

**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna**

---

*Dipartimento di Chimica Organica “A. Mangini”*

*Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche*

*Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06*

*XIX ciclo*

***ANTIOSSIDANTI POLIFENOLICI CONTENENTI ZOLFO***

*Dissertazione finale*

*Tesi presentata da:  
Dott.ssa Maria Grazia Fumo*

*Tutore:  
Chiar.mo Prof. Gian Franco Pedulli*

*Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Domenico Spinelli*

## CAPITOLO 1

### LA REAZIONE DI AUTOSSIDAZIONE

#### *1.1 La reazione di autossidazione*

La reazione di autossidazione è una reazione radicalica a catena tra l'ossigeno atmosferico ed i composti organici. Essa avviene a temperature ordinarie e porta inevitabilmente alla formazione di perossidi ed idroperossidi, che possono poi subire una ulteriore degradazione portando alla formazione di prodotti secondari, quali alcoli, aldeidi, chetoni od altri derivati ossigenati (schema 1.1).



#### **Schema 1.1: Prodotti della reazione di autossidazione**

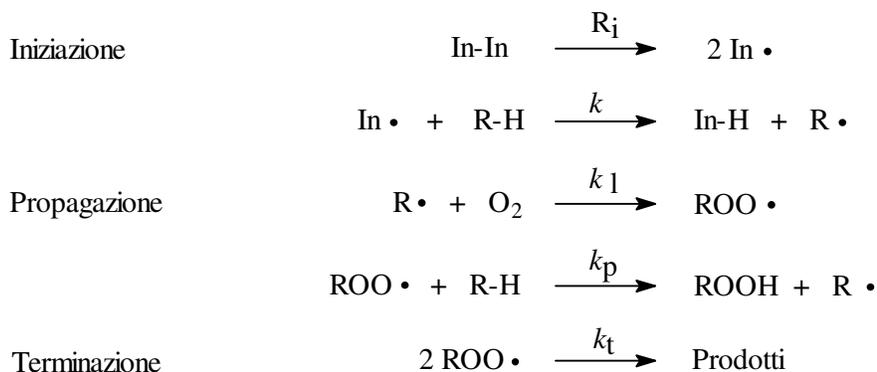
Il bersaglio principale della reazione di autossidazione è costituito dalle molecole di natura lipidica, per le quali questo processo viene definito *perossidazione lipidica*.

Per anni la perossidazione lipidica è stata associata alla chimica degli oli ed al fenomeno di irrancidimento dei grassi, e l'interesse nei confronti dei processi perossidativi è stato confinato principalmente nell'ambito dell'industria e della tecnologia alimentare.

Tuttavia la reazione di autossidazione dei composti organici è di fondamentale importanza per tutti gli organismi che vivono in atmosfera di ossigeno e dipendono per il loro sostentamento da molecole organiche.

## 1.2 Il meccanismo

In presenza di un generico iniziatore radicalico la reazione di autossidazione può essere schematicamente descritta come segue:



Nella prima fase di iniziazione una specie radicalica, prodotta da un adeguato iniziatore alla velocità  $R_i$ , genera il radicale  $R \cdot$ .

Nella fase di propagazione il radicale  $R \cdot$  reagisce con l'ossigeno molecolare per dare il radicale perossile che a sua volta attacca il substrato, generando un nuovo radicale  $R \cdot$  che propaga la catena. Nella terminazione, le specie radicaliche si combinano in varia maniera per dare prodotti non radicalici, interrompendo (terminando) pertanto la catena ossidativa.

Dato che, nello stadio di propagazione, la produzione ciclica di radicali alchilici e perossilici, può coinvolgere centinaia o anche migliaia di unità, la formazione di un radicale iniziatore, che può essere un evento casuale ed anche relativamente poco probabile, porta alla distruzione ossidativa di numerose molecole di substrato.

Gli effetti deleteri della reazione di autossidazione a livello delle membrane biologiche sono ormai ampiamente noti: si formano doppi legami coniugati che modificano l'arrangiamento sterico delle catene dei fosfolipidi, e le stesse molecole di acidi grassi subiscono scissione ossidativa con formazione di

composti ciclici e non. Inoltre, i prodotti di ossidazione degli acidi grassi, costituiti principalmente da perossidi ed idroperossidi, sono di solito composti polari che tendono a migrare verso la superficie del doppio strato lipidico portando ad una riduzione della fluidità di membrana.

Il risultato finale di simili modificazioni è quello di una membrana profondamente alterata, più permeabile e con una ridotta attività biologica delle proteine inserite nel doppio strato lipidico, il che comporta effetti negativi sull'esposizione di antigeni e recettori, nonché sull'attività enzimatica delle proteine di membrana.

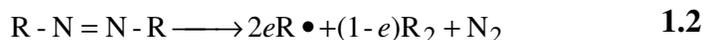
### 1.2.1 Stadio d'iniziazione

La produzione di radicali liberi che danno inizio alla catena ossidativa può avvenire attraverso numerosi meccanismi, tra cui si possono ricordare:

- Decomposizione termica
- Decomposizione fotochimica
- Catalisi metallica

Per studiare il fenomeno dell'autossidazione in sistemi modello sono necessari iniziatori che garantiscano una velocità di produzione di radicali costante nel tempo, buona riproducibilità e facilità d'impiego, evitando così fenomeni di autocatalisi<sup>1</sup>. Il processo che meglio si presta a questo proposito è la termolisi di particolari molecole, quali gli iniziatori radicalici.

I più frequentemente usati sono gli azoderivati alifatici, che generano radicali già a temperatura ambiente, secondo la seguente reazione:



in cui  $e$  rappresenta l'efficienza della reazione, cioè la quantità di radicali che escono dalla gabbia del solvente e innescano l'autossidazione; questo parametro

---

<sup>1</sup> in presenza di autocatalisi la velocità di formazione dei radicali  $R_i$  non è costante, ma aumenta man mano che la reazione procede.

può assumere valori compresi tra 0 e 1 e dipende da diverse variabili, tra cui temperatura e viscosità del solvente;  $R_2$  è il prodotto di ricombinazione dei radicali rimasti all'interno della gabbia (1-e).

