Borsa di studio finalizzata ad attività di ricerca nell'ambito del progetto SWEET
Dipartimento di Scienze Biomolecolari (DISB)
Settore scientifico disciplinare CHIM/08 – Chimica Farmaceutica.

Titolo: Progettazione, sintesi e caratterizzazione di nuovi tensioattivi glicolipidici quali potenziali *enhancer* non-ionici biocompatibili da formulare in preparazioni per l'impiego nelle piaghe da decubito

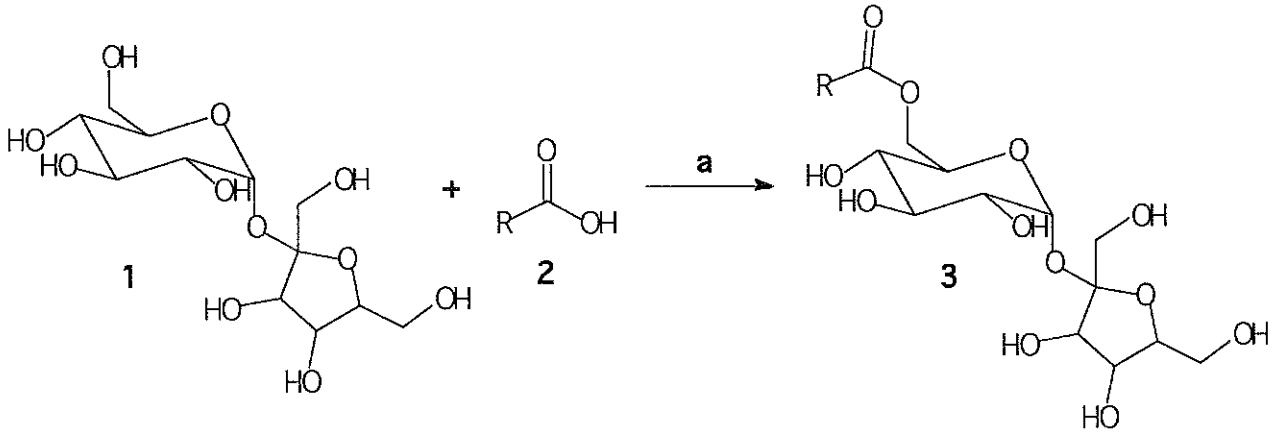
Progetto di ricerca di Michele Verboni

I tensioattivi o surfattanti sono sostanze anfifiliche (costituite da una porzione idrofila "testa" e una porzione lipofila "coda") aventi la capacità di abbassare la tensione superficiale di un liquido andandosi a disporsi nell'interfaccia, agevolando la bagnabilità delle superfici o la miscibilità di due liquidi diversi. Grazie alle loro proprietà chimico-fisiche vengono utilizzati in diversi settori (es. farmaceutico, alimentare e cosmetico)[1]. Possono essere classificati in base alle proprietà ioniche della testa polare idrofila in: anionici, cationici, zwitterionici e non ionici. A quest'ultima classe appartengono i tensioattivi glicolipidici caratterizzati da una porzione zuccherina (monosaccaride o disaccaride) legata a una o più catene di acidi grassi saturi e/o insaturi di diversa lunghezza. Questi surfattanti hanno attirato una grande attenzione in diversi settori in quanto sono sostanze biodegradabili e biocompatibili aventi proprietà emulsionanti, antimicrobiche e di *enhancing*. L'azione antimicrobica è legata principalmente alla loro capacità di inserirsi nelle membrane cellulari batteriche con conseguente alterazione della loro struttura e perdita del materiale citoplasmatico, tuttavia possono essere coinvolti altri meccanismi come l'interferenza nella sintesi proteica del batterio[2]. Essi sono molto efficaci nei confronti dei batteri Gram + e in alcuni casi contro Gram – e funghi. Più in particolare, analizzando la lunghezza della catena idrocarburica i composti contenenti acidi grassi a 10-12 atomi di carbonio sono risultati più attivi verso i Gram +, mentre quelli con acidi grassi ad 8 atomi di carbonio possiedono maggior attività per i Gram -; riguardo alla porzione polare si è riscontrata una maggiore attività (a parità di catena idrocarburica) dei derivati disaccaridici nei confronti di quelli monosaccaridici[3]. L'azione di *enhancing* dell'assorbimento di differenti principi attivi attraverso le diverse membrane biologiche unita ad un buon profilo di sicurezza costituiscono un ulteriore valore aggiunto per questa classe di composti.

