  
e) M. Sakaguchi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **28**, 1179.
- [5] Per alcuni esempi: a) G. Mugesh *et al.*, in *Organoselenium Chemistry*, T. Wirth (Ed.), Wiley-VCH Verlag & Co, 2012, cap. 9;  
b) A.L. Braga *et al.*, *Toxicol. in Vitro*, 2009, **23**, 14; c) K.C. Nicolaou *et al.*, *Selenium in Natural Products Synthesis*, pag. 300, CIS, Inc. Philadelphia, PA, 1984.
- [6] a) M. Kira, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 9175 ed articoli seguenti;  
b) D.A. Evans, L.K. Truesdale *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 5009.
- [7] a) A. Degl'Innocenti, A. Capperucci *et al.*, *Synlett*, 2005, 1965;  
b) A. Degl'Innocenti, A. Capperucci *et al.*, *Chem. Commun.*, 2006, 4881.
- [8] A. Capperucci *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 87.
- [9] A. Capperucci, D. Tanini, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2015, **190**, 1320.
- [10] A. Degl'Innocenti *et al.*, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2009, **184**, 1621.
- [11] D. Tanini *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2015, 357.
- [12] a) S. Chandrasekaran *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 2910;  
b) A.L. Braga *et al.*, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 2635.
- [13] A. Capperucci *et al.*, *Heteroat. Chem.*, 2014, **25**, 678.
- [14] I.J. Kade *et al.*, *Biochemistry*, 2012, **24**, 1.
- [15] D. Tanini *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 5757.

### From Small Molecules to Sulfurated and Selenated Derivatives with Antioxidant Activity

A synthesis of various sulfurated and selenated organic compounds is described from simple molecules, through reaction with thiosilanes and selenosilanes. Some selected seleno-derivatives, including benzoselenophenes from resveratrol, showed an interesting antioxidant activity.

## COMUNICARE LA CHIMICA NELL'EPOCA DEL WEB.2.0 Dalla cultura della diffidenza alle responsabilità educative: come sta mutando la percezione della disciplina fra i "non addetti ai lavori"?



**Quando:** venerdì 9 settembre 2016  
dalle ore 8.30 alle ore 17.30

**Luogo:** presso Environment Park  
sala Copenaghen - via Livorno, 60 - Torino

L'evento si colloca nell'ambito del progetto biennale "Indagine sulla percezione della chimica e dell'attività del chimico in ambito non professionale in Italia tramite i nuovi media" condotto dall'associazione Chimicare su incarico dell'Ordine dei Chimici del Piemonte e della Valle d'Aosta a partire dal 2015.

Fra gli argomenti trattati, con il supporto di chimici ed altre professionalità del mondo scientifico, giornalisti, umanisti e blogger:

- immagine e percezione della chimica e dell'attività del chimico
- dinamiche di comunicazione scientifica nel web
- la cultura del sospetto nel rapporto con le scienze applicate
- ruolo e responsabilità dell'educazione e della diffusione culturale

L'evento è aperto a tutte le professionalità dell'ambito scientifico, della comunicazione e dei nuovi media, compresi i curatori di blog e social a tema scientifico.

Ai chimici che ne faranno anticipatamente richiesta sarà riconosciuto il rilascio di n. 5 crediti formativi CFP, previo rimborso pari a 30 € per spese di registrazione e segreteria.

**Informazioni e registrazione:** per approfondimenti sul programma, sugli organizzatori e sui partecipanti: Associazione Culturale Chimicare - [contatti@chimicare.org](mailto:contatti@chimicare.org)  
Per la richiesta dei crediti formativi:  
Ordine dei Chimici del Piemonte e della Valle d'Aosta  
[segreteria@chimicipiemonte.it](mailto:segreteria@chimicipiemonte.it)

# PLUG&PURIFY

I filtri mobili a carbone attivo CECASORB™ sono il sistema a noleggio economico ed efficiente per la purificazione di liquidi e gas.

## TECNOLOGIA. FACILE, VELOCE, SICURA.



### IL GRUPPO ARKEMA IN CIFRE:

**19.000** DIPENDENTI / **137** I SITI PRODUTTIVI  
**10** CENTRI DI RICERCA / **50** PAESI

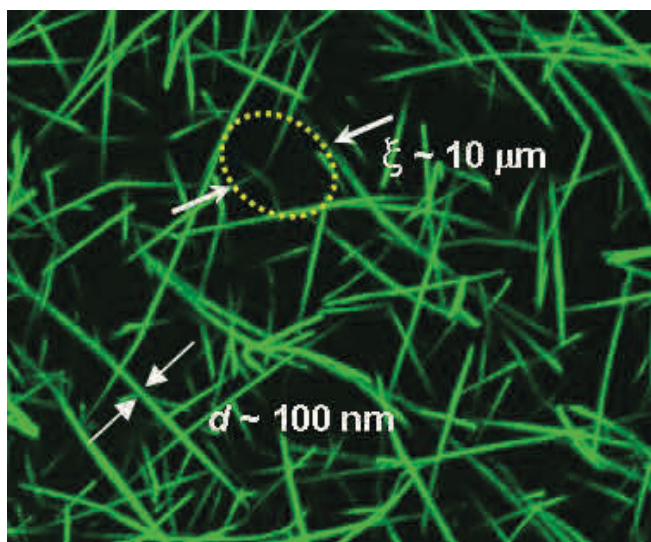
#### CECA ITALIANA S.r.l.

Via Pregnana 63  
20017 Rho (MI) - Italia -  
Tel.: + 39 02 93513 811  
Email: sales-ceca.italy@ceca.it  
www.cecachemicals.com

**CECA**  
ARKEMA GROUP

# TECNICHE DI LIGHT SCATTERING E TURBIDIMETRIA PER LA CARATTERIZZAZIONE DI BIOMATERIALI: L'ESEMPIO DEI GEL DI FIBRINA

Le proprietà meccaniche e le funzionalità biologiche delle reti biopolimeriche dipendono dalla loro struttura. Utilizzando le tecniche di light scattering a basso angolo e turbidimetria, integrabili in un unico strumento, è possibile misurare dimensione dei pori, diametro e densità delle fibre e la morfologia, spesso frattale, che caratterizza tali reti.



Le tecniche di *diffusione della luce* ("Light Scattering", LS) [1, 2] sono tecniche classiche per lo studio dei cosiddetti fluidi complessi, che vanno dai liquidi puri a sospensioni o soluzioni di particelle o macromolecole, fino a microemulsioni e gel. Tali tecniche hanno il grande vantaggio di essere non-invasive, fornire informazioni quasi in tempo reale, ed essere altamente riproducibili (dal punto di vista statistico) poiché applicate a campioni costituiti da un gran numero di particelle. Tra le varie tecniche di LS, le più comuni sono indubbiamente quelle note con il nome di *Dynamic Light Scattering* (DLS), *Static Light Scattering* (SLS) e *Multi-Wavelength Turbidimetry* (MWT).

Nella prima tecnica (DLS) si misura la *funzione di autocorrelazione temporale* delle *fluttuazioni di intensità* della luce diffusa dal campione ad un

assegnato angolo. Nel caso di soluzioni diluite di particelle, se l'angolo di scattering  $\theta$  è sufficientemente piccolo ( $\theta < \lambda/d$ , dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della radiazione incidente e  $d$  il diametro delle particelle), tale tecnica fornisce informazioni sul loro *coefficiente di diffusione traslazionale* e quindi, via la relazione di Stokes-Einstein, sul *raggio idrodinamico* delle stesse. Parallelamente, utilizzando la tecnica della *diffusione della luce depolarizzata in modo dinamico* (DDLS), può essere ricavato anche il *coefficiente di diffusione rotazionale*. Tipicamente, con la tecnica DLS è possibile misurare raggi idrodinamici nell'intervallo ~5-200 nm.

La seconda tecnica (SLS) consiste nel misurare la distribuzione angolare e l'ampiezza dell'intensità media (media temporale) della luce diffusa elasticamente o staticamente dal campione su un intervallo angolare che, complessivamente, può andare da ~0,1° a ~170°. Tuttavia, non esiste una singola macchina in grado di coprire un così ampio intervallo e si deve ricorrere a tecniche strumentali molto diverse tra loro che operano a diversi angoli: tra ~0,1° e ~10° (Low Angle Light Scattering, LALS) vengono utilizzati sensori bidimensionali, come ad esempio CCD o array di fotodiodi, mentre a più grandi angoli, tra ~10° e ~170° (Wide Angle Light Scattering, WALS) si utilizzano rivelatori unidimensionali più sensibili, come ad esempio fotomoltiplicatori o fotodiodi a valanga. A seconda che si operi nel regime LALS o WALS è possibile caratterizzare sospensioni di particelle con dimensioni comprese tra ~1-100 μm (LALS) e ~0,05-2 μm (WALS), ricavando in ambo i casi il peso molecolare, le dimensioni medie (raggio di girazione) e la morfologia della struttura dei macrosoluti in soluzione. Dall'analisi dei dati WALS in funzione della concentrazione dei soluti è inoltre possibile determinare il secondo coefficiente del viriale della pressione osmotica, un parametro correlato alle interazioni soluto-soluto e soluto-solvente.

La terza tecnica (MWT) consiste nel misurare il coefficiente di estinzione del campione in funzione della lunghezza d'onda, tipicamente in un intervallo spettrale che comprende il NIR-VIS-UV (~0,3-1 μm). La tecnica



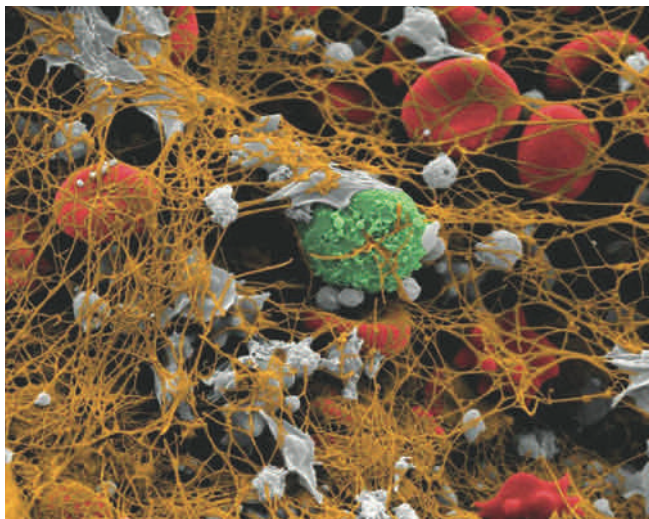


Fig. 1 - Immagine da microscopio a scansione elettronica di un coagulo di sangue. I falsi colori denotano: in marrone le fibre, in rosso i globuli rossi, in grigio le piastrine, e in verde i globuli bianchi. La figura è stata adattata dalla pagina web <http://www.med.upenn.edu/apps/faculty/index.php/g275/p20310>

MWT non è propriamente una tecnica di scattering in quanto non misura direttamente l'intensità della luce diffusa ai vari angoli, ma la potenza della luce complessivamente trasmessa dal campione, il cui valore è attenuato rispetto alla potenza incidente a causa dello scattering. Tramite la MWT è possibile ricavare informazioni su dimensioni di particelle con diametri compresi tra e  $\sim 0,1-2 \mu\text{m}$ , quindi in un intervallo molto simile a quello della tecnica WALS.

Risulta quindi evidente come combinando le varie tecniche (come ad esempio DLS e WALS, oppure LALS e MWT), sia possibile estrarre informazioni su un intervallo di lunghezze di scala molto più ampio di quello permesso dai singoli metodi. In alcuni casi è possibile studiare anche la cinetica di evoluzione dei vari parametri di interesse in funzione del tempo o della temperatura, ottenendo quindi informazioni dettagliate sulla struttura di prodotti intermedi durante, per esempio, reazioni di polimerizzazione, aggregazione, nucleazione e degradazione.

In questo articolo descriveremo una specifica applicazione delle tecniche di scattering allo studio della cinetica di formazione di gel di fibrina e mostreremo come, attraverso misure simultanee di LALS e MWT, sia possibile ricavare informazioni strutturali e cinetiche sul processo di polimerizzazione che porta dalla formazione dei primi oligomeri alla crescita del gel finale.

### Gel di fibrina

I gel di fibrina sono reti biopolimeriche di fondamentale importanza nel processo di emostasi poiché costituiscono il principale fattore strutturale del coagulo del sangue [3, 4]. Infatti, a seguito di

una ferita, la rete di fibrina che si forma in prossimità del danno vascolare, inizia ad intrappolare i vari componenti del sangue (piastrine, globuli rossi, globuli bianchi), formando il coagulo che nel giro di pochi minuti ferma il sanguinamento (vedi Fig. 1). I gel di fibrina giocano un ruolo importante anche in altre situazioni patologiche, come ad esempio nel caso di trombosi e di cancro, poiché è noto che le cellule tumorali tendono a migrare nei vasi sanguigni attraverso reti di fibrina. Grazie alle loro straordinarie proprietà meccaniche (elasticità, estensibilità, resistenza) e alla loro origine naturale, i gel di fibrina sono materiali completamente bio-compatibili. Di conseguenza, rappresentano substrati ideali per molte applicazioni biotecnologiche, che vanno dalla chirurgia (adesivi e sigillanti noti con il nome di colle di fibrina), all'ingegneria tissutale (crescita di cellule per rigenerazione di tessuti biologici), alla somministrazione localizzata di farmaci.

I gel di fibrina si formano a partire dalla polimerizzazione del fibrinogeno (FG), una macromolecola presente nel sangue dei vertebrati che, attivata dall'enzima trombina (Thr), aggrega formando lunghe fibrille inizialmente sottili ( $\sim 5-10 \text{ nm}$ ) che poi cominciano a ramificare e crescere lateralmente. Il risultato finale è la formazione di fibre molto più spesse (diametro  $\sim 100-150 \text{ nm}$ ) delle fibrille di partenza, intrecciate insieme in modo disordinato a costituire una rete polimerica che pervade l'intero volume a disposizione ed è caratterizzata da una porosità relativamente grande, con dimensioni di maglia dell'ordine di  $5-50 \mu\text{m}$ . La struttura finale del gel dipende dalle proprietà chimico-fisiche della soluzione polimerizzante (concentrazione di FG e Thr, pH, forza ionica, presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) che controlla, al tempo stesso, anche la cinetica del processo di crescita. Ne segue che struttura e cinetica sono strettamente legate, a dimostrazione del fatto che le modalità di crescita determinano la struttura finale del gel che ne deriva e di conseguenza la sua funzionalità biologica. Quest'ultima dipende sia da parametri microscopici, quali diametro e densità delle fibre, ma anche dalle proprietà morfologiche e

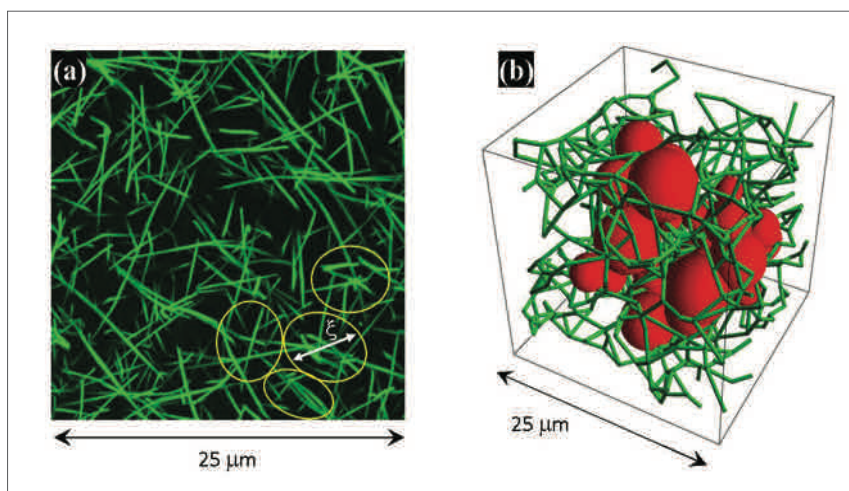


Fig. 2 - (a) Rappresentazione grafica 3D di un gel di fibrina ottenuto da immagini prese con un microscopio confocale. Le regioni all'interno delle ellissi rappresentano le zone a più alta concentrazione di fibre, utilizzate nel modello (vedi testo) per schematizzare il gel come un insieme di blob frattali di dimensione  $\xi$ . (b) Rappresentazione grafica 3D di un gel di fibrina *in silico* ottenuto ricostruendo la struttura del gel mediante assemblaggio di oggetti cilindrici di ugual diametro e diverse lunghezze [9, 10]. Le sfere rosse rappresentano le sfere le più grandi che possono essere inserite tra le fibre (tangenti a quattro fibre) e il loro diametro medio fornisce una stima accurata delle dimensioni medi dei pori del gel. La figura è stata adattata da [9, 10]

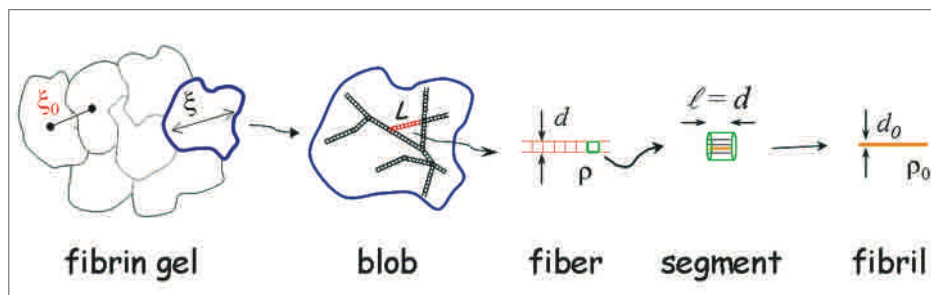


Fig. 3 - Modello a blob di un gel di fibrina: il gel viene schematizzato come un insieme di blob frattali di dimensione  $\xi$ , impaccettati densamente ad una distanza media  $\xi_0$ . Ogni blob è costituito assemblando con morfologia frattale fibre dritte di ugual diametro  $d$  e diverse lunghezze  $L$ . Le fibre sono legate insieme in diversi punti nodali, che costituiscono i punti di ramificazione della rete. Ogni fibra è formata impilando insieme segmenti cilindrici di diametro  $d$ , densità  $\rho$  e lunghezza  $\ell = d$ . Infine, ogni segmento è ottenuto impaccettando non densamente molte fibrille, in modo tale che  $d > d_0$  e  $\rho < \rho_0$ . La figura è stata adattata da [9]

meccaniche dell'intera rete, quale ad esempio la sua porosità e deformabilità sotto stress.

Avere quindi una tecnica di indagine che ci permette di misurare questi parametri è di grande interesse, ma di non facile realizzazione poiché essi coprono lunghezze di scala che si estendono su diverse decadi, da centinaia di nanometri a decine di micron. In passato abbiamo utilizzato varie tecniche di scattering statico [5-7], ma sempre in maniera indipendente le une dalle altre, ovvero applicate a campioni diversi (anche se preparati con la stessa procedura), la cui riproducibilità è una delle limitazioni più grandi. Solo recentemente abbiamo realizzato uno strumento in grado di effettuare misure *simultanee* di LALS e MWT esattamente sullo *stesso campione* all'interno della stessa cella di analisi.

**Modellizzazione e analisi dati**

Se analizzato con un microscopio confocale [Fig. 2(a)], un gel di fibrina appare come una rete di fibre, abbastanza monodisperse in diametro, non uniformemente distribuite nello spazio e connesse tra loro attraverso diversi punti di ramificazione. Sebbene ciascuna fibra sia piuttosto dritta e quindi rappresenti un oggetto con dimensione frattale di

massa  $D_m \sim 1$ , quando si considera l'intero sistema la disposizione spaziale delle fibre produce una struttura che su piccole lunghezze di scala è caratterizzata da una morfologia frattale con  $1 < D_m < 2$ , mentre su scale confrontabili o più grandi della dimensione media dei pori, il gel appare essere piuttosto uniforme, con una tendenza a mostrare una certa periodicità nella quale si alternano zone più dense a zone meno dense.

Una struttura così complessa può essere descritta utilizzando un *modello a blob* [8] simile a quello proposto diversi anni fa da P.G. De Gennes (premio Nobel in Fisica nel 1991) per descrivere un aggregato o

polimero costituito da tanti monomeri confinati in una regione spaziale limitata senza una geometria ben definita. Facendo ricorso a questo modello (vedi Fig. 3), possiamo quindi descrivere un gel di fibrina come un insieme di blob frattali (aventi dimensione frattale  $D_m$ ), di dimensione  $\xi$ , impaccettati densamente e correlati spazialmente. I blob sono centrati intorno alle regioni dove la concentrazione delle fibre è più alta, ad una distanza media  $\xi_0$  tra i loro centri di massa in modo che possano sovrapporsi di un fattore  $\eta = \xi/\xi_0$ . Ciascun blob è costruito assemblando molti segmenti che possono essere schematizzati come oggetti cilindrici di diametro  $d$ , lunghezza  $\ell$  e densità  $\rho$ . Questi segmenti sono uniti con legami di tipo end-to-end in modo da formare fibre dritte di diametro  $d$  e lunghezza  $L > \ell$ . Tuttavia in qualche sito di legame essi possono anche ramificare dando luogo ad una struttura completamente interconnessa fatta da fibre dritte di diverse lunghezze  $L$ . Come mostrato in nostri lavori precedenti [9-11], la distanza media tra i blob  $\xi_0$  fornisce un'accurata stima della dimensione media dei pori, che può essere quantitativamente definita come il diametro medio delle sfere più grandi che possono essere inserite tra le fibre del gel [vedi Fig. 2(b)].