In presenza di un azoiniziatore la velocità di formazione dei radicali è data dalla equazione 1.3, in cui  $k_i$  rappresenta la costante di velocità di decomposizione unimolecolare dell'azoderivato.

$$R_i = 2ek_i[\text{RN}=\text{NR}] \quad \mathbf{1.3}$$

Comunemente, per determinare l' $R_i$  si misura la durata del periodo d'inibizione di un antiossidante ( $\tau$ ) di cui sia noto il coefficiente stechiometrico  $n$ . Questi parametri sono legati tra loro dalla seguente relazione (1.4):

$$R_i = \frac{n[\text{AH}]}{\tau} \quad \mathbf{1.4}$$

In questa fase, detta periodo d'induzione, tutti i radicali generati dall'iniziatore vengono intrappolati dall'antiossidante: velocità di produzione dei radicali e periodo d'induzione sono inversamente correlati.

In tabella 1.5 sono rappresentati alcuni degli azoiniziatori più comunemente utilizzati in laboratorio.

**Tabella 1.5 Esempi di azoiniziatori**

AZOINIZIATORE	STRUTTURA	$t_{1/2}$
AIBN Azobis(isobutirronitrile)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CN} \quad \text{CN} \end{array}$	1000 h

<p>AMVN 2,2'-azobis(2, 4- dimetilvaleronitrile)</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \quad \quad \text{CN} \quad \quad \quad \text{CN} \\ \diagdown \quad \quad \quad   \quad \quad \quad   \\ \text{HC}-\text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \diagup \quad \quad \quad   \quad \quad \quad   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	100 h
<p>AAPH 2,2'-azobis(2- amidinopropano) Cloridrato</p>	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad \text{CN} \quad \quad \quad \text{CN} \\ \quad \quad \quad   \quad \quad \quad   \\ \text{HN}=\text{N}-\text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{NH} \\ \quad \quad \quad   \quad \quad \quad   \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	175 h

Dall'equazione di Arrhenius (1.6) è possibile ricavare la costante di decomposizione termica alle varie temperature a cui vengono condotti gli esperimenti:

$$k_d = Ae^{-E_a/RT} \quad \quad \quad \mathbf{1.6}$$

E' consigliabile calcolare l' $R_i$  ad ogni temperatura con il metodo del periodo d'induzione, poiché l'efficienza varia con la temperatura.

### 1.2.2 Stadio di propagazione

In questa fase, i radicali che sono stati prodotti durante l'iniziazione, reagiscono con i substrati presenti nel sistema, propagando la catena. I processi coinvolti sono due:

1. reazione dell'ossigeno molecolare e formazione di un radicale perossile;
2. reazione del perossile con il substrato.

Il radicale  $R\bullet$ , reagendo velocemente con l'ossigeno molecolare, forma un radicale perossile, il quale, a sua volta, reagisce con il substrato, generando un altro radicale alchilico che propaga la catena autossidativa.

In questo modo si ha il consumo di numerose molecole di substrato prima che la reazione venga interrotta dalla terminazione.

Il numero di molecole di substrato RH coinvolte nella reazione viene definito *lunghezza della catena*. Tale valore può essere determinato facilmente dal rapporto tra la velocità di consumo dell'ossigeno e quella di formazione dei radicali  $R_i$ .

$$\text{Catena} = \frac{d[\text{O}_2]/dt}{R_i} \quad 1.7$$

Comunemente, la reazione tra substrato e perossile consiste in un'estrazione di idrogeno, tuttavia, sono possibili altri processi, come ad esempio:

- addizione
- spostamento radicalico
- trasferimento di idrogeno

Il tipo di meccanismo coinvolto dipende dalla natura del substrato.

### 1.2.3 Trasferimento di atomi di idrogeno

Questa reazione avviene solo se lo stadio di transizione è esotermico, perciò è possibile predire se una molecola può subire autossidazione. L'entalpia di reazione può essere facilmente calcolata dalla differenza tra l'energia di dissociazione del legame O-H dell'idroperossido, prodotto della reazione, e quella del legame C-H che viene rotto. La prima non dipende dalla natura del gruppo alchilico e si considera pari a 90 kcal/mole per qualsiasi idroperossido; la seconda, invece, varia a seconda del substrato.

L'analisi dei dati riportati in tabella 1.8 evidenzia che solo i composti aventi un'energia di legame minore o uguale a 90 kcal/mole sono ossidabili e che diminuendo la forza del legame R-H aumenta la facilità di ossidazione.

**Tabella 1.8 Dipendenza del valore di  $k_p$  dalla natura del substrato per la reazione di idrogeno estrazione del radicale t-ButOO•**

GRUPPO R	BDE (R-H)	$\Delta H$ kcal/mole	$k_p$ $M^{-1} s^{-1}$
----------	-----------	-------------------------	--------------------------

	kcal/mole		
CH <sub>3</sub>	104	14	- - -
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	95	5	2.8 e-4
2-tetraidrofurano	89	-1	8.5 e-2
PhCH <sub>2</sub>	88	-2	1.2 e-2
PhCO	86	-4	8.5 e-1
PhC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	84	-6	2.2 e-1
Allile	87	-3	8.4 e-2
Pentadienili	76	-14	>2

N.B: il  $\Delta H$  di reazione è stato calcolato assumendo la BDE del perossido pari a 90 kcal/mole

### 1.2.4 Stadio di terminazione

In questa fase le specie radicaliche si combinano tra loro in vario modo per dare prodotti non radicalici, che, non essendo più in grado di propagare la catena, ne determinano lo spegnimento.

In assenza di inibitori si possono avere tre tipi di reazione: combinazione dei perossili, oppure tra i radicali centrati al carbonio o quella incrociata tra un perossile ed un alchile. Tuttavia, poichè i radicali alchilici reagiscono con l'ossigeno disciolto a controllo diffusionale, la reazione più probabile risulta essere la prima. Il valore della costante di velocità, solitamente, aumenta lungo la serie:



Poiché nessuno di questi valori è maggiore di  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  la reazione non è controllata dalla diffusione: ciò significa che non avviene ad ogni urto tra i radicali.

I perossili terziari presentano una velocità di reazione inferiore a causa del fatto che la decomposizione dell'addotto a quattro atomi di ossigeno non comporta necessariamente la scomparsa dei radicali.