In questo progetto si propone di sintetizzare e caratterizzare nuovi glicolipidi, in particolare di nuovi esteri del saccarosio con acidi grassi, da testare per le loro proprietà tensioattive, antimicrobiche e di *enhancer* per l'assorbimento di principi attivi. I prodotti più promettenti saranno poi sottoposti a test *in vitro* ed *ex vivo* come prodotti farmaceutici e cosmetici e additivi alimentari. Per quanto riguarda il processo sintetico il saccarosio sarà esterificato con diversi acidi grassi a media/lunga catena sia saturi che insaturi (es. acido undecilenico, acido linoleico e acido linoleico) formando prodotti con

proprietà differenti (es. profilo di citotossicità, diverse interazioni con le membrane cellulari.

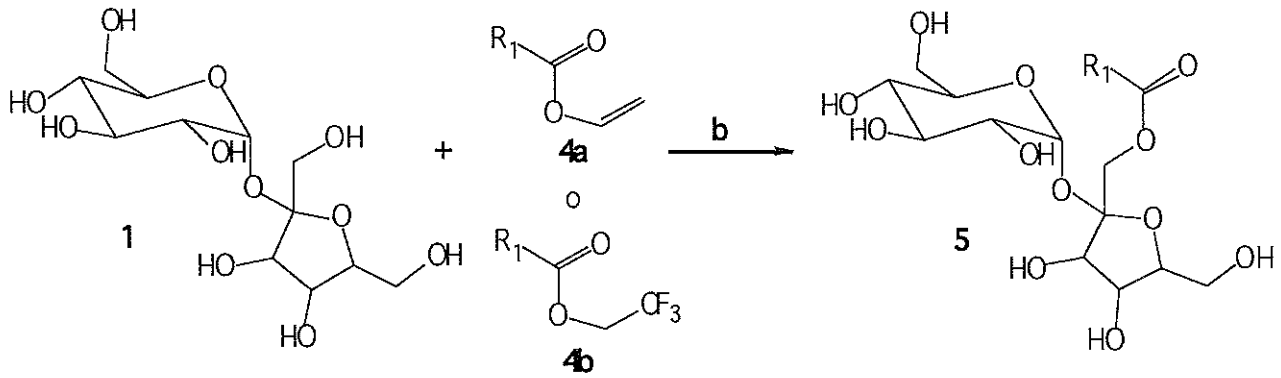
Gli esteri del saccarosio possono essere sintetizzati sia per via chimica che per via enzimatica. La sintesi chimica tradizionale prevede alte temperature, ha una bassa selettività e diversi sottoprodotti, mentre la sintesi enzimatica è notoriamente più selettiva, avviene a temperatura ambiente o di poco superiore e rispetta i criteri della "green chemistry". Una via enzimatica per la mono-esterificazione in posizione 6 del saccarosio[4] (**3**) è rappresentata nello *Schema 1* e prevede l'utilizzo del Lipozyme®:



Schema 1: a) Lipozyme®, 2- metil-2-butanolo (DMSO 20%), RT, 6h

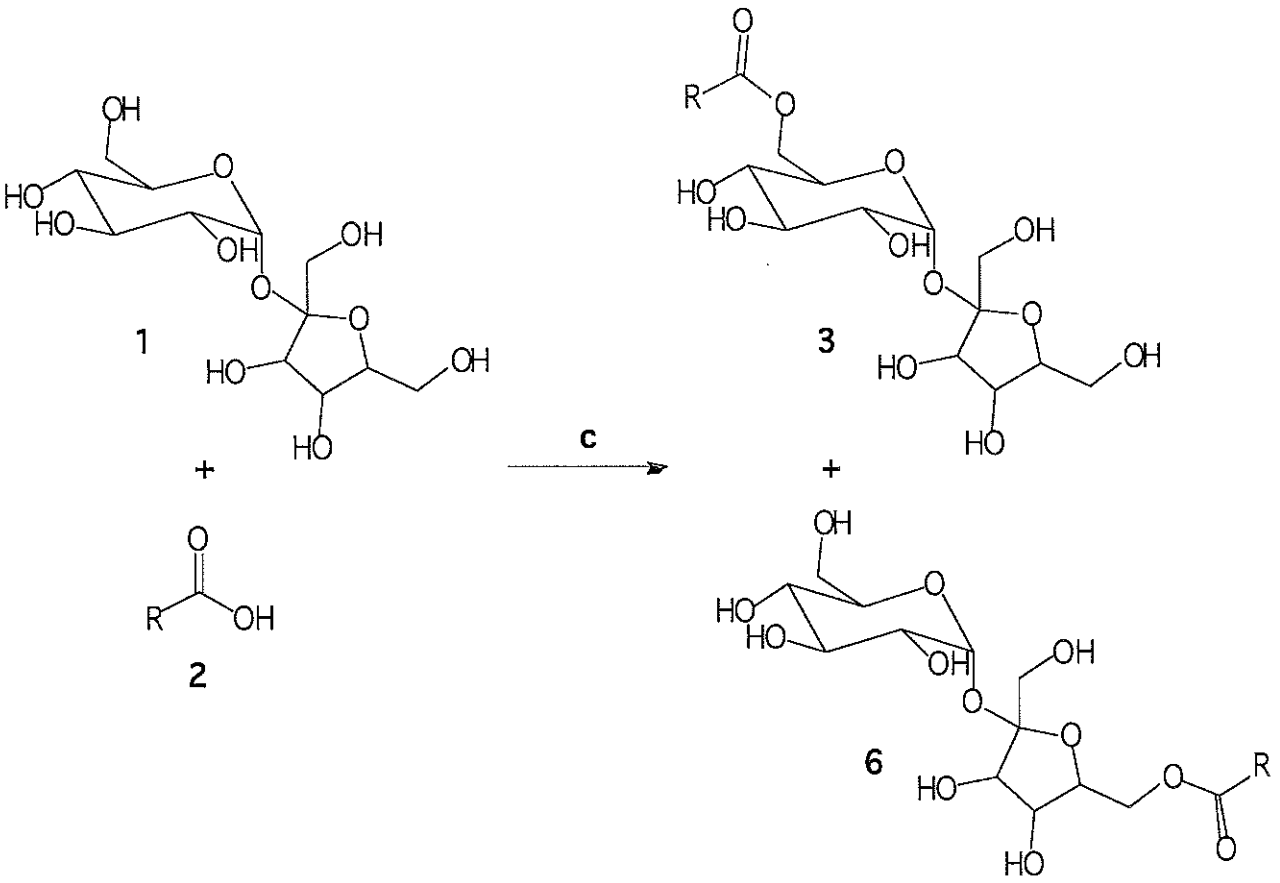
La percentuale di dimetilsolfossido sopra il 15% provoca la formazione selettiva del saccarosio mono esterificato in posizione 6 (con presenza di piccole quantità di 6,6'-di-acilsaccarosio e 1,1'-di-acilsaccarosio) mentre una percentuale inferiore al 10% provoca principalmente la formazione dei di-esteri. In linea generale un aumento della polarità del solvente incrementa la selettività per il prodotto mono-esterificato.[4]

D'altro canto la sintesi enzimatica riportata nello *Schema 2* consente la formazione del saccarosio mono-esterificato in posizione 1' (**5**) con l'utilizzo di una proteasi (Novozyme®)[5]