Sulla base del modello sopra descritto, abbiamo sviluppato uno speci-

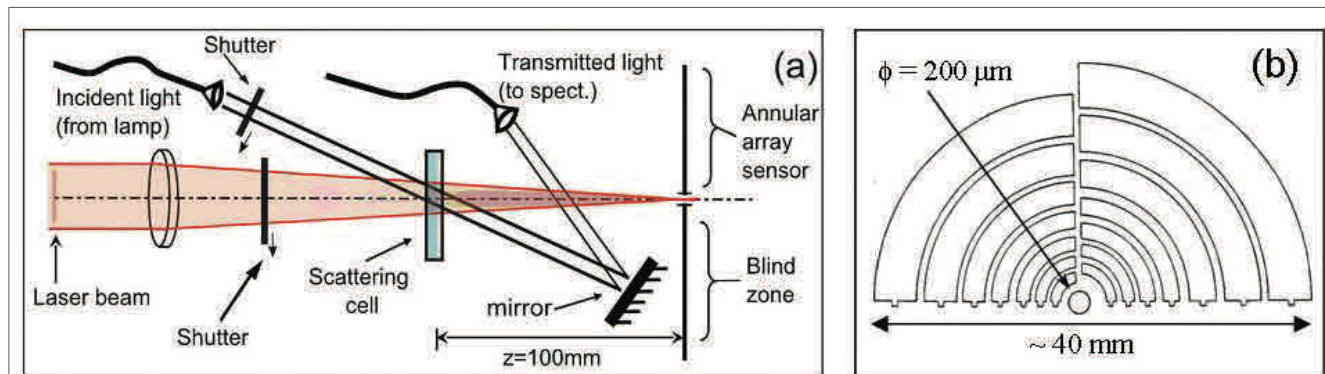


Fig. 4 - (a) Schema dell'apparato sperimentale LALS + MWT. Utilizzando due otturatori, il campione viene alternativamente illuminato con un fascio laser focalizzato e un fascio di luce bianca proveniente da una fibra ottica. Per la misura della luce diffusa a basso angolo viene utilizzato un sensore ad anelli posto nel piano focale della lente, mentre per la misura di turbidimetria si utilizza uno spettrofotometro a fibra ottica che raccoglie la luce bianca trasmessa dal campione. (b) Geometria del sensore utilizzato per la misura LALS: è costituito da 31 fotodiodi a forma di quarto di corona circolare concentrica, posizionati ad una distanza dal centro che aumenta secondo una progressione geometrica, da un raggio minimo di  $\sim 200 \mu\text{m}$  ad un raggio massimo di  $\sim 20 \text{ mm}$ . Un piccolo foro ( $\phi = 200 \mu\text{m}$ ) posizionato al centro del sensore permette al fascio focalizzato trasmesso di passare indisturbato. La figura è adattata da [12] con il permesso della American Chemical Society (2015)



fico fattore di forma in grado di interpolare i dati di SLS e di ricavare i vari parametri d'interesse che caratterizzano la struttura del gel, quali il diametro  $d$  e la densità  $\rho$  delle fibre, la dimensione media  $\xi_0$  dei pori e la dimensione frattale  $D_m$  che descrive la morfologia della rete. Tuttavia al fine di ricavare stime attendibili per questi parametri c'è bisogno di un ampio intervallo angolare su cui misurare la distribuzione angolare di SLS, e uno strumento da solo (LALS o WALS) non è sufficiente. In compenso, abbiamo dimostrato come combinando insieme LALS e MWT sia possibile ricavare tutti e quattro i parametri di cui sopra quando le dimensioni soprattutto laterali dei polimeri superino un certo valore di soglia. Ciò è possibile poiché la tecnica LALS, che è sensibile alle grandi lunghezze di scala, è in grado di stimare  $\xi_0$  e  $D_m$  senza essere influenzata dai valori di  $d$  e  $\rho$ . Al contrario la tecnica MWT, che si basa sull'integrazione angolare della distribuzione della luce diffusa in accordo al fattore di forma sviluppato secondo il modello sopra descritto, ha bisogno della conoscenza di  $\xi_0$  e  $D_m$  per poter ricavare in modo accurato  $d$  e  $\rho$ . Ne segue che solo combinando insieme le due tecniche (o ricavando  $\xi_0$  e  $D_m$ , per altra via e utilizzando solo MWT) è possibile ricavare tutti e quattro i parametri d'interesse del gel.

### Apparato sperimentale

L'apparato sperimentale per le misure simultanee di LALS e MWT consiste in uno strumento non commerciale LALS progettato e realizzato [12] presso il laboratorio To.Sca.Lab. a Como sul quale è stato implementato uno spettrofotometro commerciale a fibra ottica che permette di eseguire misure di MWT nell'intervallo spettrale IR-VIS-UV. Entrambe le misure sono eseguite nella modalità *time-resolved*, così da poter studiare non solo la struttura del gel finale, ma anche la cinetica del processo di polimerizzazione.

Come mostrato in Fig. 4(a), la cella contenente il campione è alternativamente illuminata, usando due otturatori controllati da PC, con un fascio laser focalizzato (laser He-Ne,  $\lambda=0,6328 \mu\text{m}$ ) e un fascio di luce bianca ottenuto utilizzando un collimatore a fibra ottica. Il rivelatore LALS, che è costituito da una serie di 31 fotodiodi a forma di quarti di corone circolari concentriche [Fig. 4(b)], è posizionato sul piano di Fourier, ovvero il piano sul quale il fascio viene focalizzato. In questa configurazione esiste una corrispondenza biunivoca tra la luce che viene diffusa ad un assegnato angolo di scattering e una posizione radiale sul piano del sensore. Pertanto, ogni fotodiodo raccoglie la luce diffusa ad un assegnato angolo  $\theta$  dato da  $\theta=\text{tg}^{-1}(r/z)$ , dove  $r$  è la distanza media del fotodiodo dall'asse ottico e  $z$  la distanza tra la cella e il piano di Fourier. Poiché i raggi minimo e massimo degli anelli sono di rispettivamente  $\sim 180 \mu\text{m}$  e  $\sim 17 \text{mm}$ , l'intervallo angolare coperto dallo strumento è notevolmente ampio, tra  $\sim 0,1^\circ$  e  $\sim 10^\circ$  ( $z=100 \text{mm}$ ). Un'altra caratteristica premiante del nostro

senso è quella di avere al centro, in corrispondenza dell'asse ottico, un piccolo foro ( $\phi=200 \mu\text{m}$ ) che permette al fascio focalizzato di passare indisturbato. In tal modo l'intensità di luce spuria, che altrimenti cadrebbe sui vari fotodiodi, viene ridotta in maniera drastica.

Poiché il sensore copre solamente metà del piano di Fourier, è stato possibile posizionare sul restante semipiano uno specchio che riflette il fascio di luce bianca trasmesso dal campione e lo indirizza sulla lente di collezione accoppiata allo spettrofotometro. In questo modo le misure di LALS e MWT vengono eseguite sulla stessa porzione di campione illuminata, alternativamente dal laser e dal fascio di luce bianca.

### Risultati sperimentali

L'apparato di Fig. 4 è stato usato per studiare la cinetica di polimerizzazione di gel di fibrina che si formano a partire da una soluzione di fibrinogeno attivato dall'enzima trombina in condizioni quasi-fisiologiche. Dettagli sulla preparazione del campione possono essere trovati in [5, 6]. Come già descritto in passato [5, 6], la cinetica di crescita di un tale sistema è caratterizzata da tre regimi distinti: una prima fase (detta di "*networking*") durante la quale si forma l'impalcatura della rete dovuta alla formazione di legami tra le fibrille che stanno crescendo in lunghezza. Durante questa fase, la soluzione è trasparente poiché in soluzione ci sono prevalentemente monomeri liberi di muoversi, mentre le fibrille ferme che costituiscono la rete sono così sottili da non diffondere abbastanza luce da poter essere rivelata da entrambe le tecniche LALS e MWT. Segue poi una seconda fase (detta di "*ripening*") durante la quale la rete iniziale comincia a riaggiustare la sua struttura a causa dell'aggiunta dei monomeri/oligomeri e delle altre fibrille ancora libere in soluzione. Ne segue che le fibrille che costituivano l'impalcatura originale della rete

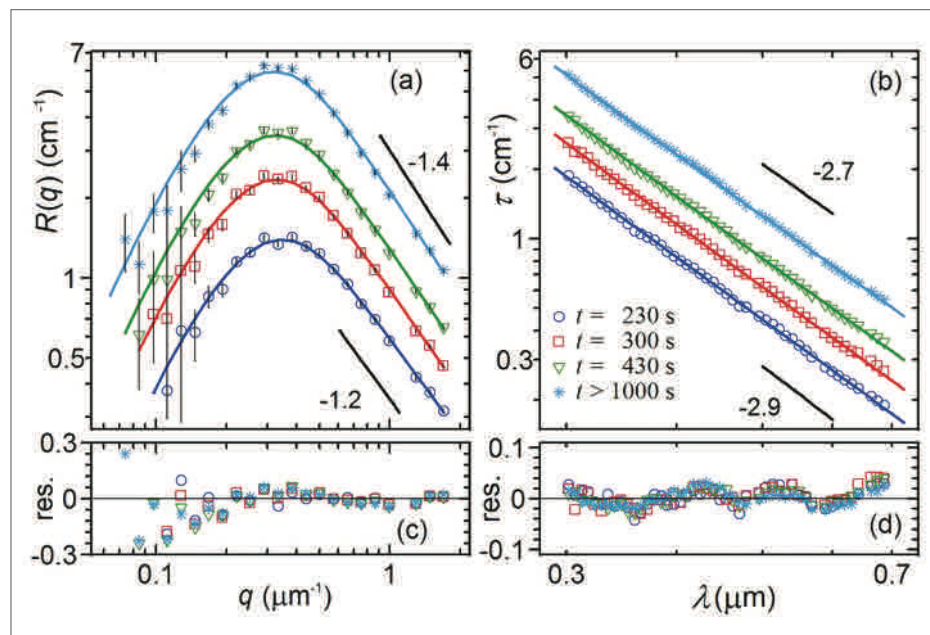


Fig. 5 - Dati LALS (a) e MWT (b) presi su una soluzione di fibrina ( $c_{\text{FG}}=0,45 \text{ mg/ml}$  con rapporto molare di trombina, Thr/FG=1/100) a vari tempi di polimerizzazione dopo il mixing di fibrinogeno e trombina. Le linee continue rappresentano i fitting ottenuti con il metodo di analisi accennato nel testo e descritto in dettaglio in [12]. La figura è riprodotta da [12] con il permesso della American Chemical Society (2015)



iniziano a crescere lateralmente formando delle fibre (costituite da bandoli di fibrille) il cui diametro cresce progressivamente con il tempo. È questo il momento al quale i segnali di diffusione e turbidità cominciano ad essere rilevabili dalla strumentazione e analizzabili quantitativamente. C'è poi una terza fase (detta di "thickening") durante la quale la struttura della rete è già così consolidata che l'aggiunta di altre fibrille non produce alcun raggiustamento strutturale e l'unico effetto è un ispessimento progressivo delle fibre, con relativi aumenti dei segnali di scattering e turbidità, fino ad esaurimento dei monomeri a disposizione.

Tale comportamento è facilmente riscontrabile nella Fig. 5 che si riferisce parzialmente alla fase di ripening e totalmente a quella di thickening, al termine della quale ( $t > 1000$  s) sia le curve di LALS che di MWT rimangono stazionarie. Dal fit globale di queste ultime due curve, come descritto al paragrafo precedente, è stato possibile ricavare che il gel formatosi in queste condizioni è caratterizzato da una dimensione media di maglia  $\xi_0 \sim 13$   $\mu\text{m}$ , dimensione frattale  $D_m \sim 1,4$ , diametro medio delle fibre  $d \sim 90$  nm e densità delle fibre  $\rho \sim 0,4$  g/cm<sup>3</sup>.

Tale metodo di analisi dati non può essere applicato alle altre curve di LALS e MWT prese a tempi precedenti (quando il gel è ancora in fase di crescita). In questo caso infatti, la concentrazione del fibrinogeno presente nelle fibre che formano la rete è solo una frazione della concentrazione totale messa inizialmente in soluzione e non è nota. Tuttavia, facendo l'ipotesi che il modello a blob che descrive il gel finale sia valido anche per il gel in fase di crescita, è possibile ricavare anche per quest'ultimo i quattro parametri di interesse, ovvero  $\xi_0$ ,  $D_m$ ,  $d$  e  $\rho$ . Come corollario, si ha anche una stima della concentrazione di fibrinogeno che viene usata per formare la rete iniziale, con il risultato assai sorprendente che al tempo di *networking* ~80% del fibrinogeno è ancora in soluzione come monomeri (o oligomeri) non legati alla rete. Altro risultato molto interessante da questa analisi è il valore della densità delle fibre del gel finale che essendo  $\rho \sim 0,4$  g/cm<sup>3</sup>, è molto più piccolo della densità del fibrinogeno ( $\rho_{FG} \sim 1,4$  g/cm<sup>3</sup>). Le fibrille quindi non sono unite in modo compatto all'interno delle fibre, ma intercalate con molte molecole di solvente, e formano un bandolo la cui struttura è consistente con le peculiari proprietà elastiche dei gel di fibrina [13].

Infine è interessante notare come il meccanismo di formazione basato sulle tre fasi di *networking*, *ripening* e *thickening*, sia perfettamente consistente con la funzionalità fisiologica del fibrinogeno, il cui scopo è formare rapidamente una rete che pervada la zona nella quale è avvenuto il danno vascolare intrappolando le prime piastrine, e successivamente irrobustendo le sue fibre in modo che la rete sia sufficientemente forte ed elastica da creare un tappo emostatico in grado di reggere la pressione sanguigna.

### Conclusioni

In questo breve articolo abbiamo mostrato come, attraverso l'utilizzo combinato della tecnica di diffusione a basso angolo (LALS) e della tecnica di turbidimetria a molte lunghezze d'onda (MWT), sia possibile caratterizzare le proprietà fisiche di reti biopolimeriche di natura filamentosa, determinandone dimensione dei pori, diametro e densità delle fibre, e dimensione frattale, che descrive la loro morfologia. Le due tecniche LALS e MWT sono state integrate in un unico strumento che ci ha permesso di studiare non solo la struttura finale del gel, ma anche la sua cinetica di crescita, determinando l'evoluzione temporale dei vari

parametri durante le diverse fasi del processo di polimerizzazione. L'utilizzo combinato delle due tecniche è stato di vitale importanza poiché, data l'enorme differenza di lunghezze di scala dei parametri da ricavare (da  $\leq 100$  nm per il diametro a  $\geq 10$   $\mu\text{m}$  per i pori), ciascuna delle due tecniche, singolarmente, non sarebbe stata in grado di fornire stime attendibili.

Sebbene in questo lavoro ci siamo focalizzati sui gel di fibrina, l'approccio sperimentale proposto è di validità generale e può essere applicato a varie altre reti biopolimeriche filamentose, quali ad esempio actina e collagene, ma anche a reti di natura non organica, quali ad esempio gel di silice o gel colloidali. Inoltre va citato che in questo lavoro ci siamo limitati alla combinazione delle due sole tecniche LALS e MWT. In linea di principio (ma anche con molte più difficoltà di natura tecnica) è possibile costruire un apparato sperimentale che riesca ad integrare insieme LALS, MWT e WALS, estendendo ancor di più l'intervallo di lunghezze di scala investigabili. Ed infine, tale intervallo può essere esteso ulteriormente integrando le tecniche di scattering di luce con la analoga tecnica di scattering a raggi X a basso angolo (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) [13]. In quest'ultimo caso, tuttavia, al fine di effettuare misure risolte in tempo, è necessario ricorrere ad una sorgente di raggi X a grande brillantezza e l'intero apparato deve essere installato presso una sorgente di luce di sincrotrone.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] B.J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Wiley, NY, 1976.
- [2] F. Scheffold, R. Cerbino, *Curr. Op. Coll. Int. Science*, 2007, **12**, 50.
- [3] J.W. Weisel, *Adv. Protein. Chem.*, 2005, **70**, 247.
- [4] P.A. Janmey, J.P. Winer, J.W. Weisel, *J. R. Soc. Interface*, 2009, **6**, 1.
- [5] F. Ferri *et al.*, *Phys. Rev. E*, 2001, **63**, 31401/1-17.
- [6] F. Ferri *et al.*, *Phys. Rev. E*, 2002, **66**, 11913/1-13.
- [7] M. De Spirito *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, 2003, **36**, 636.
- [8] P.G. De Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1979.
- [9] D. Magatti *et al.*, *Bioph. J.*, 2013, **104**, 1150.
- [10] M. Molteni *et al.*, *Bioph. J.*, 2013, **104**, 1160.
- [11] M. Molteni *et al.*, *Bioph. J.*, 2013, **104**, 2776.
- [12] F. Ferri *et al.*, *Macromolecules*, 2015, **48**, 5423.
- [13] M. Rocco *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5376.

### Light Scattering and Turbidimetry for the Characterization of Biomaterials: the Case of Fibrin Gels

The mechanical properties and biological functionalities of biopolymeric networks depend on their structure. By using low angle light scattering and turbidimetry techniques, which are implementable in a single instrument, it is possible to determine the gel pore size, the diameter and density of the fibers, and the fractal morphology of the network.

# Dosimetro acustico

## Misuratore di rumore

# ATEX

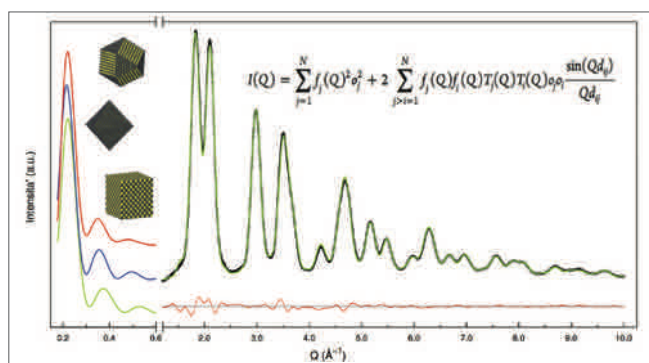


[www.svantek.it](http://www.svantek.it)  
**SVANTEK ITALIA**

Svantek Italia srl Via S. Pertini 12, - 20066 Melzo MI Tel. 02 57609229 Fax: 02 95735721

# TECNICHE DI “X-RAY TOTAL SCATTERING” PER LA CARATTERIZZAZIONE DI NANOMATERIALI

La complessità di materiali nanostrutturati richiede lo sviluppo di tecniche avanzate per la loro completa caratterizzazione strutturale e microstrutturale. Tra di esse, i metodi sperimentali e di modeling fondati sulla Equazione di Scattering di Debye costituiscono uno strumento innovativo per determinare stechiometria, struttura, dimensioni, forma e difettività di tali materiali.



La disposizione ordinata e periodica degli atomi in materiali cristallini ha consentito alle tecniche diffrattometriche, nel corso degli ultimi cent'anni, la caratterizzazione strutturale di migliaia di specie chimiche (elementi, minerali, materiali molecolari, polimeri, farmaci e proteine, etc.), confidando nella tacita assunzione che campioni reali (fino alla scala micrometrica) e cristalli idealmente infiniti coincidessero. Tuttavia, materiali “cristallini” di dimensioni nanometriche non soddisfano più tale assunzione: intrinsecamente possono esibire solo un ordine a corto raggio; inoltre, l'elevata quantità di atomi che si trova in prossimità della superficie (spesso la frazione maggioritaria) percepisce un intorno chimico/energetico diverso rispetto agli atomi che si trovano all'interno della nanoparticella. Ne conseguono effetti di superficie che possono indurre modifiche strutturali e microstrutturali significative, spesso di non facile predizione, in particolare quando la dimensione dei domini cristallini si estende a pochi (o a poche decine di) nanometri. Tali effetti possono essere ulteriormente e variamente condizionati da molecole di leganti spesso utilizzate per controllare la crescita delle nanoparticelle e/o come agenti passivanti. Un tale comportamento è stato sperimentalmente osservato in diversi metalli, ossidi, semiconduttori, (bio)ceramiche, polimeri e in molti altri sistemi molecolari. Se da un lato la disposizione atomica modificata può fornire nuove ed uniche proprietà chimico-fisiche (ottiche, elettroniche, catalitiche, magnetiche, etc.) non presenti

nello stesso materiale alla scala massiva, d'altro canto, tale circostanza rende l'assunzione che la disposizione atomica alla nanoscala sia quella nel materiale massivo (come comunemente riportato) una semplificazione eccessiva. Di concerto, l'attenzione della comunità scientifica e industriale verso nuove proprietà tecnologicamente avanzate ed i vantaggi che le stesse potrebbero portare alla nostra vita di tutti i giorni, hanno aperto nuovi scenari in questo campo. Infatti, nuove vie di sintesi di nanoparticelle sono continuamente sperimentate e proposte, per ottimizzare il controllo della dimensione, della forma (in *nanorods*, *nanowires* e *nanoplatelets*), delle organizzazioni supramolecolari e dell'auto-assemblaggio di nano-oggetti complessi e di loro ibridi. Ciononostante, le dimensioni limitate dei materiali alla nanoscala e la loro crescente complessità al diminuire della taglia hanno messo in evidenza i limiti dei metodi cristallografici convenzionali. La diffrazione da polveri di raggi X e neutroni, ovvero la tecnica principe nello studio di *materiali reali complessi* a scala atomica, ha raggiunto, ai giorni d'oggi, un alto livello di maturità. Questi metodi sono attualmente in largo uso per la caratterizzazione della struttura e della microstruttura di campioni microcristallini, tramite la modellazione dell'intera traccia di diffrazione, in presenza di picchi Bragg, con l'approccio *à la* Rietveld [1]. Tuttavia, le tracce di diffrazione raccolte da materiali nanocristallini mostrano uno scattering di Bragg particolarmente ampio (in termini angolari), e comunque debole, e una quantità significativa di intensità diffusa (*tra e sotto* i picchi di Bragg), generata dalle dimensioni limitate, da effetti di forma ed estesa presenza di difetti (Fig. 1) [2]. L'approccio Rietveld, per come definito, non è in grado di estrarre la non trascurabile quantità di informazione contenuta nell'intensità diffusa, rendendo l'analisi con tali metodi approssimata e, in alcuni casi, insufficiente. Pertanto, nasce l'esigenza di sviluppare, sia dal lato sperimentale che di modellizzazione, tecniche diffrattometriche avanzate, capaci di utilizzare la totalità dell'informazione presente nel dato misurato, al fine di poter interpretare correttamente le proprietà funzionali in termini di struttura e microstruttura del campione e di indirizzare la sintesi e la produzione di nanomateriali altamente performanti. Dato che il formalismo di Bragg fallisce, l'attenzione deve essere principalmente rivolta a quei metodi che intrinsecamente trattano l'intera traccia di *scattering*. Tali metodi cadono sotto il nome di tecniche di Total



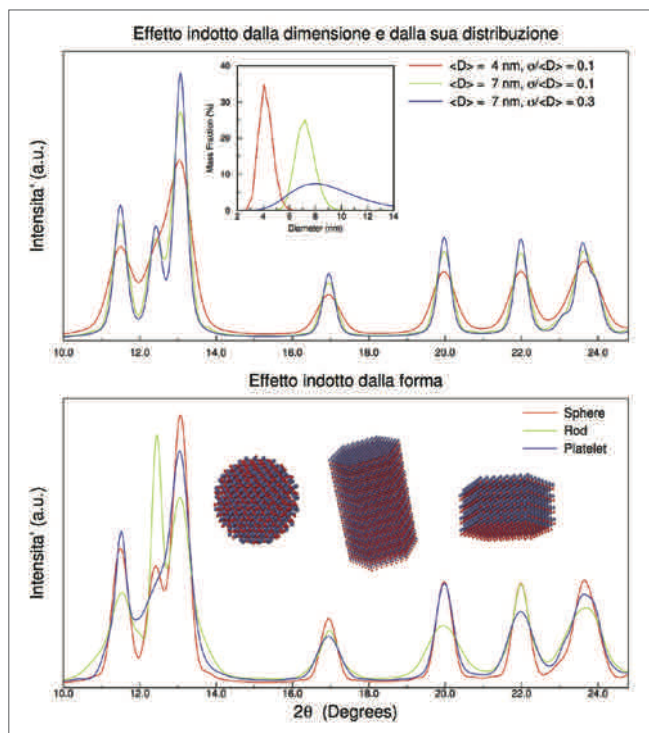


Fig. 1 - In alto: simulazioni di tracce di X-ray Total Scattering, ottenute con l'approccio DFA e il software DebUsSy, per nanoparticelle isotrope di ZnO a diversa dimensione, e distribuzione (nell'inset); in basso: effetto della forma per nanoparticelle di ZnO di uguale volume

Scattering, come la Pair Distribution Function [3] (PDF) e la Debye Function Analysis [4] (DFA). Mentre la tecnica PDF determina la distribuzione delle distanze interatomiche con una trasformata di Fourier della traccia di scattering sperimentale, l'approccio DFA si basa sulla costruzione di modelli atomistici delle particelle e, utilizzando l'equazione di scattering di Debye (DSE) [5], interpreta la traccia di scattering sperimentale come somma dei contributi dei diversi componenti, calcolati a partire dal set di distanze interatomiche di ogni particella. Le due tecniche sono anche citate con il nome di Total Scattering nello spazio reale (PDF) o reciproco (DFA). In ambedue i casi:

- i) non è necessaria alcuna assunzione sull'ordine della disposizione atomica, svincolandosi pertanto dalla periodicità cristallina insita nei metodi convenzionali;
- ii) è richiesto un rigoroso controllo delle condizioni sperimentali di misura, per poter eliminare dal segnale tutti i contributi di intensità che non provengono dal campione (per esempio dal porta-campione, dall'aria o per fenomeni di fluorescenza o scattering inelastico per effetto Compton).