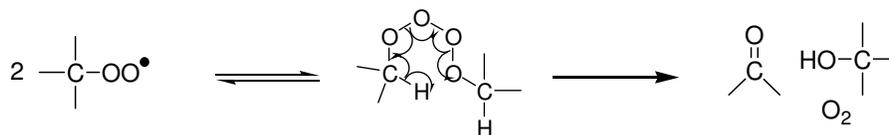


**Figura 1.9 Reazione di formazione e decomposizione del tetrossido**

La figura 1.9 evidenzia come si formi un tetrossido che si decompone fornendo ossigeno e due radicali alcossili. Questi radicali alcossili possono diffondere in soluzione o ricombinarsi per formare un perossido: il loro destino dipende essenzialmente dall'effetto della gabbia del solvente.

Poiché gran parte dei RO• diffonde all'esterno, l'efficienza della terminazione è piuttosto piccola ( $2 k_t \cong 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

Russell ha proposto una spiegazione per la maggior velocità di combinazione dei perossili secondari e primari rispetto ai terziari. La reazione avverrebbe attraverso uno stato di transizione ciclico durante il quale uno degli idrogeni  $\alpha$  viene trasferito per dare come prodotti chetoni, alcoli ed ossigeno molecolare, senza produrre nuove specie reattive (fig.: 1.10).



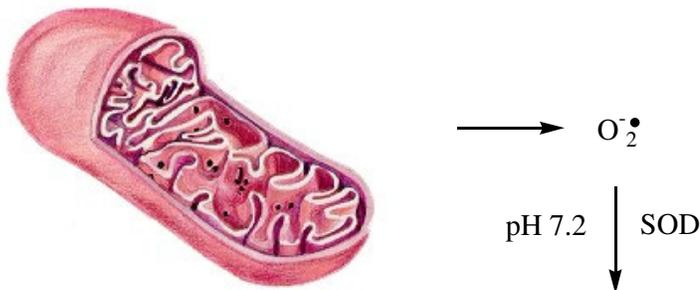
**Figura 1.10: Decomposizione del tetrossido secondo Russell**

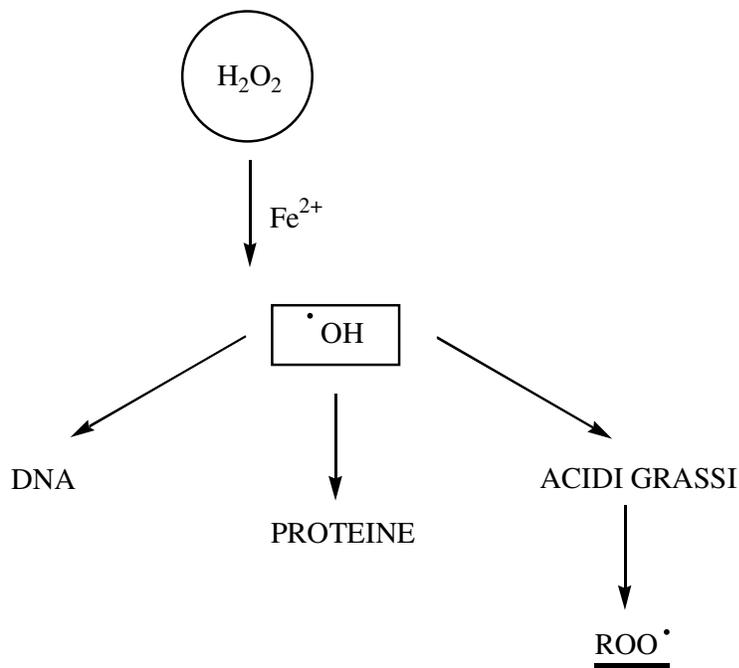
### ***1.3 Perché studiare la perossidazione lipidica***

L'efficacia degli antiossidanti interruttori di catena, in particolare quelli che devono agire negli organismi viventi, dipende da un numero elevato di fattori, non ultimo la loro reattività nei confronti dei radicali perossilici [Burton, G. W; Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 194-201].

L'importanza di tale requisito risiede nella reattività di queste molecole: i radicali non sono tutti ugualmente reattivi nei confronti dello stesso substrato.

Se si considerano il radicale ossidrile  $\text{OH}\cdot$  e il perossile  $\text{ROO}\cdot$  tali differenze risultano evidenti. Il primo, che si forma in seguito alle reazioni della catena respiratoria mitocondriale (fig 1.11), è in grado di reagire a velocità quasi diffusionale con qualsiasi substrato incontri e ha una breve persistenza nell'organismo. E' estremamente reattivo nei confronti delle macromolecole, quali acidi nucleici, lipidi e proteine. In particolare, è l'unico radicale capace di mediare lesioni a carico del DNA. Queste consistono in mutazioni puntiformi generate a seguito dell'estrazione d'idrogeno dalle basi azotate o dai residui zuccherini oppure causate dalla formazione di addotti .





**Fig. 1.11: Reazioni endogene che portano alla formazione dei radicali ossidrilici e perossilici**

Il radicale perossile, invece, è un radicale secondario derivante dal radicale ossidrilico, rispetto al quale ha scarsa reattività e una costante di propagazione molto più bassa. Data la lunga persistenza, permane nell'organismo, diffondendo all'interno delle cellule, finché non trova un adeguato substrato da attaccare. Poiché può reagire quasi esclusivamente con i lipidi di membrana, questi rappresentano il suo target d'elezione. Il tipo di danno causato, la perossidazione lipidica, non si esaurisce con l'attacco del radicale al substrato, ma si propaga attraverso una reazione a catena sostenuta dai perossili.

Alla luce di queste considerazioni, appare chiaro il motivo per cui studiare l'attività antiossidante sui radicali perossili. I radicali ossidrilici sono così reattivi che qualsiasi antiossidante, anche scarso, sarebbe capace di bloccarli. Inoltre, a livello biologico difficilmente un antiossidante, molecola che per definizione si usa a basse concentrazioni, sarebbe in grado di competere con queste reazioni che avvengono a velocità quasi diffusionale. Le uniche difese nei confronti di

questi radicali sono gli antiossidanti di tipo preventivo e i sistemi di riparazione cellulari.