Schema 2: a) Novozyme®, DMF, H_2O, 45°C

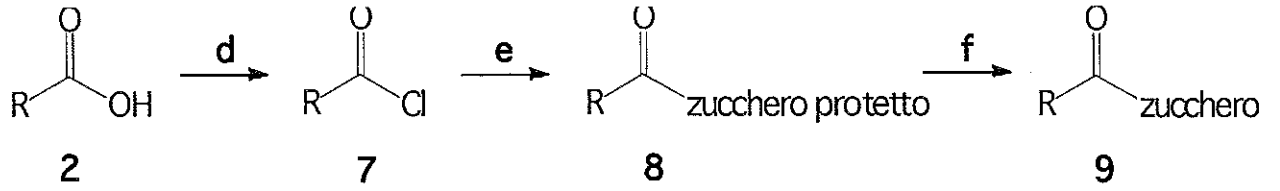
Quando non sarà possibile utilizzare la sintesi enzimatica (a causa di basse rese) si ricorrerà alla sintesi per via chimica. Una classica reazione di esterificazione è rappresentata dalla reazione di Mitsunobu[6] (*Schema 3*).



Schema 3: c) DIAD, PPh_3, DMF anidro, RT, 24h

Con questa reazione si produce principalmente saccarosio esterificato in posizione 6 (circa 85%) e saccarosio esterificato in posizione 6' (circa 15%). Inoltre, si possono creare altri sottoprodotti (6,6'-diesteri) e la competizione tra l'esterificazione intramolecolare e intermolecolare può provocare la formazione di derivati anidro-saccaridici mono-esterificati[7]. Pertanto, per evitare la formazione di composti poliacilati e altri sottoprodotti è da tener in considerazione una preventiva protezione dei gruppi ossidrilici dello zucchero e successiva deprotezione una volta eseguita l'esterificazione.

Un'altra reazione classica prevede la formazione del cloruro acilico dell'acido grasso selezionato e successiva reazione di *coupling* tra quest'ultimo e lo zucchero. Nello *Schema 4* si riporta la reazione di *coupling* con lo zucchero protetto.



*Schema 4: d) $(CO)_2Cl_2$, DMF anidro., RT, 2 h e) **1** protetto, piridina/diossano, 100 °C, 3 h f) H_2/Pd, MeOH:EtOH 1:1, 24 h (per zucchero-N-Cbz) o $HBF_4 Et_2O$, CH_3CN, 30 °C, 4 h (per LTA) o TFA:CH_2Cl_2 1:1, 45' (per zucchero-N-Boc).*

In conclusione, una volta verificata sperimentalmente la via sintetica più economica e più efficiente in termini di resa, si opererà la costruzione di una piccola collezione di derivati saccaridici. Una volta eseguita la caratterizzazione chimico fisica (NMR, ecc.) si passerà alle analisi successive:

- Determinazione attività antimicrobica e tossicità cellulare
- Determinazione attività fungina
- Biocompatibilità su cheratinociti/fibroblasti
- Determinazione attività antiossidante
- Determinazione attività antiinfiammatoria
- Determinazione attività riepitelizzante

I dati ottenuti verranno comparati con i derivati del lattosio precedentemente sintetizzati da questo gruppo di ricerca[8].

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] Sekhon, B.S. *J. Pharm. Technol. Res. Manag.* **2013**, *1*, 43–68.

[2] Lei, Z. *et al. Food Chem.* **2015**, *187*, 370–377.

[3] Nobmann, P. *et al. Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *128*, 440–445.

[4] M. Ferrer *et al. Enzyme Microbial Technol. 36* **2005** 391–398.

[5] Molinier V. *et al. Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 3547–3557.

[6] Barros M.T. *et al. Green Chem.* **2011**, 13, 1897.

[7] Molinier V. *et al. Tetrahedron: Asymm.* **2004**, 15, 1753–1762.

[8] a) Lucarini S. *et al. Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, 107, 88–96,
b) Perinelli D.R. *et al. Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, 124, 55–62.

Urbino, 24/05/2019