Nel seguito, l'attenzione verrà focalizzata principalmente sull'approccio DFA, utilizzato presso il To.Sca.Lab di Como, dove è sviluppato in collaborazione con il Paul Scherrer Institut (PSI), illustrandone diversi esempi di applicazione.

### La Debye Function Analysis: il metodo

L'equazione di scattering di Debye è stata presentata cent'anni fa, nel 1915 [5]; sebbene costituisca uno strumento essenziale per lo studio di materiali disordinati o alla nanoscala, essa richiede tempi di calcolo formidabili, che ne hanno limitato l'applicazione nel corso dei decenni successivi. Questo problema è stato recentemente superato dalla definizione, e implementazione,

di algoritmi numerici avanzati, che hanno reso l'intero approccio DFA uno strumento potente per determinare struttura, dimensione, forma (e loro distribuzioni), stechiometria e difettualità di nanomateriali.

Come anticipato, la DSE è capace di modellare l'intera traccia di scattering di una qualsiasi nanoparticella. Nel caso reale in cui un campione è costituito da una ben definita popolazione di nanocristalli di taglia differente, si può sommare il loro contributo per riprodurre l'intero pattern di diffrazione, disponibile sperimentalmente (tipicamente, ma non solo, con radiazione da sincrotrone). A questo scopo, le distribuzioni di dimensione e forma (nel caso di morfologie allungate, quali nanorods, o appiattite, quali nanoplatelets), e gli effetti di deformazione del reticolo devono essere, il più correttamente possibile, considerati dalla DSE. In questo modo si riescono a determinare importanti dettagli strutturali e microstrutturali in tempi di calcoli limitati (o comunque accessibili), tramite ottimizzazione di un modello di partenza con procedure iterative. La chiave di volta di questa analisi è stato lo sviluppo di una suite di programmi che, partendo dalla generazione di cluster atomistici e dal calcolo di banche dati di distanze interatomiche opportunamente campionate, permette di riprodurre la traccia sperimentale e di ottimizzare diversi parametri del modello. Tutti questi programmi costituiscono un progetto Open Source chiamato **DebUsSy** (**DE**Bye **US**er **S**Ystem) e sono disponibili per piattaforme Linux e Mac OS X, nella versione 2.0, presso il sito dedicato [debussy.sourceforge.net](http://debussy.sourceforge.net) e in [toscalab.uninsubria.it](http://toscalab.uninsubria.it).

La filosofia di DebUsSy, che si fonda su un approccio a due fasi descritto in diversi lavori [4, 6], può essere riassunta in tre punti principali:

- 1) la generazione di popolazioni di nanocristalli di forma a scelta (isotropa o anisotropa) e taglia crescente, al fine di descriverne la distribuzione in sistemi reali;
- 2) l'utilizzo di distanze interatomiche campionate (al posto dell'intero set di quelle reali), e di una equazione di Debye modificata, per velocizzare i calcoli;
- 3) l'utilizzo di algoritmi di ottimizzazione iterativi (Simulated Annealing e Simplex) per raffinare i parametri del modello. Questi includono, in maniera non esaustiva, a) la distribuzione della taglia e della forma secondo un modello di curva lognormale mono- o bi-variata; b) la possibilità di trattare le occupanze di sito ed i fattori termici isotropi degli atomi variabili con la taglia delle particelle; c) la possibile deformazione delle distanze interatomiche per effetti di size (con differenti modelli) e d) la presenza di un fondo strutturato, attribuito a contaminanti, descritto da una polinomiale di Chebyshev fenomenologica, da una traccia di scattering di riferimento (un bianco), o da ambedue.

L'intera sequenza è stata automatizzata ed i dati di input minimali, facilmente definibili tramite una ricca interfaccia grafica (GUI), sono: il file *.cif* (da cui si estraggono i parametri di cella, il simbolo del gruppo spaziale ed il contenuto atomico dell'unità asimmetrica), e le informazioni selezionate riguardo la morfologia delle nano-particelle, oltre ad un limite massimo di dimensione delle stesse, nella fase di costruzione della popolazione; i parametri iniziali della distribuzione in dimensione e forma, e la definizione eventuale della funzione di *strain* (deformazione reticolare), nella fase di analisi dei dati sperimentali.

### Recenti applicazioni della DFA

Qui di seguito riportiamo alcuni esempi di applicazione dell'analisi con la DSE, recentemente apparsi nella letteratura scientifica. Vale la pena sottolineare che la caratterizzazione di nanomateriali con tecniche diffrattometriche presenta un valore statistico decisamente più elevato che non quello garantito dai metodi di microscopia convenzionali (SEM, TEM, AFM), di gran lunga

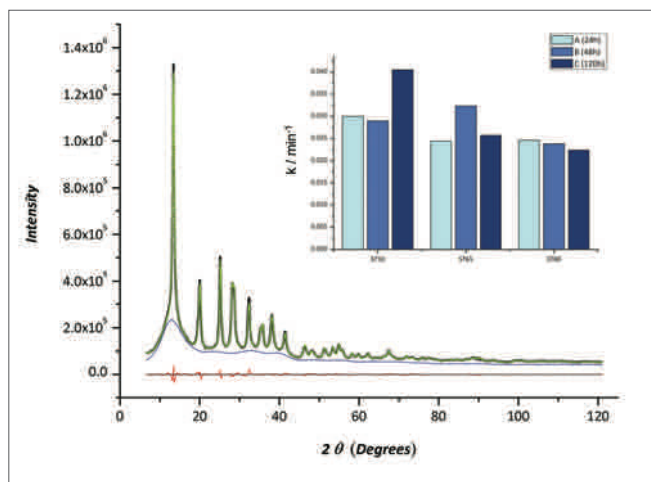


Fig. 2 - DFA fit per un composito di TiO<sub>2</sub> (nanocristallino) e SiO<sub>2</sub> (amorfo) di composizione nominale 1:1. La curva continua blu rappresenta la componente amorfa, quella verde la porzione nanocristallina. Nell'inset, la costante cinetica del primo ordine per la degradazione di blu di metilene promossa da anatasio nei nano compositi titania/silica, che ben correla con la composizione e le proprietà microstrutturali derivati via DFA

le più largamente usate nella caratterizzazione di sistemi alla nanoscala. Pertanto, l'approccio DFA qui brevemente descritto, è particolarmente indicato per la caratterizzazione in processi di *scale up*.

**Nanocompositi di biossidi di titanio e silicio per applicazioni eco-ambientali [7]**

Il TiO<sub>2</sub> nanostrutturato ha attratto l'attenzione di molti, in ambito accademico ed industriale, per la sua eccellente attività fotochimica. Applicazioni del TiO<sub>2</sub> vanno dalla purificazione di reflui a processi di *water-splitting*, da celle solari attivate da coloranti a tessuti autopulenti. La letteratura scientifica offre un ricco panorama in termini di approcci sintetici, metodologie sperimentali, analitiche e strutturali, oltre che a sofisticate tecniche computazionali e modellazione. Sintetizzato come nanocomposito con biossido di silicio (SiO<sub>2</sub>) amorfo, noto per essere un materiale ad alta porosità, il materiale costituisce un sistema ibrido particolarmente interessante per applicazioni eco-ambientali (trattamento di inquinanti organici in aria e in reflui).

Con l'approccio DFA, sono stati studiati ibridi SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> ottenuti per variazione sistematica di temperatura, concentrazione e condizioni di invecchiamento in preparazioni sol-gel, in cui il componente siliceo amorfo migliora le proprietà di adsorbimento del nanocomposito (Fig. 2). Grazie alla qualità dei dati di scattering, l'analisi ha permesso di ricavare la corretta composizione di fase (frazione di TiO<sub>2</sub> nanocristallino e di SiO<sub>2</sub> amorfo), di rilevare la presenza di una frazione amorfa di TiO<sub>2</sub>, e di descrivere l'evoluzione di dimensioni e forma della componente cristallina al variare del rapporto SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> e dell'invecchiamento dei campioni. Tali parametri sono stati correlati con caratterizzazioni indipendenti di assorbimento e degradazione di coloranti organici (inset di Fig. 2) e di area specifica superficiale, fornendo indicazioni circa le condizioni ottimali per ottenere il sistema ibrido con le migliori prestazioni.

**Nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro per applicazioni biomedicali [8]**

Nanoparticelle di ossido di ferro con struttura a spinello (magnetite, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, e maghemite, γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) sono state ampiamente studiate negli aspetti sia fonda-

mentali che applicativi. In particolare, il loro comportamento superparamagnetico (per dimensioni inferiori ai 50 nm), unito all'elevata biocompatibilità li rende particolarmente interessanti in ambito biomedicale per diagnosi (*NMR imaging*), terapia (rilascio controllato di farmaci e ipertermia) e, più recentemente, nello sviluppo di tecnologie teranostiche. Ciononostante, interpretare e controllare le proprietà magnetiche a queste dimensioni limitate costituisce una sfida scientifica ancora aperta, data la loro dipendenza da effetti composizionali, strutturali e di superficie, e da possibili interazioni tra nanoparticelle diverse, che risultano difficili da separare e quantificare con sufficiente accuratezza. Infatti, l'alta instabilità della magnetite (che contiene ioni Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> in rapporto 1:2) in aria causa la parziale ossidazione a maghemite e la formazione di strutture core-shell in cui lo spessore dello strato ossidato dipende dalla dimensione della nanoparticella.

Utilizzando metodi Total Scattering su più di 30 campioni differenti, isolati con metodi di coprecipitazione e una vasta gamma di condizioni di sintesi (concentrazioni, pH, T, ambienti ricchi di ossigeno o assolutamente inerti, etc.), l'analisi DFA ha permesso di determinare la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle, la dipendenza della stechiometria e della costante di cella al variare delle dimensioni e lo spessore della crosta completamente ossidata (maghemitica). Significativamente, tutte queste grandezze sono state determinate *simultaneamente*, per ciascun campione, su un'unica traccia di scattering, senza ricorrere a tecniche ancillari quali TEM, spettroscopia Mössbauer o altri metodi analitici. Alcuni tra i risultati più interessanti derivati da questa analisi sono qui di seguito elencati:

- a) la dimensione ridotta delle nanoparticelle causa un rilassamento superficiale, rilevabile al di sotto dei 5 nm, responsabile di un'espansione delle distanze interatomiche intorno all'1-2%;
- b) particelle con dimensioni di circa 10 nm possono contenere una frazione di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> vicina al 50%, mentre il contenuto medio di magnetite nell'intero campione è di solo 27%;
- c) una componente amorfa, quantificata tra il 15 e il 30% in peso, e con una traccia di diffrazione simile alla cosiddetta "2-lines ferrihydrite", è costantemente presente e costituisce uno strato magneticamente silente con uno spessore inferiore a 1,0 nm;
- d) la crosta di maghemite è caratterizzata da una frammentazione policristallina e prevede un parziale ordinamento delle vacanze, anche per campioni invecchiati *unicamente* a temperatura ambiente.

Infine, utilizzando l'intera distribuzione delle dimensioni derivata dalla DFA, e non solo il *valor medio*, si sono verificate la congruenza dei dati sperimentali di magnetizzazione e di costanti di anisotropia magnetica con il modello DFA e quello indipendente basato sulle equazioni di Chantrell, dimostrando che l'analisi DFA può fornire informazioni differenti (qui, magnetiche) in maniera alternativa.

**Nanopartiti biomimetiche per applicazioni biomedicali [9]**

Nanoparticelle di apatite biomimetica (Ap) sono molto simili in dimensione, forma e composizione alla componente minerale di denti ed ossa. Queste ultime sono formate da un composito organico-inorganico in cui nanocristalli di apatite carbonatata (cAp) crescono all'interno di una matrice di fibre di collagene mediante un complesso processo di biomineralizzazione, probabilmente a partire da un precursore amorfo di fosfato di calcio (ACP). Il controllo della morfologia cristallina è regolato principalmente dall'interazione con le fibrille di collagene e alcune proteine non collagenose, formando piccoli cristalli di forma piatta che si orientano nella direzione di allungamento delle fibrille. La morfologia dei nanocristalli gioca un ruolo rilevante nelle singo-



lari proprietà meccaniche del tessuto osseo e, quindi, è particolarmente importante poterla controllare nella preparazione di apatiti biomimetici. Non risulta però chiaro perché si abbia, nella formazione di queste piattine, una rottura di simmetria morfologica, nel senso che la crescita preferenziale non è conforme alla simmetria cristallina esagonale. Tuttavia, tali nanoparticelle si formano attraverso un meccanismo che, a tutt'oggi, rimane al centro del dibattito scientifico.

Utilizzando una serie di campioni sintetici, cristallizzati in presenza di ioni citrato (materiale organico abbondante nella crescita fisiologica del tessuto osseo) e, in qualche caso, di ioni carbonato, con l'aiuto di dati di scattering acquisiti con radiazione di sincrotrone, si sono determinate:

- l'abbondanza relativa di ACP e di nanocristalli di apatite (deficiente in ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , HA), che nel sistema modello appaiono di forma esagonale e a piattine. Si è stimata l'evoluzione di queste tre componenti (Fig. 3) al variare del tempo di precipitazione (tempo di maturazione);
- le mappe di distribuzione bivariata (bidimensionali), utilizzate per descrivere dimensioni e forma dei nanocristalli;
- la stechiometria di ciascuna fase cristallina, ovvero la dipendenza dei fattori di occupazione degli ioni calcio e dell'ossidrile presente nei canali della struttura, che influenzano le proprietà di dissoluzione delle apatiti (dipendenti dal rapporto Ca:P).

Infine, l'analisi dell'abbondanza relativa dei cristalli esagonali e piatti, delle variazioni delle dimensioni dei domini cristallini e della stechiometria dei campioni (che si avvicina all'idealità per tempi di maturazione superiori alle 96 ore) è stata accoppiata a misure indipendenti di carattere analitico (ICP) e microscopico (AFM). Grazie ad ulteriori informazioni ottenute dall'analisi Total Scattering in modalità PDF sulla traccia della componente amorfa, è stato possibile ricostruire un plausibile meccanismo di crescita cristallina, che spiega la morfologia piatta ereditata dal precursore amorfo e favorita dall'apparentemente contrastante effetto templante e inibitore del citrato, presente in cristalli idrati di  $\text{Na}_3$ (citrato) nelle prime fasi del processo, e come ione molecolare che coordina selettivamente le facce {100} durante la crescita dei nanocristalli.

## Conclusioni

Quanto riportato nei paragrafi precedenti non è che una breve presentazione di alcuni dei risultati ottenuti applicando un metodo di caratterizzazione chimico-fisica innovativo, basato sull'analisi DSE di dati di Total Scattering a raggi X, a classi di materiali omogenee, per lo più ioniche. Tuttavia, i più recenti lavori hanno dimostrato che anche polimeri organometallici [10], polimeri di coordinazione [11] e composti molecolari [12] possono essere adeguatamente analizzati con la DFA; ulteriori effetti microstrutturali (in particolare, spostamenti correlati di alcuni atomi, descritti dal modello paracristallino, o difetti di impilamento) possono essere introdotti nel modello, aumentando la versatilità del metodo e la sua diffusione per la caratterizzazione di campioni che presentano anomalie strutturali e tracce di diffrazione di difficile interpretazione. Da ultimo, queste tecniche si sono rivelate molto potenti anche nell'analisi di sistemi colloidali in sospensione [13], ambiente incompatibile con le comuni microscopie SEM e (HR)TEM. Considerando la complessità dei sistemi alla nanoscala, l'approccio DFA fornisce pertanto uno strumento ideale per la loro caratterizzazione alla scala atomica e nanometrica, con performances assicurate dall'utilizzo di strumentazione avanzata, da un controllo accurato della modalità di acquisizione dati e, soprattutto, dalla disponibilità di efficaci strumenti di calcolo e modellizzazione.

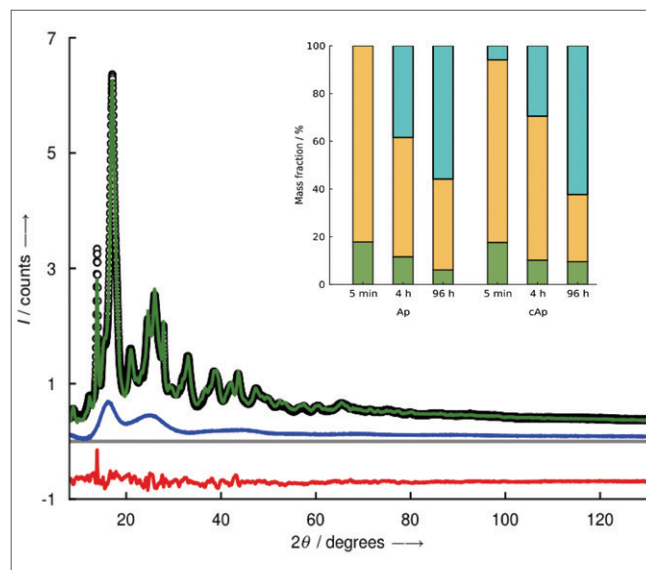


Fig. 3 - a) DFA fit di uno dei campioni di idrossiapatite carbonatata, isolato dopo solo 5 minuti di invecchiamento (in verde), in cui si evidenzia la copresenza del precursore amorfo di ACP (in blu) e il residuo tra tracce sperimentali e modello (in rosso); b) abbondanza relativa di ACP (in verde) e le fasi di apatite con forma esagonale (blu) o piatta (giallo), come stimato dalla procedura DFA per i campioni nanocristallini di apatite carbonatata (cAp) e non (Ap)

## BIBLIOGRAFIA

- R.A. Young, *The Rietveld Method*, Oxford, OUP, 1995.
- A. Guinier, *X-ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies*, New York, Dover, 1994.
- T. Egami, S.J.L. Billinge, *Underneath the Bragg peaks: structural analysis of complex materials*. Oxford, Pergamon Press, 2003.
- A. Cervellino *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, 2010, **43**, 1543; A. Cervellino, A. Guagliardi, in *Diffraction at the Nanoscale. Nanocrystals, Defective and Amorphous Materials*, 107-126, Varese, Insubria University Press, 2010.
- P. Debye, *Ann. Physik*, 1915, **46**, 809.
- A. Cervellino *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, 2015, **48**, 2026.
- G. Cernuto *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 3114; G. Cernuto *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 10828.
- R. Frison *et al.*, *Chem. Mater.*, 2013, **25**, 4820.
- J.M. Delgado-López *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**, 1090.
- A. Cervellino *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, 2012, **12**, 3631.
- J.A. Mason *et al.*, *Nature*, 2015, **527**, 357.
- F. Bertolotti *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, 2014, **14**, 2913.
- F. Bertolotti *et al.*, *Nature Mater.*, 2016, in press.

### X-ray Total Scattering Techniques for the Characterization of Nanomaterials

The complexity of nanosized materials requires the development of advanced structural and microstructural characterization techniques. Here, a forefront approach based on the Debye Scattering Equation is presented, providing the material scientist with a powerful tool to investigate stoichiometry, structure, size, shape and defects in nanocrystalline materials.



# ATMOSFERE POTENZIALMENTE ESPLOSIVE: VALUTAZIONE DELLA DISTANZA PERICOLOSA DERIVANTE DA RILASCIO DA ACCOPPIAMENTO FLANGIATO

Negli impianti industriali vi sono molte potenziali sorgenti di emissione di composti tossici ed infiammabili. In questo articolo il criterio della “distanza pericolosa” viene applicato per selezionare la guarnizione dell'accoppiamento flangiato, la quale minimizzi l'estensione della zona, che potrebbe contenere un'atmosfera potenzialmente esplosiva, derivante da un possibile rilascio di  $\text{NH}_3$  in un impianto  $\text{DeNO}_x$ . Questo criterio è finalizzato a migliorare il livello di sicurezza degli impianti, quando siamo in presenza di varie guarnizioni adatte per le previste condizioni di esercizio (pressione e temperatura).