Gli antiossidanti rivestono un ruolo fondamentale, invece, nei confronti della perossidazione lipidica. Questa è sostenuta dai radicali perossilici che, a causa della minor entalpia posseduta dal legame ROO-H (90 kcal/mol) rispetto a HO-H (110 kcal/mol), hanno una reattività decisamente inferiore a OH•. Ciò significa che possono essere intrappolati solo da antiossidanti particolarmente efficaci, caratterizzati da BDE(OH) piccole, che discriminano selettivamente da quelli più scarsi

## ***CAPITOLO 2***

### ***RADICALI LIBERI E ANTIOSSIDANTI***

#### ***2.1 I radicali liberi***

Esistono numerose definizioni del termine radicale libero, come quelle che scaturiscono dal dibattito se sia appropriato o meno utilizzare il termine “libero”, che pare sia superfluo. Solitamente si adotta una semplice definizione: un radicale libero è qualsiasi specie capace di esistenza indipendente (da cui l’aggettivo libero) che contiene uno o più elettroni spaiati.

L’azione distruttiva dei radicali liberi è indirizzata soprattutto verso le cellule, in particolari sui grassi che ne formano le membrane (lipoperossidazione), sugli zuccheri e sui fosfati, sulle proteine, sugli enzimi e sul DNA (acido deossiribonucleico) dove alterano le informazioni genetiche.

In particolare :

- Sul DNA, hanno possibili effetti mutageni, che possono essere causa dello sviluppo di tumori e di danno cellulare [Graham D., **1993**]. Varie ricerche dimostrano infatti, come il DNA estratto da cellule cancerose sia costituito anche da prodotti derivati dall’attacco del radicale OH• (ossidrilico) al DNA [Mallis D.C.; 1993; Olinski R. et al., **1992**];

- Sulle proteine, possono modificarne la struttura e la funzione con conseguente alterazione dell'attività enzimatica [Cestaio B., **1994**; Wiseman H. et al., **1996**; Berliner J.A., et al. **1996**];
- Sui lipidi, le molecole più coinvolte in questi processi per l'alto grado di saturazione, causano perossidazione alterando quindi la struttura e la funzione delle membrane. In particolare lo ione perossinitrile, prodotto dalla reazione tra  $O_2^{\bullet-}$  ed  $NO^{\bullet}$  (radicale ossido nitrico), causa la perossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) [Graham et al., **1993**];
- Sui carboidrati, causano alterazioni a carico dei recettori.

## 2.2 GLI ANTIOSSIDANTI

L'ossigeno è per gli uomini un elemento indispensabile, senza il quale non potrebbero sopravvivere, ma anche un nemico da cui difendersi, tanto che gli organismi aerobi hanno dovuto sviluppare difese antiossidanti per proteggersi dal 21% d'ossigeno che compone l'atmosfera. Esso, infatti, è in grado di generare specie chimiche altamente reattive, i radicali liberi, capaci di danneggiare l'organismo.

I radicali liberi sono specie instabili e altamente reattive, in quanto tendono a sottrarre, dai componenti adiacenti, un elettrone (ossidazione) per raggiungere una configurazione elettronica più stabile. I radicali liberi e le specie altamente reattive e ossidanti, che si generano in vivo, prendono il nome di ROS (*reactive oxygen species*) [Ames B.N., **1995**].

Quando, nell'organismo, si crea uno squilibrio tra produzione dei ROS e difese antiossidanti, a favore dei primi, si crea la condizione di "stress ossidativo". Tale "stress ossidativo" è stato messo in relazione con la genesi di varie patologie [Ames B. N., **1995**; Halliwell B., *et al.*, **1996**; Cestaro B., **1996**; Chen Q., *et al.*,

1999], tra le quali il cancro, l'arteriosclerosi, il diabete, l'artrite, la cataratta, l'invecchiamento, il morbo d'Alzheimer e quello di Parkinson.

Per questo motivo diventa essenziale, per consentire e preservare la vita stessa, la presenza nell'organismo degli antiossidanti. Essi esplicano la loro azione contrastando o impedendo l'ossidazione, prevenendo la formazione dei radicali oppure cedendo a questi, o alle specie reattive dell'ossigeno, un elettrone. In questo modo i radicali vengono stabilizzati e non sono più in grado di provocare danni.

Non va dimenticato il fondamentale compito ricoperto dagli antiossidanti anche in campo tecnologico, farmaceutico e alimentare: tra le numerose applicazioni possiamo citare la stabilizzazione delle materie plastiche, l'impiego nella preservazione degli oli minerali e delle gomme, l'utilizzo quali conservanti in campo alimentare e cosmetico.

## ***2.3 GLI ANTIOSSIDANTI E LORO MECCANISMO D'AZIONE***

### ***2.3.1 Definizione***

Con il termine "antiossidanti" vengono definiti tutti quei composti che sono in grado di contrastare il processo di ossidazione di idrocarburi, polimeri e acidi grassi. La loro azione si può spiegare a due livelli: sia ostacolando il processo di iniziazione della catena ossidativa, sia impedendo la propagazione della catena radicalica che sostiene il fenomeno ossidativo.

## 2.4 Classificazione degli antiossidanti

Gli antiossidanti possono essere classificati in base al loro meccanismo d'azione, la cui diversità è molto evidente nei sistemi biologici, poiché sono presenti sia i così detti antiossidanti preventivi, molecole che impediscono la formazione degli iniziatori radicalici, come gli enzimi, in grado di degradare i possibili iniziatori, sia gli antiossidanti "chain- breaking", cioè interruttori di catena, molecole facilmente ossidabili che intrappolano i radicali presenti nel sistema, propaganti la catena stessa.

### 2.4.1 Antiossidanti "preventivi"

Gli antiossidanti preventivi costituiscono la prima linea di difesa delle cellule perché sono in grado di inibire o contrastare la formazione dei radicali.

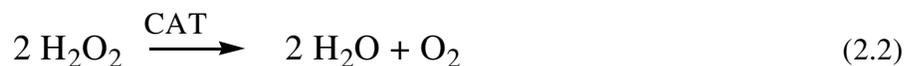
In questa classe possiamo inserire tutti gli enzimi che sono in grado di decomporre i perossidi e gli idroperossidi e pertanto sono considerati "preventivi", in quanto prevengono il fenomeno ossidativo impedendo la fase di "iniziazione".

Alcuni esempi di particolare rilevanza sono i seguenti:

- SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD): catalizza il disproporzionamento del superossido a perossido d'idrogeno.



- CATALASI (CAT): è un enzima che reagisce molto velocemente con il perossido di idrogeno convertendolo ad acqua :



Normalmente l'eccesso del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a basse concentrazioni, viene controllato da un altro antiossidante preventivo, la GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPX), ma quando la concentrazione aumenta, il ruolo della catalasi è fondamentale.



Tra gli antiossidanti preventivi trovano posto anche i composti chelanti.