**N**ell'industria di processo i sistemi di tenuta sono utilizzati per il contenimento dei fluidi, gassosi o liquidi, all'interno di un circuito o di un impianto, al fine di evitare efflussi verso l'esterno. Le emissioni fuggitive costituiscono un serio problema del settore industriale, poiché generano una perdita di efficienza dell'impianto, alla quale, considerando le caratteristiche chimico-fisiche della sostanza rilasciata, si possono sommare la pericolosità (esposizione a composti tossici, formazione di atmosfere potenzialmente esplosive, etc.) per i lavoratori e per l'ambiente circostante. Il rischio di generazione di atmosfere esplosive è ritenuto peculiare dell'industria chimica ed energetica, per la presenza di gas,

vapori, nebbie o polveri notoriamente riconosciuti come infiammabili o instabili. Nella realtà, anche materiali di uso comune, in condizioni sfavorevoli possono dar luogo a esplosioni, per esempio farina, segatura, zucchero, polveri di rifiuti domestici, per non parlare dei combustibili di largo uso, come gas di petrolio liquefatto, gas naturale e carburanti per autotrazione.

Sono molteplici le sorgenti di emissione, che possono determinare un rilascio di un composto pericoloso in un impianto industriale. Tra queste vi sono gli accoppiamenti flangiati. In particolar modo la norma CEI 31-35 (Guida alla classificazione dei luoghi con pericolo di esplosione per la presenza di gas in applicazione della norma CEI EN 60079-10:1) considera il guasto del dispositivo di tenuta (guarnizione) per stimare le dimensioni del foro di emissione della flangia. In questo lavoro è stata effettuata una comparazione delle distanze pericolose ( $d_p$ ), derivanti dall'emissione di una connessione flangiata, al cui interno fluisce ammoniaca gassosa, al fine di individuare la guarnizione, che consentisse di minimizzare l'estensione dell'area potenzialmente esplosiva e quindi di ridurre il rischio di innesco della stessa.

## Malfunzionamenti dovuti alle guarnizioni

Esistono diverse cause responsabili delle perdite delle guarnizioni delle flange. Tra queste le più diffuse sono le seguenti:

- errata selezione per l'applicazione richiesta;
- deterioramento per invecchiamento;
- serraggi successivi all'esposizione ad elevate temperature di esercizio;



- selezione di uno spessore errato;
- rottura della guarnizione a causa di un carico eccessivo applicato durante l'installazione;
- picchi di funzionamento esterni alla normale curva operativa;
- presenza di momento flettente sulle tubazioni;
- danneggiamento durante l'immagazzinaggio o il trattamento.

### Dimensioni dei fori di emissione degli accoppiamenti flangiati

La stima delle dimensioni dei fori, che si generano in caso di guasto di componenti dell'impianto, contenenti sostanze infiammabili o tossiche, da utilizzare per definire la portata di emissione per la definizione del grado della ventilazione e dell'estensione delle zone pericolose è di difficile valutazione. In generale tali dimensioni sono basate sull'esperienza pratica e su considerazioni ingegneristiche, soprattutto in relazione ai materiali utilizzati, alla periodicità ed accuratezza della manutenzione e alla rapidità di intervento in caso di anomalie di funzionamento. Per l'emissione da flangia si può fare riferimento alla norma CEI 31-35, che, per stimare l'area del foro, considera il guasto del dispositivo di tenuta (guarnizione). La suddetta norma classifica in tre grandi categorie, ad ognuna delle quali associa un determinato valore della superficie originante il rilascio, le tipologie di guarnizioni presenti in commercio:

- 1) guarnizione in fibra compressa ( $A_{\text{foro}}=2,5 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ );
- 2) giunto ad anello metallo su metallo (ring joint), giunti filettati ( $A_{\text{foro}}=0,5 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ );
- 3) guarnizioni spirometalliche, guarnizione in grafoil con inserto anti-estrusione e con anello interno (a volte anche anello esterno) di contenimento e guarnizione in teflon ( $A_{\text{foro}}=0,25 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ ).

### Il caso studio: emissione di $\text{NH}_3$ gassosa da flangia (unità $\text{DeNO}_x$ )

Lo studio ha avuto come oggetto un'unità  $\text{DeNO}_x$ , installata in una centrale termoelettrica a vapore, che prevede lo stoccaggio di una soluzione acquosa di ammoniaca e la sua successiva vaporizzazione (Fig. 1) per

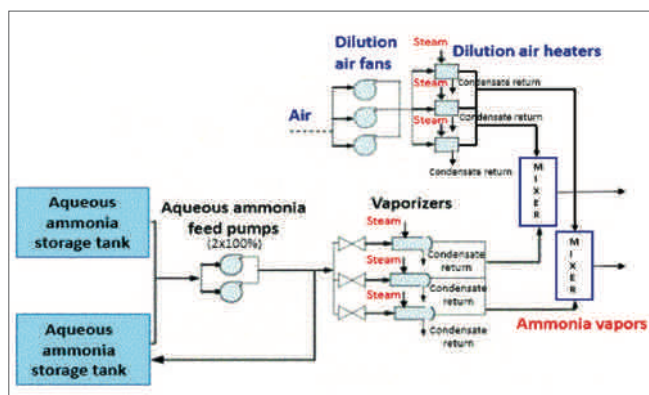


Fig. 1 - Produzione dei vapori di ammoniaca (stazione di vaporizzazione)



Fig. 2 - Guarnizione a fibra compressa (a sinistra), spirometallica (al centro) e ring-joint (a destra)

Produzione di $\text{NH}_3$ (% capacità nominale)	$T_{\text{NH}_3}$ (K)	$p_{\text{NH}_3}$ (Pa)	$c_p$ (J/gK)	$c_v$ (J/gK)
100	413,15	360.000	2,349	1,833
90	408,15	320.000	2,338	1,823
80	402,15	270.000	2,316	1,803

Tab. 1 - Produzione di  $\text{NH}_3$  (stazione di vaporizzazione)

produrre la corrente di vapori, che, dopo essere stata diluita con l'aria, viene iniettata nei gas combust per l'abbattimento degli ossidi di azoto. Il tratto più pericoloso dell'impianto  $\text{DeNO}_x$  per la possibile formazione di atmosfere potenzialmente esplosive è quello compreso tra la sezione di uscita della stazione di vaporizzazione e l'ingresso del miscelatore statico, poiché nella tubazione, che conduce la miscela aria/vapori di  $\text{NH}_3$  alla sezione di iniezione, la concentrazione dell'ammoniaca è pari circa al 5% (solitamente il rapporto aria/ $\text{NH}_3$  è di circa 20:1) e quindi si trova al di sotto del suo limite inferiore di infiammabilità ( $\text{LEL}_{\text{vNH}_3}=15\%$ ).

Lo scenario considerato riguarda l'emissione in atmosfera (ambiente aperto) di ammoniaca dall'accoppiamento flangiato, che viene utilizzato per collegare alla sezione di uscita dello scambiatore la tubazione, che convoglia i vapori ammoniacali al miscelatore statico (static mixer). La finalità dello studio è stata quella di confrontare le distanze pericolose derivanti dall'emissione delle seguenti guarnizioni (guarnizione in fibra compressa, ring joint e guarnizione spirometallica, che sono raffigurate in Fig. 2), considerando una richiesta variabile di  $\text{NH}_3$ , in modo da scegliere il dispositivo di tenuta, che minimizzasse  $d_z$  e quindi riducesse l'estensione della regione contenente un'atmosfera potenzialmente esplosiva.

In Tab. 1 sono riportati i valori della pressione ( $p_{\text{NH}_3}$ ), della temperatura ( $T_{\text{NH}_3}$ ) e dei calori specifici a pressione ( $c_p$ ) e a volume costante ( $c_v$ ) dell'ammoniaca rilasciata, in funzione di una produzione della stessa pari a 80%, 90% e 100% della capacità nominale.

### Procedura di calcolo della distanza pericolosa

Relativamente alle sorgenti di emissione (SE), che possiamo trovare negli impianti industriali, è fondamentale, per tutelare la salute e la sicurezza degli operatori, la determinazione della distanza pericolosa ( $d_z$ ), che indica lo spazio, misurato dal punto di rilascio, a partire dal quale la concentrazione in aria dei gas o vapori infiammabili è inferiore al prodotto  $k_{0z} \cdot \text{LEL}_v$  in cui:

- $k_{0z}$  è un fattore di sicurezza (parametro adimensionale), avente valore pari a 0,5, poiché la connessione flangiata può essere considerata come una sorgente di emissione di secondo grado;

- $\text{LEL}_v$  indica il limite inferiore di infiammabilità della sostanza (percentuale in volume); per l'ammoniaca tale grandezza è pari al 15% v/v.

Poiché l'ammoniaca viene emessa ad una pressione relativa maggiore di 500 Pa (5 mbar), la norma CEI 31-35 indica la seguente equazione per calcolare  $d_z$  (m):

$$d_z = k_z \cdot 50 \cdot \frac{PM_{\text{NH}_3}^{-0,65}}{k_{d_z} \cdot \text{LEL}_v} \cdot \left( \frac{M_{\text{NH}_3}}{\phi \cdot C_d} \right)^{0,5} \cdot \left[ \gamma \cdot \left( \frac{2}{\gamma + 1} \right)^\beta \right]^{-0,25} \cdot T_{\text{NH}_3}^{0,25}$$

in cui:

- $k_z$  è un coefficiente correttivo (parametro adimensionale), che tiene conto della concentrazione di gas o vapore infiammabile nell'ambiente ed è uguale ad 1 per gli ambienti aperti;

- $PM_{NH_3}$  è il peso molecolare dell'ammoniaca = 17,03 kg/kmol;
- $LEL_v$  indica il limite inferiore di infiammabilità dell'ammoniaca (percentuale in volume) = 15%;
- $M_{NH_3}$  indica la portata massica dell'ammoniaca rilasciata (kg/s);
- $\gamma$  è l'indice politropico dell'espansione adiabatica =  $c_p/c_v$ . I calori specifici a pressione ed a volume costante sono riferiti ai parametri termodinamici del rilascio dell'ammoniaca;
- $\beta = (\gamma+1)/(\gamma-1)$ ;
- $\phi$  è il rapporto critico del flusso, che dipende dalle condizioni di moto (regime subsonico o sonico). Esso è pari ad 1 per moto sonico, mentre viene calcolato con la seguente espressione, qualora si verificasse un'emissione subsonica:

$$\phi = \left(\frac{p_{atm}}{p}\right)^{\frac{1}{\gamma}} \cdot \left[1 - \left(\frac{p_{atm}}{p}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}}\right]^{\frac{1}{2}} \cdot \left[\left(\frac{2}{\gamma-1}\right) \cdot \left(\frac{\gamma+1}{2}\right)^{\beta}\right]^{\frac{1}{2}}$$

in cui  $p_{atm}$  rappresenta la pressione atmosferica e  $p$  quella nel punto di fuoriuscita;

- $C_d$  è il coefficiente di efflusso (parametro adimensionale) = 0,85;
- $T_{NH_3}$  (K) = temperatura di emissione dell'ammoniaca.

Può essere rilevato che la distanza pericolosa dipende dalla velocità dell'aria solamente quando le emissioni di gas o vapori avvengono a pressione relativa minore di 500 Pa. Il primo step, necessario per la determinazione di  $d_z$ , consiste nella definizione delle condizioni di rilascio (moto subsonico o sonico), che incidono sul valore di  $M_{NH_3}$  e di  $\phi$ . Questi regimi di efflusso vengono definiti mediante il confronto tra la pressione esistente a valle del foro (in questo caso è la pressione atmosferica) e la pressione critica ( $p_{cr}$ ), ricavabile dalla seguente equazione, che mette in evidenza la dipendenza di tale grandezza solamente dai parametri termodinamici dell'emissione:

$$p_{cr} = p_{NH_3} \cdot \left(\frac{2}{\gamma+1}\right)^{\frac{\gamma}{\gamma-1}}$$

Si instaura un regime di efflusso sonico quando  $p_{cr} > p_{atm}$ , in caso contrario si verifica un rilascio subsonico.

La definizione del regime di moto viene riportata in Tab. 2, dalla quale si evince che, per ognuna delle richieste di ammoniaca esaminate, si instaurano condizioni di moto sonico ( $\gamma$  resta invariato nonostante la variazione della richiesta di  $NH_3$  dell'unità  $DeNO_x$ ).

In presenza di efflusso sonico la norma CEI 31-35 impone  $\phi=1$  e pertanto la portata di ammoniaca rilasciata ( $M_{NH_3}$ ) può essere calcolata mediante la seguente equazione:

$$M_{NH_3} = A_{foro} \cdot p_{NH_3} \cdot C_d \cdot \sqrt{\gamma \cdot \frac{PM_{NH_3}}{RT_{NH_3}} \cdot \left(\frac{2}{\gamma+1}\right)^{\frac{\gamma+1}{2(\gamma-1)}}}$$

in cui  $R$  (costante universale dei gas) = 8,314 J/kmol · K.

### Risultati e discussione

In Tab. 3 si riportano i risultati dello studio condotto. I valori delle distanze pericolose calcolate vengono arrotondati per eccesso e quindi risultano compresi tra:

- 1) 19-22 cm (guarnizione in fibra compressa);
- 2) 6-7 cm (guarnizione spirometallica);
- 3) 9-10 cm (guarnizione ring-joint).

Le condizioni di esercizio della stazione di vaporizzazione, deputata alla produzione di ammoniaca gassosa, hanno una diretta incidenza sui parametri termodinamici del rilascio e per la situazione analizzata l'estensione dell'atmosfera potenzialmente esplosiva (i valori di  $d_z$  sono esigui, raggiungendo al massimo i 22 cm) è limitata per ogni tipologia di guarnizione. Poiché tutti i dispositivi di tenuta considerati si prestano ad essere utilizzati nel range di pressione e temperatura previsto per l'ammoniaca, il criterio di scelta adottato è finalizzato a minimizzare la distanza pericolosa. Ciò costituisce una misura preventiva contro il rischio di esplosione in quanto consente di ridurre la probabilità di innesco della miscela infiammabile (diminuisce l'ampiezza della regione occupata dall'atmosfera esplosiva) e quindi si apportano dei benefici nell'ottica di garantire un funzionamento più sicuro dell'unità  $DeNO_x$ . Queste considerazioni hanno portato all'impiego di una guarnizione spirometallica, costituita da un nastro metallico con particolare profilo sagomato, accoppiato ad un altro nastro di riempimento realizzato in PTFE. Il profilo metallico, sotto compressione, ha un'azione elastica, che assicura una perfetta tenuta in tutte le condizioni di temperatura e pressioni. La guarnizione selezionata dispone di un:

- anello interno, avente una funzione anti-turbolenza in quanto ha il diametro interno uguale al diametro interno della flangia. Esso evita il depositarsi di materiale tra l'interstizio delle flange ed è costruito con lo stesso materiale della spirale, per cui ne protegge la corrosione e contrasta fortemente l'erosione della connessione flangiata;
- l'anello esterno, che serve come dispositivo di centraggio, previene l'espansione laterale della spirale e funge come spessore di riferimento per un corretto montaggio della stessa, riducendo la possibilità di rottura della guarnizione a causa di elevati serraggi.

Produzione di $NH_3$ (% capacità nominale)	$\gamma$	$p_{cr}$ (Pa)	Moto
100	1,28	197.773	sonico
90	1,28	175.680	sonico
80	1,28	148.230	sonico

Tab. 2 - Definizione del regime di efflusso dell'ammoniaca

Produzione di $NH_3$ (%)	Tipologia di guarnizione	$M_{NH_3}$ (kg/s)	$d_z$ (m)
100	Fibra compressa	$10^{-3}$	0,213
	Spirometallica	$10^{-4}$	0,067
	Ring joint	$2 \times 10^{-4}$	0,095
90	Fibra compressa	$8,9 \times 10^{-4}$	0,2
	Spirometallica	$8,9 \times 10^{-5}$	0,063
	Ring joint	$1,8 \times 10^{-4}$	0,089
80	Fibra compressa	$8,6 \times 10^{-4}$	0,184
	Spirometallica	$8,6 \times 10^{-5}$	0,058
	Ring joint	$1,72 \times 10^{-4}$	0,082

Tab. 3 - Distanze pericolose



## Conclusioni

La legislazione vigente in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro pone particolare attenzione alla protezione dei lavoratori dalle atmosfere potenzialmente esplosive. Per conseguire tale obiettivo è fondamentale eseguire una corretta classificazione delle aree degli impianti industriali, in cui si potrebbero formare miscele esplosive, e successivamente individuare l'estensione di questi "ambienti pericolosi" mediante il calcolo del parametro  $d_2$ . In questo modo è possibile adottare i più idonei provvedimenti di natura tecnica ed organizzativa e selezionare apparecchi (in particolar modo si deve evitare che essi possano costituire una sorgente efficace di innesco) e sistemi di protezione, adatti a lavorare nelle zone individuate. Considerando i possibili rilasci di sostanze infiammabili da connessioni flangiate, la scelta della guarnizione (dispositivo di tenuta) deve essere effettuata non solo valutando le caratteristiche chimico-fisiche del fluido transitante ed il range delle pressioni e delle temperature di esercizio, ma anche prestando attenzione alla minimizzazione della distanza pericolosa (riduzione dell'estensione dell'area occupata da un'atmosfera esplosiva), poiché il successo di un processo produttivo è decretato dal connubio inscindibile tra elevate rese, ridotto impatto ambientale e sicurezza intrinseca. Nel caso studio illustrato i valori assunti da  $d_2$  sono modesti e consentono una maggiore flessibilità nella scelta della guarnizione. L'utilizzo della distanza pericolosa, come ulteriore elemento per l'individuazione del più idoneo dispositivo di tenuta, non è, però, sufficiente a garantire un contenimento dell'estensione della zona occupata dalla miscela esplosiva, ma deve essere associato al rispetto delle procedure previste per l'esecuzione del corretto montaggio della guarnizione, evitando in particolar modo eccessivi serraggi, che potrebbero minarne l'integrità e determinare maggiori superfici di emissione.

## Ringraziamenti

Si desidera esprimere un sentito ringraziamento all'Azienda Aetherdbbs per la fattiva collaborazione.

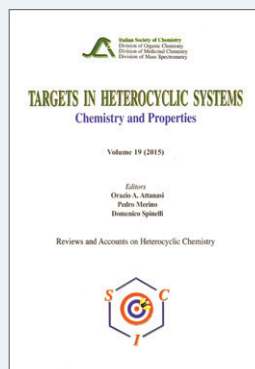
## BIBLIOGRAFIA

- [1] CEI 31-35: Guida alla classificazione dei luoghi con pericolo di esplosione per la presenza di gas in applicazione della Norma CEI EN 60079-10-1, maggio 2014.
- [2] L. Haar, J.S. Gallagher, "Thermodynamic properties of ammonia", Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1978.
- [3] N.P. Cheremisinoff, T.A. Davletshina, "Fire and Explosion Hazards Handbook of Industrial Chemicals", Noyes Publications, 1998.

### Explosive Atmospheres: Valuation of the Dangerous Distance Deriving from a Release from a Flange Coupling

In the industrial plants there are many potential sources of release of toxic and flammable compounds. In this paper the criterion of the "dangerous distance" is used to select the flange coupling gasket in order to decrease the extent of the zone, which could contain an explosive atmosphere, deriving from a possible ammonia release in a  $\text{DeNO}_x$  plant. This criterion is aimed at improving the safety level of plants, when there are various gaskets, which are fit for the established operating conditions (pressure and temperature).

## LIBRI E RIVISTE SCI



### Targets in Heterocyclic Systems

Vol. 19

È disponibile il 18° volume della serie

"Targets in Heterocyclic Systems", a cura di Orazio A. Attanasi, Pedro Merino e Domenico Spinelli.

Sono disponibili anche i volumi 1-18 della serie.

I seguenti volumi sono a disposizione dei Soci gratuitamente, è richiesto soltanto un contributo spese di € 10:

- G. Scorrano "La Storia della SCI", Edises, Napoli, 2009 (pp. 195)
- G. Scorrano "Chimica un racconto dai manifesti", Canova Edizioni, Treviso, 2009 (pp. 180)
- AA.VV. CnS "La Storia della Chimica" numero speciale, Edizioni SCI, Roma 2007 (pp. 151)
- AA.VV. "Innovazione chimica per l'applicazione del REACH" Edizioni SCI, Milano, 2009 (pp. 64)

Oltre "La Chimica e l'Industria", organo ufficiale della Società Chimica Italiana, e "CnS - La Chimica nella Scuola", organo ufficiale della Divisione di Didattica della SCI ([www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo](http://www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo)), rilevante è la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale:

- ChemPubSoc Europe Journal
  - Chemistry A European Journal
  - EURJOC
  - EURJIC
  - ChemBioChem
  - ChemMedChem
  - ChemSusChem
  - Chemistry Open
- ChemPubSoc Europe Sister Journals
  - Chemistry An Asian Journal
  - Asian Journal of Organic Chemistry
  - Angewandte Chemie
  - Analytical & Bioanalytical Chemistry
  - PCCP, Physical Chemistry Chemical Physics

**Per informazioni e ordini telefonare in sede, 06 8549691/8553968, o inviare un messaggio a [manuela.mostacci@soc.chim.it](mailto:manuela.mostacci@soc.chim.it)**



# PROBABILE ORIGINE DELLA VITA DALL'ANIDRIDE FOSFORICA VULCANICA

L'origine e l'evoluzione della vita potrebbe essere governata da un processo chimico in cui agenti fosforilanti primordiali come l'anidride fosforica ( $P_4O_{10}$ ), prodotta dal magma vulcanico, e il suo derivato trimetilfosfato (TMP), potrebbero essere usati per ottenere molto velocemente, ed in condizioni prebiotiche, diverse importanti molecole biochimiche come le proteine, alcune basi eterocicliche, l'ATP e gli isomeri dell'AMP come pure i loro oligonucleotidi.



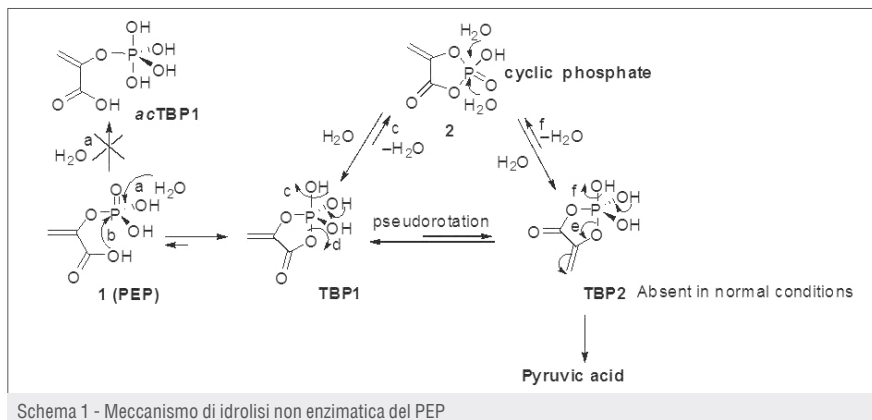
**S**piegare come la vita è iniziata sulla Terra è uno dei grandi misteri scientifici che probabilmente è impossibile definire con precisione. Tuttavia, oggi, siamo in grado di fare molte ipotesi plausibili che dimostrano la sua probabile generazione spontanea governata esclusivamente dalle leggi della chimica. Quindi può manifestarsi in tutto l'universo, dove esistano certe condizioni. Negli ultimi decenni, la dimostrazione che la sintesi ribosomiale peptidica è una reazione catalizzata dal ribozima ha reso ipotizzabile che una volta ci fosse un Mondo dell'RNA [1]. Il problema centrale per gli studi sull'origine della vita potrebbe quindi essere quello di capire come le molecole dell'RNA avrebbero potuto formarsi spontaneamente alla stregua di molte altre molecole fondamentali per l'evoluzione della vita.

Ricerche recenti hanno dimostrato che tutte le molecole di base necessarie per ottenere l'RNA si trovano in tutto l'universo e quindi dovevano essere presenti o formati anche sulla Terra primordiale [2]. Quindi tutte le molecole organiche che sono essenziali per formare l'RNA possono essere state rilasciate sulla Terra o si sono formate da molecole semplici come HCN o formammide [3] con semplici processi chimici. Penso comunque che l'ostacolo principale per comprendere l'origine metabolica della vita con formazione dell'RNA sia quello di individuare alcuni plausibili processi chimici capaci di superare il disordine della chimica abiotica, permettendo così la formazione di molecole pre-RNA probabilmente attraverso un "processo *driver* auto-organizzato" e super veloce.

## Ruolo del fosforo. Alla ricerca di un processo chimico *driver*

Data la sua centralità nella biologia, il fosforo è certamente molto importante per l'origine e l'evoluzione della vita. Grazie alle sue proprietà chimiche, che conosco bene dopo circa 40 anni di ricerca nel campo, che lo rendono molto sensibile alle condizioni di reazione, il fosforo potrebbe essere fondamentale per guidare tutte le reazioni che portano alla vita. Questi processi chimici, o un unico processo simile per tutti, sono probabilmente "auto-catalitici", velocissimi e molto sensibili alle variazioni. A mio parere, il processo *driver* di base deve avere altre caratteristiche importanti che vorrei brevemente descrivere:

- A) deve essere molto veloce rispetto ad altri possibili processi simili che si svolgono nello stesso tempo nel "*brodo primordiale*", dove ci sono una moltitudine di altri composti chimici formati in oltre un miliardo di anni. Quindi non è necessaria la presenza di un catalizzatore perché potrebbe catalizzare altri processi collaterali, aumentando ulteriormente la complessità della miscela di reazione primordiale;
- B) deve essere esoergonico e, pertanto, non richiede energia. Sarà molto veloce anche a basse temperature per cui altre possibili reazioni collaterali sono ridotte al minimo. Un'altra condizione importante è che l'acqua, forse l'unico solvente prebiotico, deve essere allo stato liquido per permettere ai reagenti di sciogliersi in modo che il processo chimico possa avvenire;
- C) deve spiegare perché l'adenosina 5'-trifosfato (ATP) e il fosfoenolpiruvato (PEP), o il c-AMP sono chiamati "*composti ad alta energia*". In realtà, questa definizione può essere fuorviante. Molti altri composti, ad esempio anidridi, danno



Schema 1 - Meccanismo di idrolisi non enzimatica del PEP

reazioni con grande trasferimento di energia, ma non sono utilizzati come composti ad “alta energia”. Infatti i veri composti ad “alta energia”, come ATP o PEP o c-AMP, hanno la capacità di essere, non solo termodinamicamente instabili, e quindi cedere energia, ma sono anche molto stabili cineticamente in condizioni normali. Quindi il processo *driver* deve spiegare questa funzione contraddittoria, cioè perché solo in particolari condizioni questi composti cedono energia;

- D) dovrebbe spiegare la capacità catalitica del ribosoma, che è l'RNA, per favorire certe trasformazioni senza l'intervento di proteine come avviene con il DNA. In altre parole, dovrebbe spiegare perché il DNA ha bisogno di proteine e l'RNA no;
- E) deve anche spiegare perché il *fold*ing dell'RNA in una specifica posizione è molto importante per la sua funzionalità chimica. Infine, deve anche spiegare, in modo accettabile, la cosiddetta omochiralità che si trova nei processi della vita. Spiegare l'omochiralità può essere molto importante per capire l'origine della vita;
- F) probabilmente questo processo *driver* deve essere in grado di sintetizzare molti altri composti importanti e necessari per l'evoluzione della vita, quali proteine, composti eterociclici azotati, ATP ecc., necessari per formazione e funzionalità di RNA o DNA, ed avere, per non soccombere, la stessa velocità di formazione nello stesso ambiente di reazione in cui si svolge la formazione spontanea dell'RNA.

Credo che si possa trovare un processo *driver* “super-attivato” con queste caratteristiche nella chimica del fosforo di particolari molecole. Cercherò di spiegarlo citando alcuni dei miei lavori e anche alcuni di altri studiosi che sono, a volte, volutamente dimenticati, anche per ragioni personali, nella marea di pubblicazioni su questo argomento.

### Punto A: Il ruolo degli intermedi pentacoordinati del fosforo nella biochimica

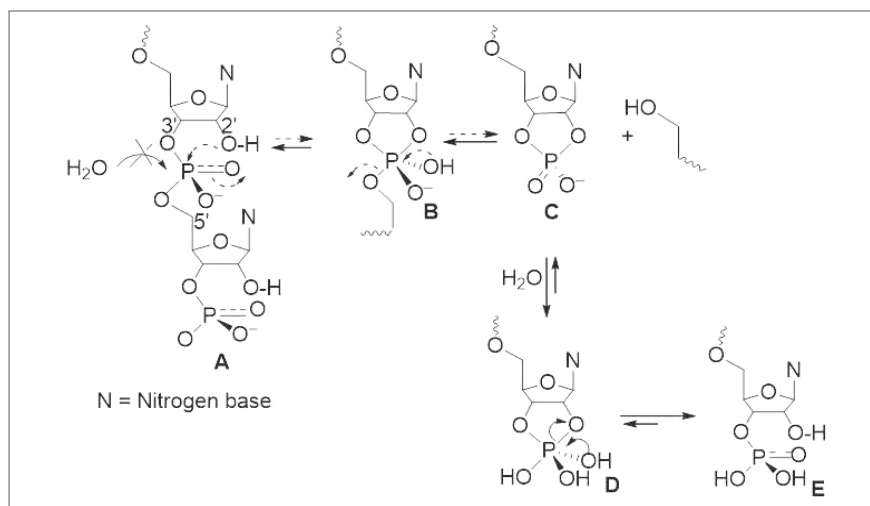
La maggior parte delle reazioni che avvengono attraverso composti organofosforici sono guidate dalla capacità del fosforo di formare intermedi ipercoordinati, principalmente penta- ed esa-coordinati [4]. In particolare, i composti pentacoordinati con anelli a 5 o 6 membri si formano facilmente e sono molto stabili. Questi intermedi pentacoordinati possono subire stereomutazione con meccanismo TR o con un processo equivalente chiamato *Berry Pseudo Rotation* (BPR). Entrambi sono processi molto rapidi, poiché le barriere energetiche di pseudorotazione sono relativamente basse. In questo modo un isomero può essere facilmente trasformato in altri isomeri; a volte solo un isomero collassa per formare un solo prodotto finale. Inoltre, per questi intermedi ipercoordinati, in so-

luzione si può verificare un equilibrio con le loro forme ioniche. In quest'ultimo caso, leganti chirali *R* possono essere sostituiti da leganti *S* dando due differenti diastereoisomeri degli intermedi ipercoordinati che poi collassano dando i prodotti finali a bassa coordinazione. Pertanto, da questo fenomeno può nascere una possibile omochiralità del prodotto finale.

La stabilità di questi intermedi pentacoordinati dipende fortemente dalla loro struttura; in particolare, come riportato da Westheimer [5], quando è possibile la formazione di un ciclo intorno al fosforo pentacoordinato questa è favorita rispetto a quella del corrispondente intermedio aciclico di un fattore di  $10^6$ - $10^8$ . In questo modo qualsiasi altra reazione collaterale possibile in cui l'atomo di fosforo appartiene a un intermedio pentacoordinato *aciclico* è praticamente annullata. Da queste considerazioni si può dedurre che la formazione super-attivata di intermedi ciclici pentacoordinati del fosforo potrebbe essere un possibile candidato per questo processo *driver*.

### Punto B e C: perché il PEP è un composto “ad alta energia”

Il PEP (fosfoenolpiruvato) è un composto molto stabile in soluzione acquosa. Al contrario, quando il PEP è in presenza di un alcool diventa instabile e diventa un eccellente agente fosforilante. Per spiegare il motivo di questi comportamenti contrastanti abbiamo recentemente studiato [6] l'idrolisi non enzimatica del PEP seguendo l'andamento della reazione tramite spettroscopia  $^{31}\text{P}$  NMR. Abbiamo



Schema 2 - Meccanismo di auto-idrolisi dell'RNA con formazione dell'estere ciclico C con rottura conseguente del legame 3'-5' della catena dell'RNA





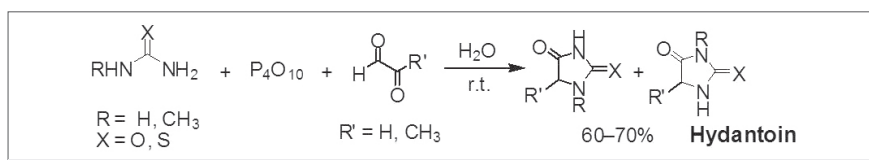


posti sono inaspettatamente stabili in acqua e la nostra spiegazione è la stessa che abbiamo dato per il PEP. Il TMP è molto stabile e viene idrolizzato solo dopo diversi mesi in acqua in condizioni normali. Il  $P_4O_{10}$  è abbastanza stabile in acqua e comincia a idrolizzare solo dopo alcuni giorni. Il  $P_4O_{10}$  è conosciuto come il più potente agente disidratante e questo ne ha sempre scoraggiato l'impiego in acqua come agente condensante e fosforilante, poiché creduto troppo reattivo e pericoloso. Noi invece lo abbiamo usato in acqua, per primi, come condensante [10b], prevedendo la sua quasi inesistente idrolisi in acqua; abbiamo infatti dimostrato che solo dopo tre giorni in acqua si notano tracce di acido fosforico.

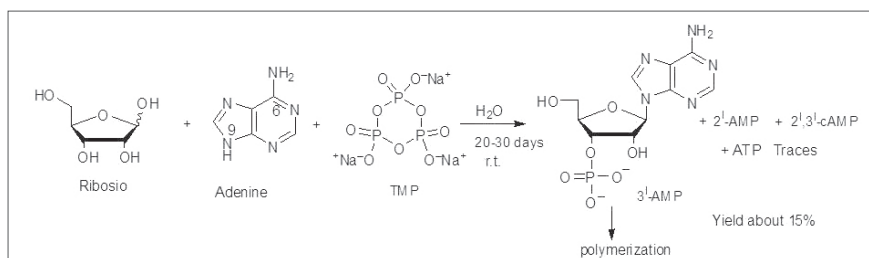
#### Punto F: sintesi prebiotica di eterocicli azotati, proteine, nucleotidi, nucleosidi, polinucleotidi e ATP

Recentemente abbiamo riportato [10b] che una serie di idantoine e tioidantoine può essere sintetizzata in acqua a temperatura ambiente da urea (o N-metilurea, o tiourea) e aldeidi semplici (come gliossalde e i suoi derivati semplici) in presenza di anidride fosforica. Il tempo di reazione è di 10 min. utilizzando una quantità equimolare di  $P_4O_{10}$  rispetto agli altri reagenti, ma la reazione si verifica anche con piccole quantità di  $P_4O_{10}$ , che si riforma (Schema 4).

Da queste reazioni è chiaro che il  $P_4O_{10}$  può fosforilare i gruppi OH anche in acqua ma, in aggiunta, favorisce il successivo attacco di un altro nucleofilo per dare una condensazione finale. Abbiamo pochissimi dati in letteratura [10a] sul  $P_4O_{10}$  utilizzato in acqua come agente attivante di un successivo attacco nucleofilo. Al contrario, le reazioni di fosforilazione condotte in acqua utilizzando TMP sono numerose, probabilmente perché la sua stabilità in acqua è ben nota. Ora dobbiamo verificare se abbiamo esempi nella letteratura di sintesi, in condizioni prebiotiche, di nucleosidi e nucleotidi per ottenere pre-RNA che usano  $P_4O_{10}$  o TMP in acqua. È riportata [11a] la preparazione di adenosina con rese molto basse (4%) ottenuta da adenina e D-ribosio con TMP a 100 °C, per diverse ore. Le rese scarse ora possono essere spiegate, dalla formazione concomitante di fosfati di adenosina (nucleotidi) e la loro concomitante facile polimerizzazione che vedremo successivamente. Numerosi articoli sono riportati riguardo la fosforilazione in acqua di nucleosidi per ottenere nucleotidi. Tra questi diversi autori si deve notare che Zhao (2002) riporta [11b] la fosforilazione di adenosina con alta



Schema 4 - Sintesi di idantoine in acqua usando  $P_4O_{10}$



Schema 5 - Sintesi di AMPs e suoi polimeri ed ATP

concentrazione di trimetafosfato in soluzione acquosa, porta, oltre ai diversi adenosin monofosfati (AMPs), anche al 13% di ATP.

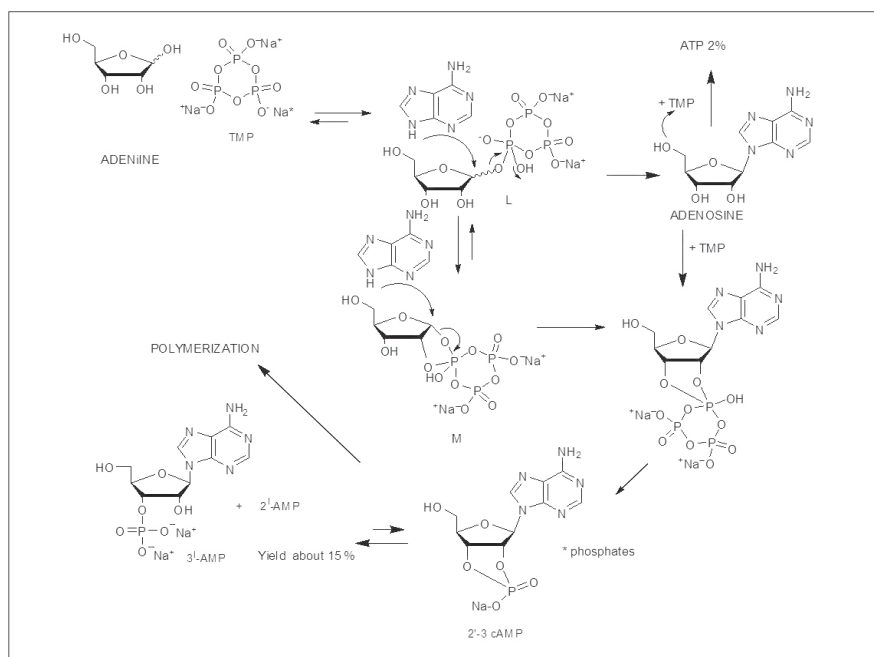
Si deve notare che finora molti ricercatori hanno affermato la quasi impossibilità di sintetizzare ATP in ambiente acquoso data la presunta facile idrolizzabilità. Lo stesso che si diceva per l'anidride fosforica e addirittura anche per i peptidi. Zhao riporta [11c] anche la N-fosforilazione di amminoacidi mediante TMP in soluzione acquosa con rese del 60-91% e con successiva formazione di peptidi. Quindi anche i peptidi sono facilmente sintetizzabili con questo processo.

Pochi mesi fa ho riscoperto due articoli importanti di Schramm [12a,b], che sono stati quasi dimenticati: quello pubblicato nel 1958 [12a] e un altro del 1961 [12b]. Probabilmente il titolo e il testo erano fuorvianti. Nel primo articolo è riportato sorprendentemente che esteri di TMP reagiscono con vari amminoacidi, per dare "proteine in condizioni blande e senza racemizzazione". Il secondo articolo riporta che in condizioni simili, sempre con TMP, D-ribosio e adenina, sono stati ottenuti nucleosidi e acidi polinucleici mediante polimerizzazione spontanea dei nucleotidi formati nella reazione e quindi i nucleotidi sono difficili da separare. L'adenosina è stata ottenuta con rese del 20-40%, rispetto alla quantità di zucchero (Schema 5). La miscela di reazione, ribosio, adenina e TMP (in grande eccesso), in dimetilformammide/acqua, viene mantenuta a 50 °C per 20 ore. La concentrazione di adenina era circa  $7,3 \times 10^{-3}$  M, in eccesso rispetto al D-ribosio. La polimerizzazione dei nucleotidi è facile perché probabilmente è dovuta all'alta concentrazione di nucleotidi e una temperatura di reazione di 50 °C. Recentemente è stato riportato da altri autori [13]

che la polimerizzazione avviene spontaneamente anche senza TMP o altri attivatori e ciò era prevedibile dal meccanismo riportato in Schema 2. L'unico problema della sintesi di Schramm è che difficilmente può essere definita totalmente prebiotica, dato che è condotta in acqua e dimetilformammide. Probabilmente ha dovuto usare questa miscela di solventi perché l'adenina è poco solubile in acqua.

Recentemente abbiamo riportato [14] che isomeri dell'adenosina monofosfato (AMPs) sono ottenuti mediante auto-assemblaggio di adenina, D-ribosio e trimetafosfato in soluzione acquosa a temperatura ambiente con rese di circa il 15% e in una reazione *one-pot*. La reazione è stata condotta in soluzione acquosa asettica (UV) (pH~7,0-6,5) con elevata diluizione dei tre reagenti ( $1,85 \times 10^{-4}$  M). A questo valore di concentrazione tutti i reagenti sono completamente solubilizzati. Questa concentrazione è circa 40 volte più diluita di quella utilizzata da Schramm (vedi sopra) e per questo nel nostro caso la polimerizzazione è più lenta ed ha permesso anche l'identificazione di AMP. L'andamento della reazione viene seguita mediante HPLC/MS per diversi giorni. Dopo i primi 20-30 giorni comincia a formarsi un precipitato bianco fioccoso, costituito probabilmente da oligonucleotidi, come trovati da Schramm, e per questo motivo gli AMPs diminuiscono o scompaiono dopo un tempo più lungo o quando la soluzione viene concentrata. Per questo è difficile o impossibile identificarli nelle soluzioni concentrate tramite NMR.

I nostri risultati sono in buon accordo con i risultati di Schramm, che danno praticamente le stesse rese in adenosina e che, successivamente, è fosforilata e polimerizzata *in situ*. Questa facile polime-



Schema 6 - Meccanismo proposto

rizzazione dei nucleotidi spiega anche le rese basse e altamente variabili di AMPs ottenuti sia da noi e da altri autori.

Nello Schema 6 abbiamo proposto il meccanismo di questa sintesi *one-pot* in cui si evidenzia la formazione preferita di intermedi biciclici pentacoordinati M e N, dando AMPs. L'intermedio L monociclico, meno favorito, reagendo con il 5-OH del ribosio porta probabilmente a ATP, ottenuto in piccole quantità in queste condizioni di reazione con quantità stechiometriche di TMP. Dobbiamo notare che Zhao (vedi sopra), con gli stessi reagenti ma con forte eccesso di TMP, ha ottenuto ATP con rese del 13%, sempre ricordando che i rendimenti di questi prodotti sono altamente variabili. Quindi anche l'ATP è un prodotto che facilmente si forma in condizioni prebiotiche con TMP.

### Conclusioni

L'origine e l'evoluzione della vita potrebbero essere regolate da un processo chimico *driver* in cui la formazione di intermedi ciclici pentacoordinati del fosforo è attivata da un fattore di  $10^6$ - $10^8$  rispetto ad altri processi collaterali simili. In altre parole, è necessario trovare reagenti primordiali ciclici per la fosforilazione, come  $P_4O_{10}$  e TMP, prodotti principalmente dai vulcani, per ottenere importanti molecole biochimiche, come proteine, basi eterocicliche azotate, oligonucleotidi, ATP, ecc. con

processi molto veloci in condizioni prebiotiche. Questo processo potrebbe spiegare la spontanea generazione di RNA e quindi della vita. Da qui deriva che per avere la vita nell'universo è sufficiente avere, su un corpo celeste, acqua liquida e vulcani, da cui, con semplici processi chimici super attivati da molecole cicliche del fosforo come l'anidride fosforica e suoi derivati ciclici, si ottengono tutte le molecole fondamentali per la vita (processo metabolico) senza dover partire necessariamente prima dall'RNA (processo genetico), superando quindi la teoria dell'RNA World che risulta quindi meno rilevante.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Pross, *Origin. Life Evol. Biosph.*, 2004, **34**, 307 e referenze ivi citate.
- [2] D. Despois, H. Cottin, Lectures in Astrobiology, Springer, Berlin/Heidelberg, 2005, 289-352.

- [3] R. Saladino *et al.*, *Phys Life Rev.*, 2012, **9**, 84 e referenze ivi citate.
- [4] G. Baccolini *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 6812 e referenze ivi citate.
- [5] F.H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.*, 1968, **1**, 70.
- [6] G. Baccolini *et al.*, *Phosphorus, Sulfur and Silicon Relat. Elem.*, 2010, **185**, 2303.
- [7] a) G. Baccolini *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 3058; b) G. Baccolini *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 597.
- [8] G. Baccolini *et al.*, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1987, **21**, 14.
- [9] Y. Yamagata *et al.*, *Nature*, 1991, **352**, 516.
- [10] a) Phosphoric Anhydride: Structure, Chemistry and Applications, D.A. Efedrov *et al.* (Eds.), Wiley, Chichester, 1999; b) G. Baccolini *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 2011, 1713.
- [11] a) W.D. Fuller *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1972, **67**, 25; b) C. Cheng *et al.*, *Origin. Life Evol. Biosph.*, 2002, **32**, 219; c) F. Ni *et al.*, *Green Chem.*, 2009, **11**, 569.
- [12] a) G. Schramm, H. Wissmann, *Chem. Ber.*, 1958, **91**, 1073; b) G. Schramm *et al.*, *Angew. Chem.*, 1961, **73**, 619 or *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1962, 1.
- [13] S. Pino *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 36494.
- [14] G. Baccolini *et al.*, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 3640. Questo articolo è stato ritirato come richiesto dall'Editor, sette mesi dopo la pubblicazione, perché i rendimenti riportati (37-45%) di AMP non erano riproducibili e la polimerizzazione finale non era dimostrata. Di conseguenza abbiamo effettuato nuovamente una reazione monitorata con HPLC/MS e trovato rese di circa il 15% e anche la formazione di tracce, 2%, di ATP non trovato con l'analisi HPLC precedente. Alla luce di questi risultati, che sono stati comunicati all'Editor pensavamo ci fosse permesso una revisione dell'articolo, invece ci fu chiesto di ritirarlo.