Infatti è noto che gli ioni metallici, in particolare  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , sono cofattori enzimatici essenziali in molti sistemi ossido-riduttivi. Essi agiscono facilitando il trasferimento elettronico a molecole biologiche e possono quindi catalizzare il processo ossido-riduttivo, determinando così la formazione di specie radicaliche. Un esempio del ruolo degli ioni metallici si ha nella reazione di Fenton, in cui gli ioni ferrosi agiscono da donatori e il perossido d'idrogeno da elettrone-accettore, secondo lo schema seguente:



Quindi utilizzando composti chelanti è possibile ridurre la concentrazione di ioni metallici liberi e di conseguenza è possibile rallentare la formazione di specie radicaliche. Tra gli antiossidanti preventivi ad azione chelante in vivo possiamo annoverare la transferrina e la ferritina, due enzimi in grado di complessare selettivamente il  $\text{Fe}^{2+}$  e il  $\text{Cu}^{2+}$ . E' d'obbligo menzionare anche l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA), il quale forma complessi forti con la maggior parte degli ioni metallici ed è molto utilizzato soprattutto nell'industria alimentare come conservante e l'acido citrico, anche questo utilizzato in campo alimentare. Anche i polifenoli possiedono spesso un'azione preventiva in quanto sono in grado di intrappolare i metalli di transizione ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). A questo gruppo appartengono anche le molecole in grado di decomporre gli idroperossidi, con un

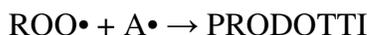
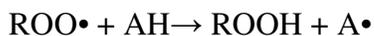
meccanismo non radicalico, molto usate in miscele con altri antiossidanti interruttori di catena, come i fosfiti e i solfuri.

### 2.4.2 Antiossidanti interruttori di catena

Gli antiossidanti "interruttori di catena" si differenziano dai preventivi per il diverso meccanismo d'azione. Essi impediscono uno o più passaggi dello stadio di propagazione, intrappolando i radicali liberi che si formano durante la reazione di ossidazione. Le caratteristiche fondamentali degli antiossidanti chain-breaking sono due: reagire più velocemente con i radicali propagatori di catena rispetto alla velocità di reazione di quest'ultimi con il substrato; dare origine a radicali stabili che non diano a loro volta origine a catene ossidative. Il radicale che a normali concentrazioni di ossigeno viene intercettato dagli antiossidanti è il radicale perossile, ROO•, l'unico effettivamente intrappolabile.

Gli antiossidanti interruttori di catena possono, a loro volta, essere suddivisi in due categorie: quelli che agiscono per *trasferimento d'idrogeno* e quelli che agiscono per *trasferimento elettronico*.

Per quanto riguarda i primi, possiamo rappresentare lo schema di reazione come segue:



#### Schema 2.5

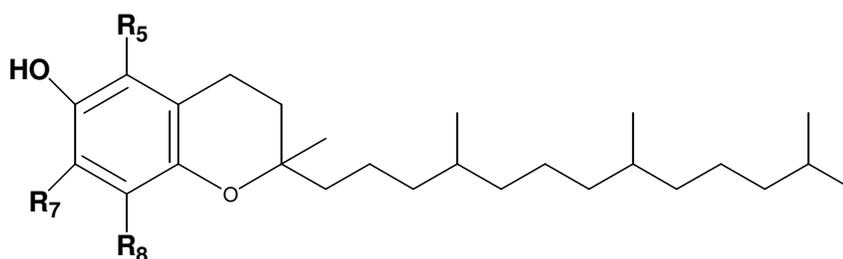
AH è l'antiossidante, A• il radicale che da esso si origina per trasferimento di idrogeno, ROO• il radicale perossile responsabile della propagazione della catena

ossidativa ed ROOH l'idroperossido formato come prodotto di reazione del radicale perossile. Supponendo che l'antiossidante in questione sia un fenolo, seguendo la sequenza di eventi schematizzata in precedenza, si ha l'estrazione dell'atomo di idrogeno fenolico (O-H) da parte del radicale perossile con conseguente formazione dell'idroperossido, mentre il fenolo, perdendo l'idrogeno, si trasforma nel rispettivo radicale fenossile. Questo, se è sufficientemente persistente, potrà ricombinarsi con un'altra unità di perossile ROO• dando origine ad un prodotto non radicalico [Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G.F.; Cabiddu, S.; Fattuoni, C.: *J. Org. Chem.*; **1996**, *61*, 9259; Burton, G.W.; Doba, T.; Gabe, E.J.; Hughes, L.; Lee, F.L.; Prasad, L.; Ingold, K.U.: *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7053-7065].

E' importante notare che in base a questa sequenza di reazioni una molecola di antiossidante riesce ad intrappolare due unità di perossile. Un esempio di questa classe di antiossidanti è l' $\alpha$ -tocoferolo, (vitamina E) il quale fa parte della famiglia dei tocoferoli (schema. 2.6), [[Burton, G. W.; Joyce, A.; Ingold, K.U., *Lancet*; **1982**, *2*, 327; Suarnac, C.; Hood, R.L.; Dean, R.T.; Stocker, R., *Biochim. Biophys. Acta* ;**1993**, *1166*, 163].

Le caratteristiche fondamentali per avere un efficace antiossidante per trasferimento di idrogeno possono essere così riassunte:

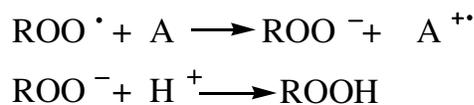
- deve contenere un idrogeno facilmente estraibile per rottura omolitica di un legame X-H;
- deve dare luogo, per reazione con i radicali perossili ad un radicale a lungo tempo di vita, il quale deve, inoltre, non essere reattivo nei confronti dell'ossigeno, né del substrato ossidabile presente, non deve cioè essere in grado di propagare la catena.