### Probable Origin of Life by Volcanic Phosphoric Anhydride

The origin and evolution of life might be governed by a chemical process in which primordial cyclic phosphorylating reagents such as phosphoric anhydride ( $P_4O_{10}$ ), produced from volcano magma, and its natural derivative trimetaphosphates (TMP) could be used to obtain very important biochemical molecules such as proteins, natural heterocyclic bases, ATP and AMP isomers and its oligonucleotides, very rapidly in prebiotic conditions.



## Consulenze tecniche e analisi

Technical advice and lab analysis

- Collaudi e controlli di prodotto
- Collaudi e controlli di processo
- Assistenza settore ambientale
- Assistenza settore agroalimentare
- Assistenza settore industriale
- Assistenza settore farmaceutico

- Analisi Genetiche
- Analisi Chimiche
- Analisi Microbiologiche
- Certificazioni di Sistema
- Certificazioni di Prodotti
- Certificazione Biologico

- Certificazione UNI EN ISO 9001
- Certificazione UNI EN ISO 14001
- Certificazione OHSAS 18001
- Accreditamento Accredia  
(UNI CEI EN ISO 17025)
- Laboratorio lista 1 Ministero Salute  
per analisi amianto  
(Tecnica SEM-EDS, FTIR, MOCF)

BIOGEST S.r.l. è una società con propri laboratori, privati ed indipendenti, leader in Italia nei collaudi e controlli di prodotto e di processo; offre servizi analitici e di assistenza tecnica nei settori ambientale, agro-alimentare, no food, industriale e farmaceutico.

I laboratori di BIOGEST collaborano con Università ed Enti di Ricerca per la messa a punto di tecnologie analitiche innovative, per offrire ai propri clienti un servizio che soddisfi sempre le aspettative presenti ed anticipi le necessità future.

[www.csagroup.it](http://www.csagroup.it)

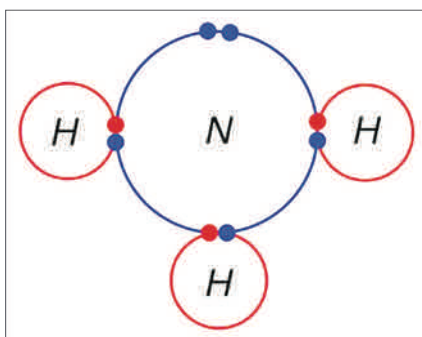
Laboratori di analisi e ricerca - NOVI LIGURE (AL) - ITALY

Info: +39 0143 380.175 - [info@csagroup.it](mailto:info@csagroup.it)



# UN LEGAME LUNGO UN SECOLO

Dal modello di atomo cubico è trascorso un secolo ma la definizione di Lewis del legame covalente come condivisione di coppie di elettroni sopravvive largamente nella pratica e nella teoria chimica.



Uno dei paradigmi della chimica è quello di legame, e qualsiasi studente di chimica concorderà che in condizioni normali - e trascurando il legame metallico - sono solo due i modi in cui gli atomi si legano. Il primo, quello covalente, che serve per formare molecole, ioni poliatomici o strutture estese, consiste nel condividere elettroni. L'altro, quello che chiamiamo ionico, è il risultato di un trasferimento di elettroni da un atomo all'altro e porta a un'attrazione coulombiana tra gli ioni risultanti. Ma per capire l'uno e l'altro bisogna tornare indietro di cento anni.

## Gli anni di Lewis

Nel maggio del 1916 sul *Journal of the American Chemical Society* appariva un articolo [1] destinato a influenzare profondamente la storia della chimica, e quindi della scienza. Il titolo era assolutamente ambizioso e per niente programmatico, *The Atom and the Molecule*, ed il suo autore era Gilbert Newton Lewis (Fig. 1), un talentuoso professore di chimica dell'Università della California a Berkeley. In un quadro e con un linguaggio ancora di stampo ottocentesco (gli elettroni di valenza considerati atomi dell'elemento Elettricità, E), Lewis poneva le basi della moderna teoria del legame associandone la stabilità e l'esistenza alla cosiddetta regola dell'8 (o del 2, nella sua versione più ridotta valida per l'idrogeno), una regola già parzialmente nota come regola di Abegg (dal chimico tedesco Richard Abegg) e di cui Lewis rivendicava la cogenitorialità.

Nella prima parte del lavoro di Lewis si può leggere una descrizione dell'atomo in cui si distinguono un nocciolo (*kernel*) che porta una carica positiva e un guscio esterno (*shell*) in cui si trovano elettroni scambiabili (cioè quelli che poi sarebbero stati definiti di valenza) in numero pari alla carica positiva del nocciolo. Ancor più importante, Lewis prevede che durante un processo chimico il numero di elettroni esterni possa variare tra 0 e 8 (e mai più di 8), e stabilisce che, in barba al modello di Bohr-Rutherford, il guscio di valenza è cubico e gli elettroni si collocano ai vertici del cubo.

La seconda parte del lavoro affronta il problema della struttura delle molecole, e quindi del legame, nel tentativo di dare una spiegazione definitiva all'esistenza di molecole polari e non polari. Ed è qui che viene introdotta l'idea che, a differenza del legame elettrostatico (o ionico), un altro tipo di legame chimico corrisponde alla condivisione di almeno una coppia di elettroni appartenenti al guscio di valenza di atomi uguali o diversi, che quindi possono rispettare la regola dell'otto senza perdere elettroni. La presenza di un legame di questo tipo dovrebbe corrispondere

alla condizione nella quale i due cubi di due gusci atomici condividono un lato (struttura C, Fig. 2). Non essendo questa l'unica possibilità ammessa, Lewis prevede l'esistenza di legami doppi quando due cubi condividono gli elettroni di due facce. Mancando le condizioni geometriche per prevedere i legami tripli con il modello cubico, deve essere previsto un secondo tipo di atomo, quello con guscio tetraedrico. Ad esempio, per il carbonio la formazione di legami singoli, doppi o tripli corrisponde a tetraedri che condividono un vertice (cioè una coppia di elettroni), un lato o una faccia.

Senza mai usare il termine covalenza, Lewis prevede l'esistenza di molecole completamente polari (cioè formate da ioni), non polari, o parzialmente polari. Per tenere conto delle sue caratteristiche chimiche, una specie molecolare potrebbe essere spiegata mediante forme tautomeriche (come nel caso della molecola di un alogeno  $X_2$ , Fig. 2) che abbracciano i due estremi del legame, quello covalente e quello ionico.

Sebbene la teoria di Lewis avesse ambizioni generali, la spiegazione del legame ionico era quasi assente. Una spiegazione molto più estesa ed elegante di questa fondamentale forma di legame era invece apparsa solo un mese prima del lavoro di Lewis [2], e di cui probabilmente il chimico americano non era a conoscenza. L'autore di questo lavoro era il fisico teorico tedesco Walther Kossel, allievo di von Lenard (Nobel per la Fisica nel 1905) ad Heidelberg e poi di Sommerfeld a Monaco. La spiegazione aveva tutt'altro rigore rispetto a quella di Lewis, e si inquadrava già in un'interpretazione quantomeccanica dei fenomeni a livello atomico (sebbene secondo la cosiddetta *vecchia* quantomeccanica). Come dichiarato dallo stesso Kossel la sua spiegazione

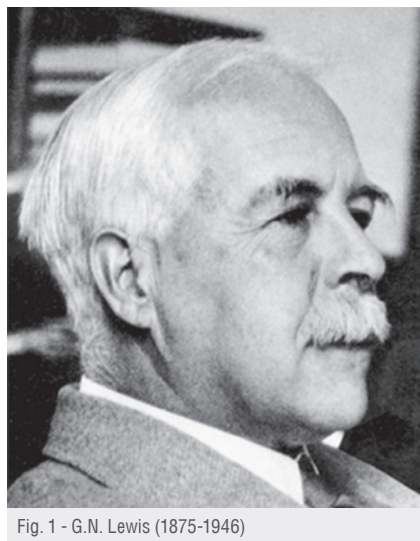


Fig. 1 - G.N. Lewis (1875-1946)

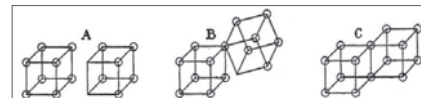


Fig. 2 - Forme tautomeriche di  $X_2$ , illustrate mediante il modello di Lewis di atomo cubico

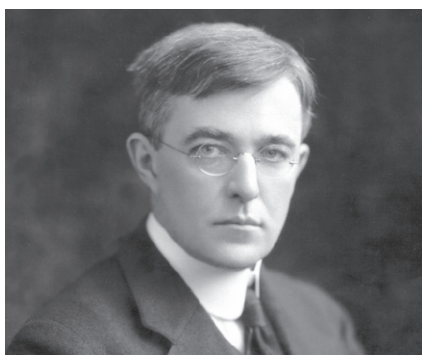


Fig. 3 - I. Langmuir (1891-1957)

non si poteva però applicare al comportamento chimico di elementi come il carbonio, e questo lo ha consegnato quasi all'oblio [3].

#### Da Langmuir a Pauling

La teoria di Lewis ebbe un successo enorme ma il merito non fu interamente suo. Ben presto il chimico-fisico americano Irving Langmuir (all'epoca ricercatore presso la General Electric Company) (Fig. 3) cominciò ad elaborare le idee di Lewis e a promuovere (ed espandere) l'idea del legame come coppie di elettroni condivise tra due atomi. Fu infatti Langmuir ad introdurre i termini covalente e regola dell'ottetto che ancora oggi usiamo. Il suo primo importante lavoro su

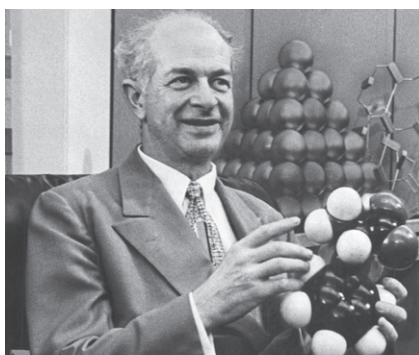


Fig. 4 - L. Pauling (1901-1994)

questo tema apparve già nel 1919 e si intitolava *The Arrangement of Electrons in Atoms and Molecules* [4]. Quello fu l'inizio di una rivalità tra i due scienziati che durò fino alla morte di Lewis. Successivamente, la necessità di spiegare le configurazioni elettroniche di tutti gli elementi conosciuti fino all'uranio (e cioè ben oltre i 35 presi in considerazione da Lewis) portò Langmuir a prevedere e formulare nel 1921 la cosiddetta regola dei 18-elettroni applicata per la prima volta a complessi carbonilici di elementi di transizione come  $Ni(CO)_4$  o  $Fe(CO)_5$  [5]. Quasi a rivendicare la paternità più autentica sulla teoria del legame covalente, Lewis scrisse un volume che ne riassumeva i principi e che pubblicò nel 1923 [6].

Ma lo scienziato che più contribuì alla diffusione e al miglioramento della teoria del legame di Lewis fu certamente Linus Pauling (Fig. 4). Di ritorno dal suo viaggio in Europa dove aveva scoperto e imparato la meccanica quantistica direttamente da quelli che la stavano costruendo (inclusi Sommerfeld e Bohr), alla fine degli anni Venti Pauling cominciò a costruire le basi della cosiddetta teoria del legame di valenza, sforzo poi sfociato nella pubblicazione nel 1939 di quel capolavoro che è *The Nature of the Chemical Bond*. Ma già nel 1928 Pauling rendeva omaggio a Lewis e alla sua teoria in un lavoro dal titolo *The Shared-Electron Chemical Bond* [7].

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] G. N. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, **38**, 762.
- [2] W. Kossell, *Ann. Physik.*, 1916, **49**, 229.
- [3] M. Sutton, *Chemistry World*, 2016, **13**(1), 58.
- [4] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, 1919, **41**, 868.
- [5] I. Langmuir, *Science*, 1921, **54**, 59.
- [6] G.N. Lewis, *Valence and the Structure of Atoms and Molecules*, ACS Monograph Series, 1923.
- [7] L. Pauling, *PNAS*, 1928, **14**, 359.



Il Presidente  
Roma, 27/6/2016 Prot. n. 2016-60

## AI SOCI DELLA SOCIETÀ CHIMICA ITALIANA AI MEMBRI DEL CONSIGLIO CENTRALE AL COLLEGIO DEI REVISORI DEI CONTI

L'Assemblea Generale dei Soci della Società Chimica Italiana è convocata per il giorno giovedì 6 Ottobre 2016, alle ore 7:00 in prima convocazione e alle ore 15:30 in seconda convocazione, presso l'Aula "La Ginestra" del Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" (P.le A. Moro), per discutere e deliberare sul seguente

#### Ordine del Giorno:

1. Comunicazioni
2. Relazione del Consiglio Centrale sull'attività dell'anno corrente
3. Attività 2015
4. Bilancio consuntivo 2015
5. Programma di attività 2017
6. Quote sociali ed abbonamenti 2017
7. Bilancio preventivo 2017
8. Designazione di quattro candidati alla vice-presidenza SCI per il triennio 2017-2019
9. Proposte di modifica del Regolamento Generale di attuazione dello Statuto
10. Nomina del Collegio dei Revisori dei Conti per il triennio 2017-2019
11. Soci Onorari
12. Varie ed eventuali

Il Presidente  
prof. Raffaele Riccio

# UNA LETTERA DI LIEBIG SULL'ISTORIA DELLA CHIMICA

La 36esima lettera dell'epistolario di Liebig rappresenta un excursus sulla storia di duemila anni di chimica; nel testo emerge la personale impostazione dell'Autore, in cui egli analizza, non tanto la storia, quanto la filosofia con cui è stato affrontato il pensiero scientifico: commentando soprattutto il metodo della chimica del passato e la sua evoluzione.

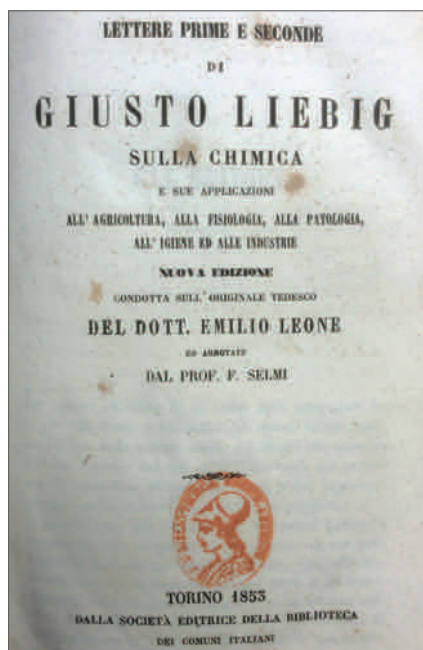


Fig. 1 - Frontespizio "Lettere di chimica"

Justus von Liebig (Darmstadt, 12 maggio 1803 - Monaco di Baviera, 18 aprile 1873) è un personaggio a tutti noto: è tra i più illustri chimici dell'Ottocento e ormai è entrato a buon diritto, non solo nella storia della scienza, ma anche in quella dell'industria e dell'economia mondiale. Justus Liebig fu un ricercatore fecondo di scoperte, un docente di chimica di eccellente livello e un divulgatore della conoscenza scientifica, ad opera dei libri e degli articoli che ha pubblicato. Scrisse, tra l'altro, un famoso trattato di chimica organica e un dizionario di chimica [1]. Tra le sue pubblicazioni più famose ci sono anche le *Lettere sulla chimica* [2]: opera che è stata ristampata numerose volte in anni successivi e

tradotta in più lingue; in alcune edizioni le ristampe presentano titoli leggermente differenti tra loro (Fig. 1). Questo libro è una raccolta di articoli di divulgazione scientifica raggruppati in un volume che è nello stesso tempo testo formativo scolastico ma anche di diffusione scientifica: o come Liebig stesso ha definito: "...un mio piccolo lavoro dove mi son provato di popolarizzare delle dottrine (nda: ovviamente allude alle dottrine chimiche e a quelle ad esse affini) facendo conoscere le applicazioni più importanti che loro deve la chimica..." [3].

*Lettere sulla chimica* è quindi, a tutti gli effetti, un libro di chimica, presentato sotto l'originale forma di un epistolario. È composto da 37 lettere, assimilabili a quelli che sono i normali capitoli di un libro; i primi 35 capitoli contengono sostanzialmente argomenti di chimica tradizionale, aggiornata ai giorni di pubblicazione della prima edizione (1848), ma gli ultimi due capitoli (36esimo e 37esimo) sono sulla storia della chimica.

Il 36esimo, in particolare, è quello che è oggetto delle presenti osservazioni. Leggendo il testo si percepisce una freschezza espositiva, una chiarezza di idee, una visione aperta, lucida, moderna, equilibrata, della chimica antica che non può che attirare l'attenzione del lettore amante della storia della scienza per l'originalità delle considerazioni dell'Autore sulla chimica del passato e per la sua attualità, benché siano trascorsi ormai più di 150 anni da quando l'opera è stata pubblicata.

Entrando ora più nello specifico del contenuto della lettera 36esima, essa rappresenta un *excursus* sulla storia di 2000 anni di chimica. Ma l'originalità dell'impostazione data da Liebig è rappresentata dal fatto che essa non si presenta come una comune descrizione della storia di questa branca della scienza, in cui solitamente vengono citati personaggi, luoghi, scoperte, leggende,

aneddoti. Nell'esposizione della storia della chimica della 36esima lettera emerge la personale impostazione di Liebig, in cui egli analizza non tanto la storia, quanto la filosofia con cui è stato affrontato il pensiero scientifico, commentando soprattutto il metodo e la sua evoluzione, che, ovviamente, va di pari passo con l'evoluzione e la maturazione del pensiero umano legato all'incremento costante delle conoscenze.

Leggendo oggi le sue osservazioni, forse esse ci possono sembrare ovvie e quasi banali, ma non dimentichiamo che Liebig queste affermazioni le ha espresse nel 1848. In particolare colpiscono alcune considerazioni che egli fa nel corso della sua esposizione:

- condanna coraggiosamente il materialismo illuminista ed esprime un apprezzamento positivo sul lavoro degli alchimisti [4]; considerazione che egli rafforza esprimendo un riconoscimento positivo sull'apporto alla capillare conoscenza dei fenomeni naturali che l'alchimia ha consegnato alla chimica moderna [5];
- ci fa notare e apprezzare, non tanto i risultati sperimentali prodotti dagli alchimisti (in particolare si riferisce a Geber), che peraltro sono riportati su tutti testi di storia della chimica, ma il metodo da questi utilizzato [6];



Ritratto di Liebig





### Testamento di Justus von Liebig

(nda: pubblicato per la prima volta in Italia sulla rivista di Aiab, Bioagricoltura - maggio/giugno 1996, [15])

*Confesso volentieri che l'impiego dei concimi chimici era fondato su delle supposizioni che non esistono nella realtà. Questi concimi dovevano portare una rivoluzione completa in agricoltura. Il concime di stalla doveva essere completamente escluso e tutte le materie minerali asportate dai raccolti, sostituite con dei concimi chimici. Il concime doveva permettere di coltivare su di uno stesso campo, senza discontinuità e senza esaurimento, sempre la stessa pianta, il trifoglio, il grano ecc., secondo la volontà e i bisogni dell'agricoltore. Avevo peccato contro la saggezza del Creatore e ho ricevuto la dovuta punizione. Ho voluto portare un miglioramento alla Sua opera e nella mia cecità ho creduto che nel meraviglioso concatenamento delle leggi che uniscono la vita alla superficie della terra, rinnovandola continuamente, un anello era stato dimenticato, che io povero verme impotente, dovevo fornire.*

- dimostra una profonda conoscenza delle tendenze della ricerca chimica che era in corso nel suo tempo e manifesta una lungimiranza quasi profetica: ipotizza con precisione alcune scoperte e prodotti della tecnica che poi si avvereranno dopo di lui nel corso del secolo che è successivo alla pubblicazione delle sue lettere: ... *Crediamo possibile d'illuminare nella maniera la più brillante, città intere con delle lampade senza fiamma, senza fuoco, e alle quali l'aria non ha punto accesso* (nda: la lampada elettrica verrà inventata da Edison solo nel 1879) ... *crediamo che domani o doman l'altro qualcuno troverà la maniera di fare dei magnifici diamanti col carbone di legna* (nda: il diamante sintetico verrà prodotto solo intorno alla metà del Novecento), *degli zaffiri o de' rubini con l'allume* (nda: Auguste Verneuil produrrà il primo rubino sintetico dall'allumina nel 1891); ... *la benefica chinina o morfina con la pece del carbon fossile* (nda: il chinino sintetico verrà prodotto nel 1929 e la morfina nel 1898) [7];
- formula una lucida e originale sintesi della fisiologia dei viventi estremamente razionalizzata ed essenziale, con una conseguente moderna collocazione dell'uomo, da lui visto come non dissimile dalle altre specie animali [8];
- guarda l'alchimia (e di conseguenza la pietra filosofale), non con occhio da storico della chimica, ma si direbbe quasi da filosofo della chimica; dando una sua interpretazione dell'alchimia, disciplina scientifico-filosofica che egli pone sotto una luce che la nobilita e la rivaluta all'indomani della tempesta materialista che ha abbattuto l'alchimia durante il periodo illuminista: Liebig qui dimostra di essere un "postilluminista" colto pacato e riflessivo rispettoso del lavoro degli autori dei secoli passati e sempre pronto a valorizzare e recuperare (in chiave moderna, si intende) il frutto delle loro fatiche [9];
- ci fa osservare come il pensiero dei chimici si è trasformato evolvendosi e passando dalla

eccessiva attenzione per i singoli fenomeni allo sforzo di comprensione della legge naturale che ci sta dietro e che li governa [10];

- rileva che l'errore metodologico degli alchimisti era quello di concentrarsi eccessivamente sui dettagli operativi delle ricette chimiche, perdendo in tal modo la visione generale dei fenomeni; ma essi erano figli del loro tempo e il metodo scientifico era ancora agli inizi, non si può certo imputare a loro nessuna colpa [11];

- offre una lucida sintesi, non tanto della storia della chimica, ma dell'evoluzione del metodo con cui si è sviluppata la chimica nei secoli, tratteggiando con poche parole chiare e precise il risultato della sua analisi [12, 13].

Come si può comprendere dalle poche considerazioni sopra riportate, Liebig, si spinge a valutazioni personali che in alcuni punti finiscono con lo sfiorare argomenti appartenenti ad altre discipline del sapere umano. Questo, come si può facilmente immaginare, ha scatenato qualche reazione nel mondo accademico del tempo. A questo proposito, è giunta fino a noi la dura replica di Jacob Moleschott (Hertogenbosch, 9 agosto 1822 - Roma, 20 maggio 1893) che pubblica nel 1852 a Magonza *Der Kreislauf des Leben*. La sua critica fu un'aspra reazione antispiritualistica, quasi una risposta, alle lettere di Liebig. Non va dimenticato che Liebig si contrapponeva a Moleschott per la sua differente impostazione scientifico-filosofica, quindi oggi forse possiamo affermare che la reazione del suo illustre e celebre collega era quasi prevedibile [14].

Viene forse da chiedersi se Moleschott, prima di pubblicare il suo saggio, abbia avuto modo di leggere il testamento di Liebig (che è riportato nel riquadro). Noi posteri oggi, leggendo il testamento di Liebig, abbiamo modo di apprezzare maggiormente questo grande genio della chimica che si è dato interamente alla scienza e che ci ha lasciato una eredità culturale veramente ingente. Del resto egli stesso, parlando di sé e del suo fecondo lavoro

di ricercatore, in una lettera indirizzata signor Dumas di Parigi, diceva "...i nostri sforzi nella scienza alla quale abbiamo consacrato la nostra vita..." [3].

Tuttavia per uscire dalle legittime critiche e osservazioni di carattere filosofico, che se non opportunamente tenute a freno rischiano di farci scivolare nell'insidioso campo della teologia (vedi testamento di Liebig), e per raccogliere le fila di questo discorso e avviarci alla conclusione di queste brevi note, si vuole qui invitare il lettore a leggere la 36esima lettera chimica di Liebig. Questo al fine di poterne apprezzare l'insieme e raccogliere un frammento del prezioso insegnamento che con essa Liebig ci ha lasciato nel campo della storia della chimica e dell'alchimia.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] Dizionario Enciclopedico Moderno, Vol. III, pag. 277, Edizioni Labor, 1943.
- [2] Justus Liebig, *Nuove lettere sulla chimica considerata nelle sue applicazioni all'industria, alla fisiologia e all'agricoltura*, prima versione dal francese di Angelo Ranieri, Napoli -1852; consultabile e scaricabile dal sito: <https://books.google.it/books?id=R685AAAAcAAJ>
- [3] *ibid.*, pag. 5.
- [4] *ibid.*, pag. 212.
- [5] *ibid.*, pag. 216.
- [6] *ibid.*, pag. 218.
- [7] *ibid.*, pag. 230.
- [8] *ibid.*, pag. 231.
- [9] *ibid.*, pag. 232.
- [10] *ibid.*, pag. 233.
- [11] *ibid.*, pag. 234.
- [12] *ibid.*, pag. 236.
- [13] *ibid.*, pag. 237.
- [14] [www.treccani.it/enciclopedia/iacob-moleschott](http://www.treccani.it/enciclopedia/iacob-moleschott)
- [15] [https://it.wikipedia.org/wiki/Justus\\_von\\_Liebig#cite\\_note-5](https://it.wikipedia.org/wiki/Justus_von_Liebig#cite_note-5)

### A Letter of Liebig on Storia della Chimica

The 36<sup>th</sup> letter of Liebig's correspondence archive is a digression on the history of 2000 years of chemistry. In the text of the letter the personal approach of the Author appears, in which he analyses, more than the history, the philosophy at the base of scientific thought, focussing in particular on the methodology of chemistry in the past and on its evolution.

## I DIECI ANNI DI REMTECH EXPO

*DALLA BONIFICA DEL PETROLCHIMICO DI FERRARA A EVENTO INTERNAZIONALE*

RemTech Expo (Ferrara Fiere, 21-23 settembre, [www.remtechexpo.com](http://www.remtechexpo.com)) raggiunge quest'anno l'importante traguardo della decima edizione, al culmine di un percorso che ha portato l'evento di Ferrara Fiere Congressi a imporsi come punto di riferimento internazionale in materia di bonifiche, tutela e riqualificazione del territorio.

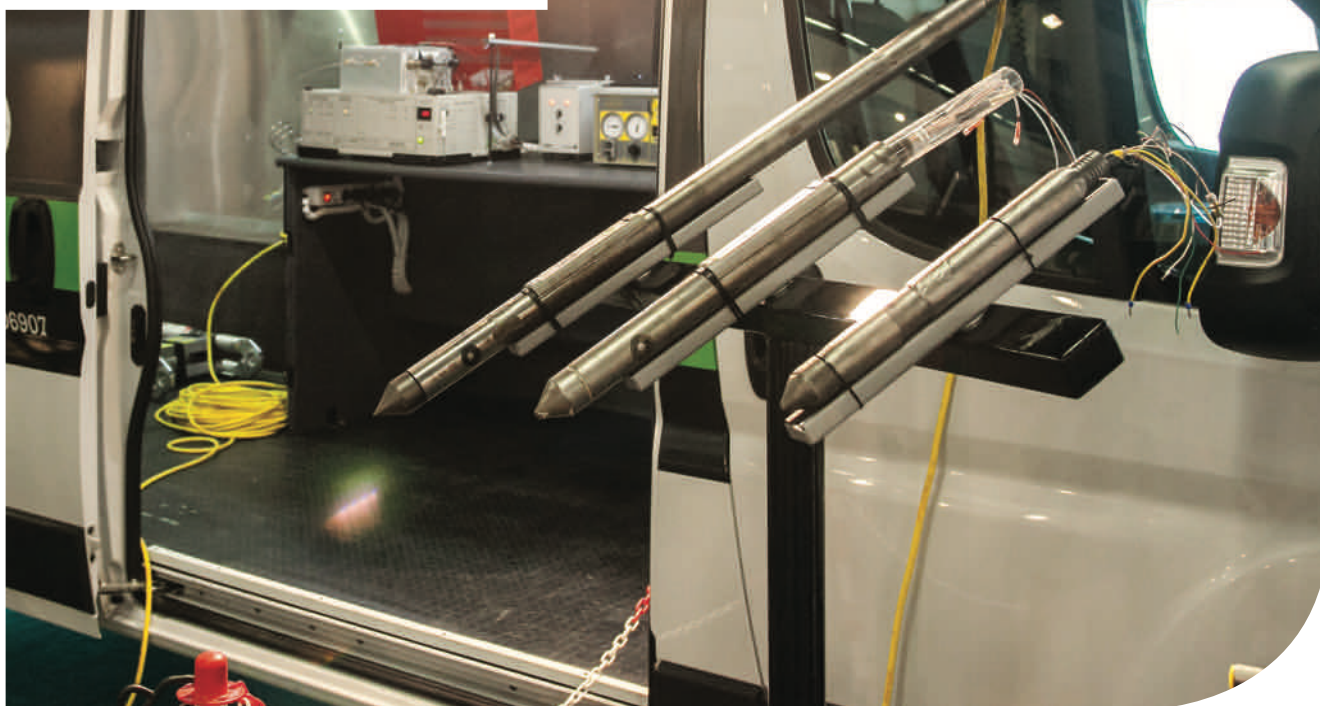
Il decimo compleanno di RemTech Expo coincide significativamente con quello del Codice Ambientale, che determinò l'allineamento delle norme italiane sulla messa in sicurezza e sugli interventi di bonifica alle procedure internazionali.

Fu proprio in quel clima che, a Ferrara, tra il 2001 e il 2005, si sviluppò un intenso dibattito, per approfondire le problematiche legate alle bonifiche dei suoli e della falda acquifera, e per valutare le migliori tecnologie di trattamento. Il confronto su come procedere ai campionamenti, alle analisi e alle caratterizzazioni fece della gestione del progetto di bonifica del Polo Chimico di Ferrara un innovativo laboratorio di idee, di ricerca di soluzioni, di scambio e crescita collettiva, sia tecnica che culturale.

Nacque allora l'idea di creare a Ferrara un appuntamento su questi temi, per mettere

a frutto l'esperienza maturata nello storico insediamento industriale ex Montedison. Tanto più che, nel 2001, le aziende, i sindacati, le autorità locali e regionali e l'allora Ministro dell'Industria avevano siglato l'accordo di programma sulla riqualificazione e compatibilità ambientale del Polo Chimico, delineando una politica industriale che partisse dai controlli, dalla sostenibilità e dall'impegno delle imprese a bonificare, a dialogare con istituzioni e cittadini, a informare sull'impatto delle produzioni sul territorio.

Da ciò è scaturito RemTech Expo dove, alla prima edizione (settembre 2007), furono presentati lo stato delle bonifiche in Italia e il progetto preliminare di bonifica del Polo di Ferrara, facendo parlare, per la prima volta, di "valore della bonifica" quale investimento per il futuro e di "rapporto di fiducia" tra industria e istituzioni al servizio del bene comune.





A CURA DI SILVIA CAUTERUCCIO E MONICA CIVERA  
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA  
 UNIVERSITÀ DI MILANO  
 SILVIA.CAUTERUCCIO@UNIMI.IT  
 MONICA.CIVERA@UNIMI.IT

### La dinamicità dei contatti residuo-residuo e l'attività catalitica della ciclofilina

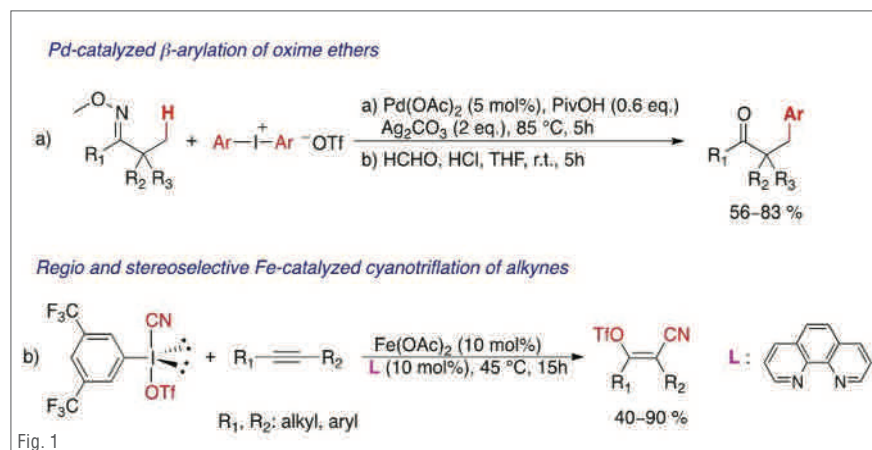
L'attività enzimatica e il legame ad un substrato sono fortemente influenzati dai movimenti del recettore. Tuttavia, a parte rari casi, difficilmente si osservano dei grandi riarrangiamenti conformazionali della proteina a causa dell'interazione con un ligando. Inoltre è molto difficile correlare i cambiamenti osservati con l'attività catalitica. In un recente lavoro Doshi [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, **113**, 4735] utilizza lunghe ed estensive simulazioni di dinamica molecolare (MD) della ciclofilina A (CypA), una isomerasi *cis-trans* il cui *turnover* catalitico avviene nella scala dei millisecondi, per interpretare i dati NMR e studiare l'equilibrio conformazionale della proteina in relazione all'attività enzimatica. Mentre le simulazioni possono caratterizzare a livello atomico il funzionamento e la dinamicità della CypA, la spettroscopia NMR può integrare e supportare l'analisi delle traiettorie delle simulazioni. Essendo il dato sperimentale NMR di ambigua interpretazione, visto che rileva un comportamento del sistema 'mediato' da diversi contributi che, come nel caso della CypA, è caratterizzata da stati in cui la proteina è legata al substrato o libera di muoversi in soluzione, l'analisi delle simulazioni diventa fondamentale per poter interpretare correttamente l'informazione sperimentale. In questo lavoro si considerano diversi stati del sistema (CypA in soluzione, CypA legata ad un substrato nello stato *trans*, di transizione, e *cis*) campionati indipendentemente su una scala di tempi dei microsecondi. Per l'analisi si utilizza un approccio *coarse grain*, ovvero per ogni coppia di residui si calcolano le distanze di interazione e si attribuisce il valore 1 al contatto formato e 0 a quello che si rompe (avendo definito una soglia di *cutoff*). La traiettoria si condensa in un sistema binario di 0 e 1 in cui è possibile identificare i contatti dinamici, ovvero quelli che si formano con una probabilità tra il 10% (poco formati) e il 90% (molto formati). Per ogni sistema è inoltre possibile selezionare i residui dinamici coinvolti nei corrispondenti contatti dinamici e confrontare questa analisi con il dato NMR. Quello che si osserva è che esiste un cluster di residui dinamici lontano dal sito attivo, a circa 15 Å, e che i residui che in-

teragiscono con il substrato sono invece poco dinamici, ovvero non formano o rompono molti contatti. Inoltre, la comunicazione *long-range* tra i due siti avviene attraverso un cammino di connessioni inter-residuo. Infatti le simulazioni fatte su una variante di CypA mutata in cui si modifica un residuo appartenente al dominio dinamico lontano dal sito attivo (V29L), non mostrano un cambiamento nel numero e tipo di residui dinamici ma, rispetto a CypA wild type, evidenziano un effetto *long-range* per cui i residui che collegano questo sito a quello catalitico hanno una probabilità più bassa di rottura e formazione di contatti. Inoltre l'effetto della mutazione comporta una riduzione dei tempi di vita media dei contatti residuo-residuo attorno al residuo mutato.

### Sali di aril iodonio in sintesi organica

Composti ipervalenti a base di iodio hanno ricevuto particolare attenzione in sintesi organica, grazie al fatto che possono essere usati quali ossidanti o reagenti elettrofili in un ampio numero di trasformazioni chimiche. Tra questi, i sali di diaril iodonio ( $Ar_2I^+X^-$ ) si sono dimostrati agenti elettrofili arilanti molto versatili nei confronti di svariati nucleofili, trovando molte applicazioni in reazioni di *cross couplings* e di attivazione di legami C-H. Un aggiornamento sulla letteratura relativa all'impiego di derivati ipervalenti dello iodio in sintesi organica è possibile trovarlo in due recenti *reviews*: l'*Account* di Novák, nel quale vengono riportate le applicazioni dei sali di diaril iodonio (III) in reazioni di

arilazione diretta sia *metal-free* che mediate da complessi di Pd e Cu [Z. Novák, *Synlett*, 2016, DOI:10.1055/s-0035-1561369]; la *review* di Yoshimura, di carattere più generale, nella quale sono analizzati sistematicamente gli studi sui diversi reagenti ipervalenti di iodio pubblicati fino all'estate del 2015 [A. Yoshimura, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 3328]. Nel 2016 la letteratura continua ad essere ricca di lavori relativi all'impiego di sali di aril iodonio nei diversi ambiti della sintesi organica. A titolo d'esempio, ho selezionato due lavori che hanno obiettivi sintetici molto diversi tra di loro, ma possiedono come denominatore comune l'uso di un sale di aril iodonio quale reagente chiave: i) l'arilazione diretta in posizione  $\beta$  di eteri ossimici a dare  $\beta$ -aril chetoni, mediante attivazione di legami C(sp<sup>3</sup>)-H (Fig. 1a) [C. Chen, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 1383]; ii) l'addizione regio e stereoselettiva dei gruppi CN e OTf ad alchini interni catalizzata da Fe(OAc)<sub>2</sub> (Fig. 1b) [A. Studer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 2977]. Il *cross coupling* studiato da Chen è stato utilizzato anche nella formazione di legami C(sp<sup>3</sup>)-C(sp<sup>2</sup>) in derivati più complessi di origine naturale, come il lanosterolo e l'acido glicirretico, dimostrandone la notevole versatilità e generalità. Da sottolineare infine l'elevato valore sintetico della procedura sviluppata da Studer, che permette di ottenere triflati alchenilici ulteriormente funzionalizzabili in modo stereospecifico, sfruttando il gruppo OTf in tradizionali *cross coupling* Pd-catalizzati, oppure mediante idrolisi per ottenere  $\alpha$ -cianochetoni o  $\beta$ -chetoammidi.

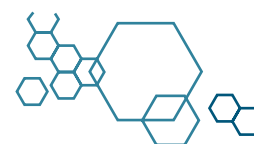






**POWERING YOUR COMPANY**

[WWW.AGICOM.IT](http://WWW.AGICOM.IT)



**D**a tanto non parlo di prodotti naturali (NP) in questa rubrica, e quindi - pur non avendo trovato uno spunto nella recentissima letteratura - ho deciso di occuparmene, con un contributo un po' diverso dal solito, in cui citerò lavori e recensioni anche di alcuni anni fa.

Siamo tutti d'accordo sul fatto che i NP siano stati essenziali nello sviluppo di molti dei farmaci ad oggi noti (sia come tali, che come derivati semi-sintetici, che come fonte d'ispirazione per sforzi completamente sintetici). Ai miei studenti chiedo sempre se conoscono chi sarebbe stato in grado di disegnare razionalmente il tassolo, prima di scoprirlo da *Taxus brevifolia*; oppure se qualche biologo/farmacologo avesse potuto razionalmente suggerire la polimerizzazione dei microtubuli come *target* terapeutico per la cura di malattie tumorali, prima dell'identificazione della stessa come meccanismo d'azione del tassolo stesso. Ciononostante, molti sostengono - correttamente - come l'estrema complessità sintetica dei NP ne limiti l'applicabilità e la "sfruttabilità" sintetica.

Oggi voglio parlarvi di *diverted total synthesis* (DTS) e di *function-oriented synthesis* (FOS), termini conati rispettivamente da Danishefsky a New York [*Nat. Prod. Reports*, 2010, **27**, 1114], e da Wender a Stanford [*Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 40]. Entrambi i contributi "visionari" riportano nel loro testo due figure, che io ho riprodotto in Fig. 1.

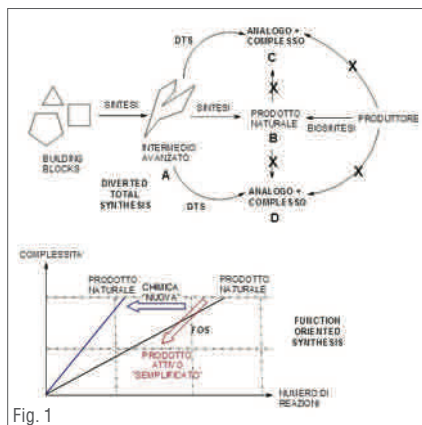


Fig. 1

Quando la struttura di un NP complesso è nota ed una retrosintesi è stata concepita, si inizia da prodotti commerciali/*building blocks* e li si elabora fino ad un intermedio avanzato **A** (Fig. 1, in alto). Questo intermedio può - con sudore e lacrime... - essere ulteriormente modificato fino ad ottenere il prodotto naturale/ NP **B** stesso; è ben vero che lo stesso **B** può spesso essere ottenuto più facilmente per biosintesi dal produttore naturale, ma la messa a punto della sua sintesi totale è stata molto utile in passato anche per confermarne la struttura. Consideriamo ora che l'intermedio **A** possa essere modificato a dare analoghi sintetici più complessi **C**, o meno complessi **D**; le vie di sintesi verso entrambe le tipologie di analoghi divergono dalla sintesi totale, e per questo Danishefsky le ha chiamate DTS. Si noti come né **C** né **D** possano essere prodotte biosinteticamente dal produttore naturale, e neppure per modificazione sintetica del prodotto naturale **B**; quindi, la loro sintesi complementa la sintesi/biosintesi totale di **B**, permettendo di acquisire una relazione struttura-attività (SAR) preliminare, utile per identificare analoghi semi-sintetici più potenti, più biodisponibili o meno tossici.

Ancor più interessante mi sembra descrivere la FOS. Nel diagramma in basso di Fig. 1 trovate in ascissa il numero dei passaggi di reazione necessari in una via di sintesi (a crescere verso destra), e la complessità di una molecola (crescente verso l'alto). Un prodotto naturale complesso viene sintetizzato attraverso un protocollo sintetico pure molto complesso (linea diagonale nera in grassetto), richiedente un alto numero di reazioni; il contributo che un buon chimico farmaceutico può dare ad una maggiore accessibilità sintetica dello stesso NP sta nell'ideare una via sintetica alternativa ("chimica nuova" nel grafico di Fig. 1), che permetta di ottenere lo stesso NP molto complesso con un minor numero di reazioni. Sappiamo tutti, però, che non sempre i "miracoli sintetici" sono realizzabili: una strategia FOS di "ricostruzione" semplificata del NP a partire dalle parti strutturali del NP presunte come essenziali per l'attività biologica può for-

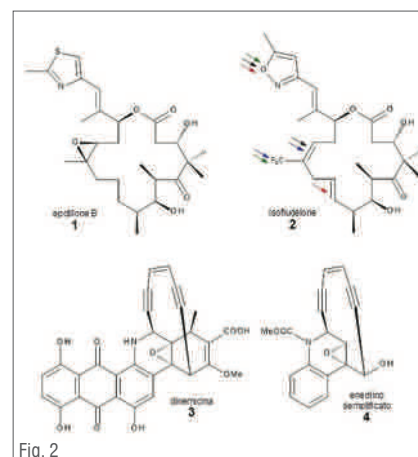


Fig. 2

nire una soluzione alternativa. Un saggio biologico sui risultanti analoghi sintetici ("prodotto attivo "semplificato" nel grafico di Fig. 1) può identificarne di similmente attivi, molto meno complessi, e richiedenti un numero molto minore di passaggi di reazione per completarne la sintesi.

Questi discorsi teorici sono facilmente comprensibili osservando in Fig. 2 rispettivamente una coppia NP-DTS (epitolone **B** - iso-fludelone **2**, vedi *PNAS*, 2008, **105**, 13157) con quest'ultimo più potente (doppio legame al posto dell'epossido e isossazolo/frecce nere), più stabile (doppio legame e isossazolo/frecce rosse), meno tossico (rimozione epossido ed introduzione trifluorometile/frecce blu) e più solubile (introduzione trifluorometile e isossazolo/frecce verdi) grazie alle modifiche strutturali introdotte; ed una coppia NP-FOS (dinemicina **3** - enediino semplificato **4**, vedi *JACS*, 1991, **113**, 2311), con quest'ultimo potente tanto quanto il composto **3** in termini di DNA *cleavage* dopo attivazione, ma ottenibile attraverso 8 passaggi sintetici invece dei 33 necessari per il NP che lo ha ispirato.