<b><math>\alpha</math>-tocoferolo</b>	$R_5 = \text{CH}_3$	$R_7 = \text{CH}_3$	$R_8 = \text{CH}_3$
<b><math>\beta</math>-tocoferolo</b>	$R_5 = \text{CH}_3$	$R_7 = \text{H}$	$R_8 = \text{CH}_3$
<b><math>\gamma</math>-tocoferolo</b>	$R_5 = \text{H}$	$R_7 = \text{CH}_3$	$R_8 = \text{CH}_3$
<b><math>\delta</math>-tocoferolo</b>	$R_5 = \text{H}$	$R_7 = \text{H}$	$R_8 = \text{CH}_3$

**Figura 2.6** Rappresentazione strutturale dei tocoferoli

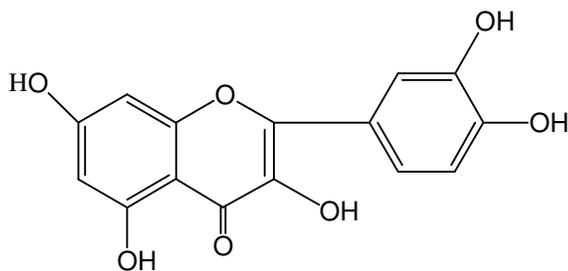
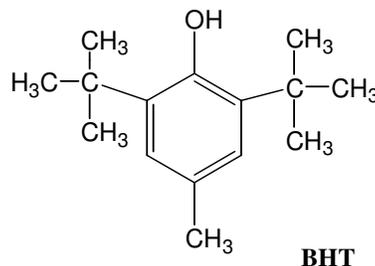
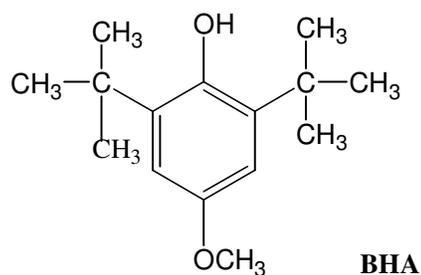
Per quanto riguarda gli antiossidanti che agiscono per *trasferimento elettronico*, si tratta di molecole ricche di elettroni che pur non possedendo idrogeni facilmente trasferibili sono ugualmente in grado di interrompere la catena di autoossidazione. Questi, infatti, agiscono trasferendo un elettrone al radicale perossile per trasformarsi in radicale catione, secondo lo schema seguente:



Si forma quindi un anione perossile e un radicale catione della molecola coinvolta, è il caso del dipiridamolo, per il quale si è trovata evidenza sperimentale che reagisce con i radicali perossili con un meccanismo di trasferimento elettronico ad una velocità fortemente dipendente dal solvente in cui avviene l'autoossidazione. In solventi polari l'attività antiossidante del dipiridamolo aumenta rispetto all'attività in solventi apolari come il benzene, ma la sua attività maggiore si ha in vescicole dove raggiunge quasi quella dell'  $\alpha$ -

tocoferolo [Pedulli, G.F; Lucarini, M.; Marchesi, E.; Paolucci, F.; Soffia, S.; Fiorentini, D.; Landi, L.; *Free Rad. Biol. Med.*, 26, **1999**, 295-302].

Alcuni importanti esempi di antiossidanti interruttori di catena sono i seguenti:



**QUERCETINA**

### 2.5 L' Efficacia di un antiossidante

Per comprendere pienamente le caratteristiche di un antiossidante interruttore di catena e poterne valutare l'efficacia, si ricorre a due parametri fondamentali.

Il primo è la **velocità** con cui l'antiossidante reagisce con il perossile. Essa, a sua volta, dipende dalla BDE del legame OH, che in questo caso funge da

misura della facilità con cui l'antiossidante cede l'idrogeno, e dall'ingombro sterico in posizione *orto* rispetto all'ossidile.

Il secondo parametro, invece, è la **durata d'azione** dell'antiossidante. Essa corrisponde a quel periodo di tempo durante il quale tutti i radicali perossili vengono intrappolati (tempo di induzione,  $\tau$ ) ed è direttamente dipendente dal numero di radicali che ciascuna molecola di antiossidante riesce a catturare (coefficiente stechiometrico,  $n$ ).

### 2.5.1 Considerazioni cinetiche

Per valutare l'efficacia di un antiossidante interruttore di catena particolare importanza riveste l'aspetto cinetico della reazione. Poiché queste molecole agiscono intrappolando un radicale perossile, tale reazione si trova a dover competere con il processo di propagazione della catena ossidativa (reazioni 2.7-2.8).



Affinché ciò si realizzi, è necessario che la costante di velocità  $k_{inh}$  sia molto maggiore della costante di propagazione  $k_p$ , tenendo in considerazione anche il fatto che solitamente l'antiossidante viene impiegato in concentrazioni molto inferiori rispetto a quelle del substrato da proteggere.

Deve, perciò, essere verificato che:

$$[\text{AH}] k_{inh} > [\text{RH}] k_p$$

E', quindi, evidente che ciò che rende tale un buon antiossidante sono le sue caratteristiche cinetiche, cioè la capacità di competere con il perossile per il substrato ossidabile, a sua volta dipendente dalla entalpia di dissociazione del legame O-H, la BDE.

### 2.5.2 Termodinamica della reazione d'inibizione: la BDE dei fenoli

La BDE (Bond Dissociation Enthalpy) del legame OH ricopre un ruolo centrale nella determinazione dell'efficacia di un antiossidante.

Gli antiossidanti fenolici, ad esempio, agiscono bloccando i radicali perossili della catena autossidativa attraverso il trasferimento dell'idrogeno del legame OH, formando così l'idroperossido corrispondente e un radicale fenossile. La BDE del legame ROO-H negli idroperossidi è pari a circa 90 kcal/mole. Un antiossidante interruttore di catena, perciò, per subire l'estrazione d'idrogeno da parte del radicale perossile dovrà avere una BDE del legame A-H, nei fenoli O-H, inferiore a tale valore. Infatti, i fenoli che presentano BDE (OH) più basse sono generalmente migliori antiossidanti.

Poiché nel fenolo non sostituito la BDE del legame OH è pari a 88 kcal/mole, affinché un fenolo presenti buone capacità antiossidanti, sarà necessario introdurre opportuni sostituenti, in modo tale da abbassare l'energia del legame O-H. Gruppi elettron-donatori, specialmente nelle posizioni *orto* e *para* coniugate all'OH fenolico, indeboliscono tale legame e aumentano la quota di trasferimento d'idrogeno al radicale estraente. Questa strategia rappresenta la linea guida più seguita nel disegno razionale di nuovi antiossidanti fenolici. Tuttavia, va sottolineato che buoni sostituenti ED (elettron donatori) non diminuiscono solo la BDE (OH), ma anche il potenziale di ionizzazione del fenolo, rendendolo così reattivo con l'ossigeno e, di conseguenza, instabile all'aria [Valgimigli, L.; Brigati, G.; Pedulli, G. F.; Di Labio G. A.; Mastragostino, M.; Arbizzani, C.; Pratt, D.A. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4997-5010].

I valori di BDE in soluzione per i fenoli riportati in letteratura sono stati ottenuti principalmente con tre metodi:

- ciclo termodinamico , che combina i valori del potenziale di ossidazione del fenolato al valore di  $pK_a$  del fenolo :  
$$\text{BDE (kcal/mol)} = 1.37 pK_a (\text{AH}) + 23.06 E_{\text{ox}} (\text{A}^-) + C$$
 (C è un valore empirico);  
[Bordwell, F.G.; Cheng J. *J. Am. Chem. Soc.*; **1991**, *113*, 1736-1743].
- calorimetria fotoacustica, che misura le onde pressorie prodotte dalla dilatazione del solvente in seguito al calore rilasciato dalla reazione del fenolo con il radicale *terz*-butossile generato in situ per irraggiamento;  
[Laarhoven, L. J. J.; Mulder, P.; Wayner, D. D. *M.Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 342- 349].
- equilibratura EPR, che misura le concentrazioni all'equilibrio dei fenossili che si ottengono irraggiando una miscela di due fenoli, tra cui vi è il fenolo di riferimento, in presenza di un iniziatore radicalico;  
[Lucarini, M.; Pedulli, G.F.; Cipollone, M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5063-5070].

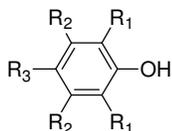
La serie più completa di valori di BDE (OH) di fenoli variamente sostituiti è stata ottenuta nel nostro laboratorio grazie alla equilibratura EPR, principalmente in solventi apolari, come il benzene. Questo risultati sono riportati nella tabella seguente e sono stati ottenuti utilizzando come riferimento il 2,4,6-tri-*ter*-butilfenolo il cui valore di BDE è stato misurato per via calorimetrica da Mahoney [Mahoney, L.R.; Ferris, F.C.; DaRooge, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3883].

Come si evince dalla tabella 2.9, solo i sostituenti in posizione *orto* e *para* rispetto all'ossidrilile modificano la BDE (OH); il contributo dato da ogni

sostituente è circa uguale tra le due posizioni ed è additivo. I contributi dei vari sostituenti sono mostrati in tabella 2.10:

**Tabella 2.9**

Valori di BDE del legame O-H per fenoli variamente sostituiti tratti dai rif.:



Lucarini, M.; Pedulli, G.F.; Cipolline, M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5063-5070.

Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G.F.; Cabiddu, S.; Fattuoni, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9259-9263.

Brigati, G.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G.F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4828-4832.

sostituente	posizione sull'anello				
	2	2 + 6	3	4	4 calc. <sup>a</sup>
Me	-1.75	-3.5	-0.5	-1.7	-2.5
Me <sub>3</sub> C	-1.75	-4.8	-0.5	-1.9	-2.5
MeO	-0.2	-3.9	-0.45	-4.4	-6.1
NH <sub>2</sub>				-8.1	-9.4
RS				-1.8	-
Cl		-0.7		-0.4	-1.4
Ph				-1.6	-
PhCH=CH				-3.9	-
CHO				1.4	2.4
COOH				1.5	2.6
COOMe				1.3	-
CN				1.4	2.2
NO <sub>2</sub>				2.1	4.6

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	BDE (kcal/mol)
H	H	H	88.3
H	H	Me	86.2
H	H	CMe <sub>3</sub>	85.3
H	H	OMe	82.8
Me	H	H	84.5
CMe <sub>3</sub>	H	H	82.8
OMe	H	H	83.2
H	CMe <sub>3</sub>	H	86.6
H	OMe	H	86.7
Me	H	Me	82.7
CMe <sub>3</sub>	H	CMe <sub>3</sub>	81.2 (rif.)
OMe	H	OMe	80.0
CMe <sub>3</sub>	H	Me	81.0
CMe <sub>3</sub>	H	OMe	78.3
Me	H, Me	OMe	79.2
Me	Me	OMe	81.9
CMe <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	84.9
CMe <sub>3</sub>	H	COOH	84.3
CMe <sub>3</sub>	H	COOMe	84.1
CMe <sub>3</sub>	H	CHO	84.2
CMe <sub>3</sub>	H	CN	84.2
CMe <sub>3</sub>	H	Cl	82.4
CMe <sub>3</sub>	H	Ph	81.2
CMe <sub>3</sub>	H	RS	81.0
CMe <sub>3</sub>	H	CH=CHCOOH	80.8 <sup>a</sup>
CMe <sub>3</sub>	H	PhCH=CH	78.9
α-TOH			78.2

**Tabella 2.10**

Contributi additivi sperimentali (kcal/mol), riferiti alla BDE(OH) del fenolo, 87.6 kcal/mol; rif.:

Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G.F.; Cabiddu, S.; Fattuoni, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9259-9263.

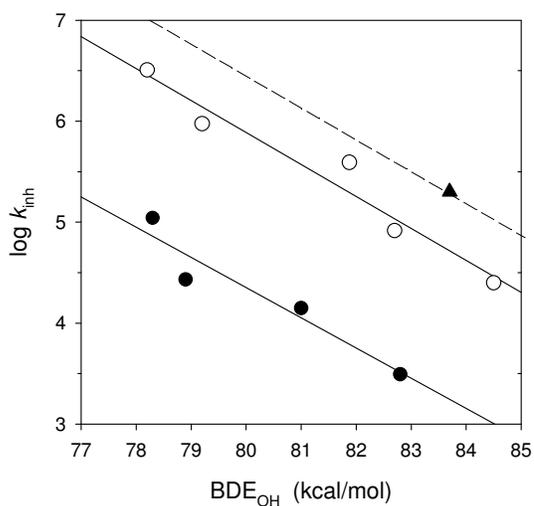
Brigati, G.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G.F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4828-4832.

a) ΔBDE calcolata con metodo DFT tratta dal rif.: Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173-1183.