Posso essere in pace con la mia coscienza segnalandovi una recente *review* [M.E. Maier, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 5302], che riporta molti esempi di DTS, FOS e di altri approcci ispirati allo sfruttamento *high throughput* della struttura di NP attraverso approcci sintetici. Buona lettura!



## LENZÈ: EFFICIENZA ENERGETICA = EFFICIENZA SOCIALE

*LENZÈ, AZIENDA FAMILIARE FONDATA NEL 1947, È DA SEMPRE MOLTO ATTENTA SIA COME MULTINAZIONALE SIA NELLE PERSONE DELL'AMMINISTRATORE DELEGATO E REGIONAL MANAGER SOUTH EUROPE SERGIO VELLANTE, ALL'INNOVAZIONE TECNOLOGICA, INTESA NON COME RICERCA DI FORME ALTERNATIVE DI ENERGIA, MA COME SALVAGUARDIA E CORRETTO UTILIZZO DELLE RISORSE ENERGETICHE E AMBIENTALI. IN QUESTO AMBITO DI INTERESSE, È STATO DATO SOSTEGNO AD INIZIATIVE, COME QUELLA QUI RIPORTATA, STIMOLATI ANCHE DA RIFLESSIONI DI CARATTERE SOCIALE E CULTURALE.*

Negli ultimi anni nel nostro Paese abbiamo assistito, in modo sempre più rapido, al verificarsi di una profonda crisi demografica soprattutto dei piccoli centri dell'entroterra, a causa delle scarse possibilità occupazionali che portano sempre più i giovani a migrare verso le grandi aree urbane (quando non all'estero), lasciando nelle terre nate una popolazione che invecchia inesorabilmente. Da ciò la necessità di creare luoghi e modi per mantenere attiva la popolazione anziana, creando spazi pubblici dove, oltre a nuove relazioni sociali, queste persone possano trovare un nuovo benessere fisico e mentale e sentirsi di nuovo una risorsa utile per i loro concittadini.

Cosa fare allora quando un lungimirante consigliere comunale delegato al patrimonio storico paesaggistico e ambientale di uno dei Borghi più belli d'Italia con una storia millenaria come Penne, quale è l'architetto Daniele Toppeta, (che nella sua città ha già seguito, curato e realizzato tante iniziative, come il regolamento per la tutela del verde pubblico e privato, l'istituzione dei boschi urbani come aree protette regionali, la riapertura della cripta della cattedrale, il restauro di una statua di epoca romana ecc.) chiede un aiuto per poter realizzare un'attività semplice come gli orti urbani? Bisogna dimostrare che la cultura produce risultati migliori del potere.

Gli orti urbani sono una realtà che ha cominciato a diffondersi in Italia già da molti anni; la filosofia e gli aspetti trainanti di queste iniziative sono la riqualificazione del territorio, il sostegno all'educazione del rispetto dell'ambiente e della sana alimentazione, la socializzazione e il senso di comunità, l'occupazione del tempo libero delle persone anziane che troveranno nuovi stimoli a trasmettere ai giovani i valori culturali legati al senso di appartenenza alla terra.

Questa iniziativa è stata accolta con entusiasmo da Lenzè, che ha partecipato con un modesto contributo alla realizzazione di tale area. L'unità di intenti e la fattiva collaborazione di Enzo Di Simone, funzionario dell'ufficio tecnico, dell'agronomo Roberto di Muzio e del Sindaco Dott. Rocco D'Alfonso, molto attento e presente, hanno permesso di concretizzare rapidamente tale progetto inaugurato ufficialmente il 2 giugno.

## ISI PLAST

### SERIE SC PER SMALTI ALL'ACQUA

Isi Plast S.p.A, azienda leader in Italia nella produzione di contenitori plastici per il settore industriale, propone sul mercato un'intera linea di prodotti particolarmente indicati per contenere smalti all'acqua e prodotti affini.

I contenitori della Serie SC si caratterizzano per la forma cilindrica a bocca larga, studiata appositamente per uno svuotamento rapido e totale del contenuto.

Lo spessore delle pareti e il materiale di alta qualità utilizzato conferiscono robustezza ai barattoli che risultano essere particolarmente resistenti agli urti. La particolare forma cilindrica stretta ed alta facilita la movimentazione dell'imballo, sia manuale che attraverso macchinari di riempimento. Inoltre la struttura di questi contenitori li rende ottimali per essere utilizzati con sistemi tintometrici.

Il design dei barattoli della Serie SC è stato concepito per garantire un'efficiente esposizione a scaffale, in quanto perfettamente impilabili.

Inoltre possono essere personalizzati attraverso l'applicazione di etichette adesive, etichette IML o stampa offset.

I contenitori che compongono la Serie SC si contraddistinguono per dimensioni, capacità e per la disponibilità di coperchi a pressione o con sigillo di garanzia.

Tutte queste caratteristiche rendono i barattoli della Serie SC ideali per contenere smalti all'acqua e prodotti affini.





## **BASF:** PER SCATOLE DI TRASMISSIONE CHE TRASPIRANO FACILMENTE

• *INTEGRAZIONE FUNZIONALE DELL'ALLOGGIAMENTO E DEI COMPONENTI ELETTRONICI: CONTENITORE DI SENSORI COMPOSTO DA ULTRADUR® HR (RESISTENTE ALL'IDROLISI) DI BASF*

• *ROSENBERGER SPRITZGUSS UND FORMENBAU PRODUCE UN CONTENITORE DI SENSORI PER REFRIGERATORI INTERMEDI CON UN PROCESSO MONOFASE E SENZA LINEE DI SALDATURA*

La combinazione del materiale giusto e delle competenze tecniche necessarie per integrare funzioni consente di velocizzare i processi di produzione e di aumentare la durata dei componenti. Grazie al PBT (polibutilene tereftalato) resistente all'idrolisi Ultradur® HR di BASF e al know-how di BASF nel campo della saldatura a ultrasuoni, l'azienda Rosenberger Spritzguss und Formenbau è riuscita a sviluppare un nuovo tipo di contenitore per sensori a effetto Hall. Si tratta di un contenitore che unisce l'alloggiamento e la piastra del circuito stampato in un unico componente e che viene stampato a iniezione con un'unica fase di produzione completamente automatica. Una membrana PET saldata all'interno dell'alloggiamento fornisce la compensazione dalla pressione necessaria in caso di cambiamenti climatici. Se combinata con il PBT di BASF che è resistente all'umidità dell'aria, la durata del componente risulta ancora maggiore. Il contenitore completa la scatola di trasmissione di controllo. Il sensore a effetto Hall saldato misura la posizione della valvola nel ricircolo dei gas di scarico. L'intero componente è installato come un coperchio sui moduli di ricircolo dei gas di scarico che sono presenti come standard in molte automobili in Europa.

### **Ultradur® HR altamente resistente all'idrolisi per ambienti caldi e umidi**

I materiali utilizzati per i moduli di ricircolo dei gas di scarico (EGR) devono sostenere elevati carichi termici, meccanici e chimici, pertanto devono fornire la massima resistenza alla deformazione e alla corrosione. Ultradur® B 4330 G6 HR (HR = Hydrolysis Resistant, resistente all'idrolisi) è noto per l'elevata resistenza all'idrolisi in ambienti caldi e umidi. Questa caratteristica permette di aumentare notevolmente la durata e la resistenza del componente, anche nella gamma di temperature da -40 a 140 °C richiesta dalle case automobilistiche come risultato di un design sempre più compatto dei moduli di ricircolo dei gas di scarico e del vano motore. Ultradur® B 4330 G6 HR fornisce inoltre un miglioramento sostanziale della resistenza ai mezzi alcalini che causano la formazione di cricche per corrosione sotto sforzo. La plastica può essere lavorata senza problemi.

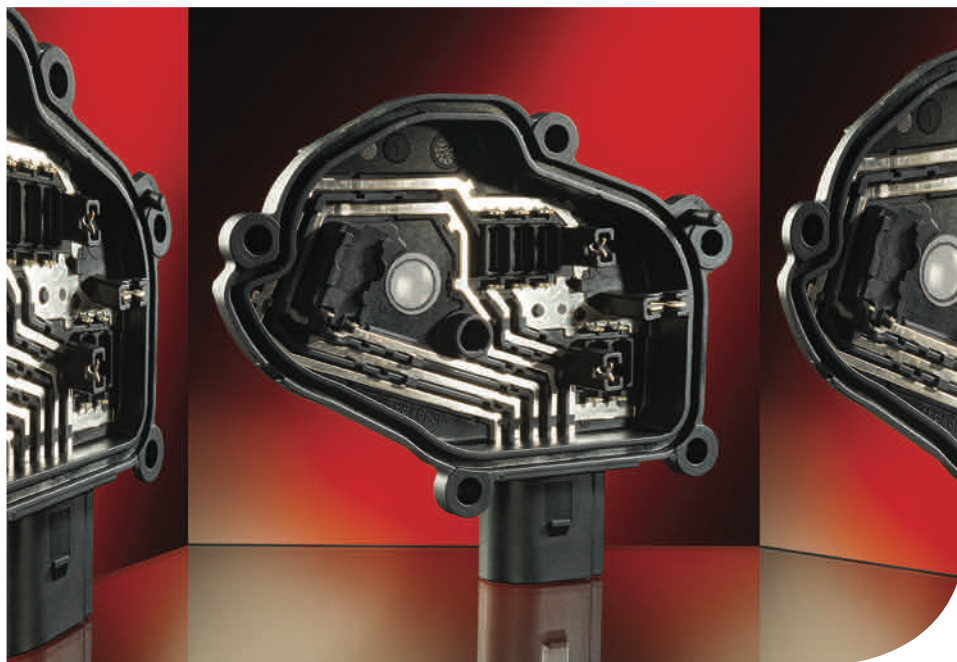
### **Membrana saldata internamente per la compensazione dalla pressione**

Il coperchio del sensore che misura 10 x 8 cm è estremamente resistente, soprattutto grazie al processo di stampaggio a iniezione a un'unica fase e al design esclusivo. La piastra del circuito stampato viene inserita nello stampo dell'alloggiamento e fissata in posizione in modo da poter essere sovrastampata senza l'ausilio di dispositivi di fissaggio esterni. In questo modo, è possibile evitare le linee di saldatura che potrebbero formarsi in caso di oscillazioni della temperatura o della pressione dell'aria. Tuttavia, poiché queste variazioni climatiche sono inevitabili e causano perdite all'interno dell'alloggiamento, nel coperchio del sensore viene saldata una sottile membrana PET. La membrana,

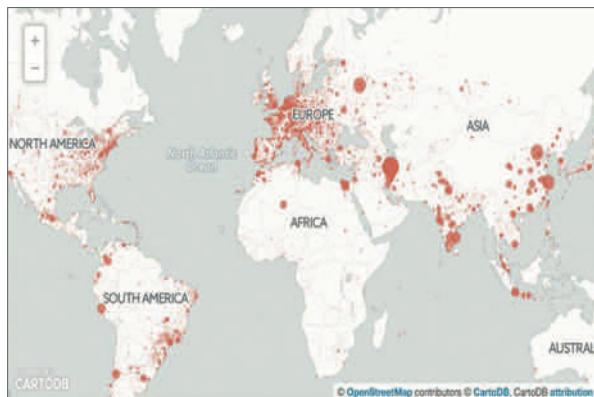
con un diametro di circa 1,3 cm, viene fissata all'alloggiamento PBT mediante saldatura a ultrasuoni. Essendo permeabile all'aria, ma a tenuta d'acqua, fornisce l'adeguata compensazione dalla pressione.

"La saldatura a ultrasuoni con questa combinazione di materiali è un lavoro di alta precisione. La straordinaria esperienza di BASF ci ha aiutati a ottimizzare questa complessa tipologia di saldatura e a implementare un processo stabile per la produzione in serie" ha spiegato Axel Gutzmer, Operations Manager presso Rosenberger Spritzguss und Formenbau. "Grazie alla plastica appositamente sviluppata per l'alloggiamento, siamo riusciti, in un breve periodo di sviluppo di appena dodici mesi, a produrre con successo il coperchio del sensore, rispettando le specifiche della casa automobilistica in termini di tenuta e di affidabilità di lavorazione". In passato la combinazione di alloggiamento, connettore e solchi dei conduttori poteva essere realizzata solo attraverso un complesso processo di stampaggio a iniezione in più fasi. Innanzitutto, i solchi dei conduttori venivano sovrastampati separatamente con la plastica, quindi posizionati in un altro stampo utilizzato per produrre l'intero componente dell'alloggiamento. Per fare in modo che i solchi dei conduttori non si spostassero durante questo processo di stampaggio a iniezione, solitamente venivano utilizzati dispositivi di fissaggio esterni.

BASF offre diversi gradi di Ultradur® modificati con HR, con il 15% o il 30% di rinforzo in fibra di vetro, nonché tenacizzati, stampabili al laser o ignifughi. Questi materiali vengono principalmente utilizzati nei componenti elettronici delle auto, ad esempio negli alloggiamenti di centraline, connettori e sensori.



# LA PICCOLA PRINCIPESSA, ELSEVIER E ACS



**N**el capitolo XIII de *Il Piccolo Principe*, il libro di Antoine de Saint Exupéry per bambini veri e anche un po' cresciuti, si narra dell'incontro del protagonista, giunto sul quarto pianeta che visita, con un uomo d'affari. Sta contando a milioni e non vuole essere disturbato. Trovate il testo completo qui ([http://digilander.libero.it/Gretablu/il\\_piccolo\\_principe/pp13.html](http://digilander.libero.it/Gretablu/il_piccolo_principe/pp13.html)), ma ve ne riassumo il senso.

L'uomo d'affari non sa bene cosa sta contando, mosche, api, no... stelle; è arrivato a 500 e più milioni; e cosa se ne fa? chiede il piccolo principe. Gli servono ad essere ricco, a comperare altre stelle, e poi nessuno ci ha pensato prima; il piccolo principe non è convinto, anche lui possiede un fiore che inaffia ogni giorno, tre crateri di vulcani che spazza regolarmente, ma a cosa serve "possedere" una cosa alla quale non si è utili? L'uomo d'affari non sa rispondere e il piccolo principe va via pensando che i grandi sono "straordinari", fanno cose strane, insomma.

Ora sostituite all'uomo d'affari le grandi imprese multinazionali del settore editoriale, al piccolo principe una piccola principessa kazaka, la studentessa Alexandra Elbakyan, 28 anni oggi, ma 24 quando ha incontrato il suo "uomo d'affari" e capirete perché le ragazze sono più pratiche dei ragazzi.

Alexandra, dopo un'esperienza da studentessa internazionale in scienze informatiche, in Russia e USA, conclude che il sistema attualmente usato per la divulgazione a pagamento della ricerca

scientifico è un furto a danno dell'umanità, ma soprattutto delle parti più povere e organizza, al suo ritorno in Kazakistan, a partire dal 2011, un data base che al momento contiene quasi 50 milioni di articoli scientifici liberamente accessibili; non è chiaro come abbia fatto e probabilmente ha hackerato con qualche aiuto i siti che contengono i lavori ma anche quelli che controllano le password che vengono

continuamente rinnovate; esistevano già piccoli data base in Russia, come Genesis, contenenti essenzialmente i libri più famosi della scienza, anch'essi liberamente scaricabili oppure data base come Avaxhome (al momento rinominato avxhome) da cui si possono scaricare files di tutti i tipi protetti da copyright, ma nulla di così ampio e aggiornato come Sci-Hub. La reazione della grande editoria non si fa attendere; nell'ottobre 2015 la Elsevier, che è il gigante mondiale, coprendo quasi un quarto di tutto il mercato editoriale della scienza, ottiene da un giudice della Grande Mela un atto di blocco del sito; attualmente è un po' più difficile di prima ma non impossibile raggiungere Sci-Hub, come di fatto succede con tutti i grandi siti pirati basati in Paesi fuori dagli accordi commerciali, come Russia, West Samoa, Belize, le isole Cocos e Keeling e pochi altri. Alexandra però è diventata di fatto una perseguitata, non può far conoscere dove risiede altrimenti potrebbe essere estradata negli USA dove sarebbe di fatto incarcerata per molti anni, a parte il danno patrimoniale che non potrebbe certo pagare. Potete trovare molte informazioni su *Science*.

A cosa serve la grande editoria in un mondo in cui il peer review è gratuito, lo facciamo noi stessi e sappiamo bene che è gratis; la stampa è sostituita dalla formattazione elettronica sui nostri medesimi computer e noi stessi disponiamo dei programmi di videoscrittura più sofisticati per formattare testi e grafici; cosa fa la grande edi-

toria che giustifichi la spesa degli abbonamenti spesso solo elettronici? E soprattutto il contenuto della ricerca è già pagato da fondi pubblici o in minor parte privati ma comunque è già pagato. I risultati devono essere pubblici, costituiscono patrimonio dell'Umanità, non possono rimanere al servizio solo di chi può pagare e anche ben oltre i 70 anni fatidici del copyright, come di fatto avviene anche per articoli classici della fisica o della chimica. Una risposta la potete trovare nelle stime dei costi fatte da varie fonti: (*Nature*, 2013, **495**, 426) [http://www.nature.com/polopoly\\_fs/1.12676!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/495426a.pdf](http://www.nature.com/polopoly_fs/1.12676!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/495426a.pdf) oppure <http://www.iiisci.org/journal/sci/Costs.pdf>

La stima del mercato editoriale scientifico è di 10 miliardi di dollari all'anno per un paio di milioni di articoli pubblicati, quindi una media di 5.000 dollari ad articolo; la media dei costi di stampa richiesti dalla riviste open sources, che non sono diversi dalle altre è circa 1.500-2.000 dollari; ne segue che il 60% o più dei costi è profitto, nonostante quello ufficialmente dichiarato da giganti come Elsevier sia attorno al 37%. Al momento Sci-Hub fa scaricare quasi 60 milioni di articoli all'anno, ma la quota è destinata a crescere, perché, come ha osservato Peter Suber, direttore dell'Office for Scholarly Communications ad Harvard ed un esperto mondiale di queste tematiche, "a lawsuit isn't going to stop it, nor is there any obvious technical means. Everyone should be thinking about the fact that this is here to stay." Di più pare, come si può osservare dalla mappa qui riportata che non solo i Paesi arretrati preferiscano scaricare da Sci-Hub, ma anche chi almeno formalmente ha gli abbonamenti, abbonamenti costosi; la mia università deve spesso rinunciare a qualche abbonamento; dalle statistiche i più scaricati sono i giornali Elsevier e quelli ACS. E ci sono poi, detto fra noi, i casi all'italiana: le norme UNI, per esempio carissime, legate a regole di scaricamento antiquate e soprattutto obbligatorie nelle applicazioni ma a pagamento; un po' come le tasse: dovete pagare per sapere quanto pagare; ed è anche obbligatorio.

C'è qualcuno che fa il furbo? Voi che ne dite?



2016 SHOW & CONFERENCE

**rams**pec

raw materials specialties chemicals

2<sup>nd</sup> edition

# SALONE DEL PRODOTTO CHIMICO

11-13 Ottobre 2016, MiCo Milano Congressi, Milano



Additivi e Ausiliari - Cere - Biocidi - Lubrificanti - Olii e Acidi Grassi

Polimeri - Resine Naturali e Sintetiche - Leganti

Pigmenti e Coloranti - Masterbatch - Cariche e Riempitivi Minerali - Rinforzi di vario tipo - Fibre

Solventi - Diluenti e Miscele Composte - Specialità Chimiche

Prodotti Chimici di Base e di Processo - Trattamento Acque - Prodotti Chimici Nanostutturati

Apparecchiature e Strumenti per Laboratorio - Impianti e Macchinari per il Processo Produttivo

La mostra-convegno coinvolge a 360° tutte le aziende utilizzatrici di prodotti chimici.  
Di seguito alcuni tra i settori di maggiore interesse:

Edilizia Prodotti Chimici e Derivati - Coatings - Adesivi - Sigillanti - Elastomeri  
Inchiostri - Plastica - Compositi - Gomma - Legno - Abrasivi e Materiali d'Attrito - Tessile  
Pelle e Cuoio - Calzature - Fonderia - Metallurgia - Trattamento Superfici Metalliche - Agraria  
Detergenza - Cosmetica - Polimeri per Stampa 3D

Treatmento delle Acque - Recupero e Smaltimento - Trattamento Rifiuti Chimici

Nanotecnologie e Nanomateriali - Laboratorio per Test e Prove - Impianti e Macchine per la Produzione

PROMOTORE:  
associazione

**octima**

via Ponte Nuovo, 26  
20128 Milano I  
octima.it - info@octima.it

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA:

**CREI**

CENTRO RICERCHE  
EDITORIALI INTERNAZIONALI

CREI srl - via P. Nuovo, 26 - 20128 Milano I  
Tel. +39 02 26305505 - Fax +39 02 26305621  
creisrl.it - info@creisrl.it



[www.ramspec.eu](http://www.ramspec.eu)





Vetreteria di laboratorio  
Lavorazioni artistiche e di design

# Nemo Glass Srl



Nemo Glass nasce dal sodalizio fra Maestri vetrai, artigiani specializzati nell'antica tecnica della soffiatura e un gruppo di giovani imprenditori provenienti da esperienze nei settori chimico e ambientale. La sapiente lavorazione del vetro mediante l'antica tecnica della "soffiatura" affidata ai nostri maestri artigiani e l'impiego di moderne apparecchiature necessarie alle varie fasi di lavorazione consentono la produzione di un'ampia gamma di prodotti, mantenendo standard eccellenti che solo il tocco umano e un preparatissimo occhio esperto possono garantire. Nelle nostre officine con tecniche commerciali innovative, controlli severi nella qualità dei prodotti finiti, si realizzano oggetti in vetro soffiato di qualsiasi forma, colore e dimensione, come da design del cliente.

La Nemo Glass Srl si caratterizza per:

- **Produzione di vasta gamma di prodotti per laboratori chimici, enologici di profilassi e batteriologici in grado di soddisfare le necessarie esigenze tecniche come qualità in vetro, finitura, peso e micro misurazione.**
- **Serigrafie indelebili, fissate ad alta temperatura; marchio aziendale imprimibile su tutti i prodotti richiesti.**
- **Creazione di qualsiasi oggetto in vetro, di settore e/o artigianale.**
- **Specializzazione nell'effettuare riparazioni in vetro di oggetti e accessori.**
- **Allestimento di laboratori sia fissi che mobili completi e chiavi in mano.**
- **Spedizione tempestiva degli ordini in tutta Europa.**