L'interazione dell' OH fenolico con i sostituenti in orto provoca conseguenze che molto spesso portano a una deviazione dal comportamento atteso. Ad esempio, quando si ha la contemporanea presenza di due sostituenti *ter*-butilici in orto, il loro effetto di diminuzione sulla BDE è maggiore della somma dei loro contributi quando sono presenti singolarmente, -4.8 kcal/mol contro -1.75 kcal/mol. Questo perché la presenza dei due sostituenti così ingombranti provoca una distorsione del gruppo OH, che induce una destabilizzazione del fenolo rispetto al fenossile. Un altro esempio è rappresentato dal sostituente metossilico che, quando presente in *orto*, porta a una diminuzione della BDE di 4.2 kcal/mol, cioè un valore inferiore rispetto a quando si trova in *para*. Il motivo risiede nella formazione di un ponte a idrogeno intramolecolare tra l' OH fenolico e il gruppo metossilico che aumenta la BDE (OH) stabilizzando il fenolo di partenza.

### 2.5.3 Effetti sterici

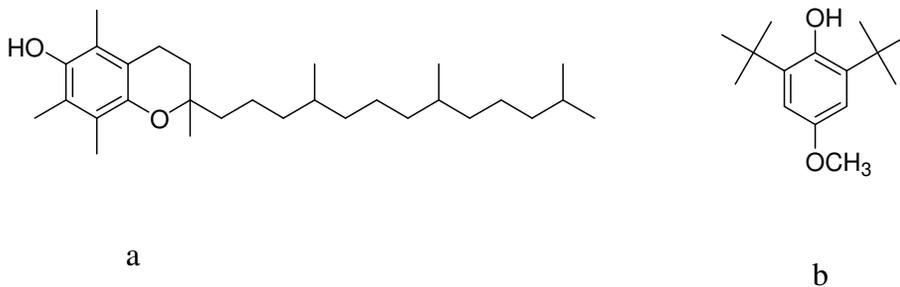
Anche i sostituenti in posizione *orto* all'ossidrile fenolico giocano un ruolo importante nella valutazione dell'efficacia di un antiossidante. A causa del loro ingombro sterico, infatti, controllano l'accesso all'OH fenolico e, di conseguenza, possono ridurre la frequenza degli urti efficaci per la reazione. Ciò si traduce in una forte influenza da parte delle dimensioni dei sostituenti in posizione *orto* sulla velocità di reazione con i radicali perossili. Come è mostrato in figura 2.11, la  $k_{inh}$  dei fenoli 2,6 sostituiti, a parità di BDE (OH), sarà  $H > Me > terz\text{-}But$ .



- (●) 2,6 - di - *terz* - butilfenoli
- (○) 2,6 - di - metilfenoli
- (▲) resveratrolo (senza sostituenti in posizione 2 e 6)

**Figura 2.11: Relazione lineare tra la BDE e il logaritmo della  $k_{inh}$  per la reazione con i radicali perossili di vari fenoli 2, 4, 6 sostituiti**

Un altro esempio molto importante è fornito dal confronto tra l' $\alpha$ -tocoferolo (fig. 2.12, a) e il BHA (fig. 2.12, b).



**Figura 2.12: Struttura degli antiossidanti fenolici  $\alpha$ -tocoferolo (a) e BHA (b)**

L'ingombro sterico in posizione *orto* al gruppo fenolico, dovuto ai due sostituenti *terz*-butilici, fa sì che il BHA, pur possedendo una BDE (O-H) uguale alla vitamina E, sia un antiossidante meno efficace. In solventi organici, come il clorobenzene, la perossidazione lipidica viene solo ritardata dal BHA e la sua  $k_{inh}$  è 30 volte inferiore rispetto al tocoferolo.

Asserire, tuttavia, che l'ingombro sterico sia una caratteristica sempre negativa per gli antiossidanti non è corretto. La presenza di gruppi ingombranti, se da un lato rallenta la reazione di strappo d'idrogeno, dall'altro protegge l'OH dall'interazione con il solvente. Si osserva, quindi, che in soluzione acquosa  $\alpha$ -Tocoferolo e BHA hanno  $k_{inh}$  dello stesso ordine di grandezza (tabella 2.13).

**Tabella 2.13**

Antiossidante	$k_{inh}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	
	clorobenzene	acqua
$\alpha$ -Tocoferolo	$3.6 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
BHA	$1.1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$

#### 2.5.4 Effetto cinetico del solvente (KSE)

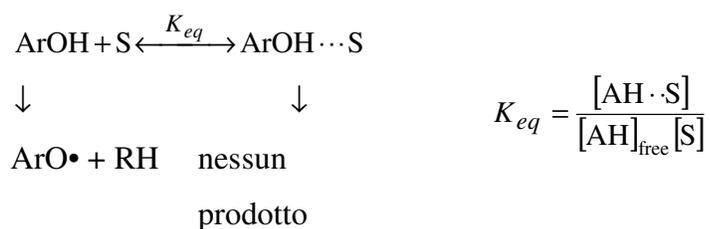
Il ruolo che il solvente riveste nella cinetica delle molecole antiossidanti è estremamente importante: è stato dimostrato che la BDE (OH) dipende non solo dalle caratteristiche dei sostituenti sull'anello aromatico, ma anche dai legami idrogeno che gli OH possono instaurare con gruppi vicini o con il solvente stesso. Per i fenoli, ad esempio, si osserva una evidente diminuzione di reattività in solventi polari.

In questi casi l'effetto complessivo sulla BDE (OH) dipende dalla stabilizzazione preferenziale di uno dei due elementi della coppia fenolo/ radicale fenossile: i

solventi polari accettori di ponti idrogeno stabilizzano il fenolo, facendo così aumentare la BDE (OH).

Nel caso di strappo di un idrogeno appartenente ad un gruppo OH, NH, SH, la complessazione da parte del solvente impedisce che avvenga la reazione, indipendentemente dal radicale estraente (fig. 2.14).

Tale concetto è stato successivamente esteso agli antiossidanti e verificato per la vitamina E [Valgimigli, L.; Banks, J. T.; Ingold, K. U.; Luszyk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9966-9971].



**Figura 2.14: Effetto del solvente nella reazione d'idrogeno estrazione**

Maggiore sarà l'attitudine del gruppo OH a donare e del solvente ad accettare ponti ad idrogeno, maggiore sarà la forza del legame e la sua costante d'equilibrio,  $K_{eq}$ . Tale costante è molto importante, essendo legata alla  $k_{inh}$  in presenza di solvente,  $k_{inh}^S$ , dalla seguente equazione:

$$k_{inh}^S = \frac{k_{inh}^0}{1 + K_{eq} \cdot [\text{S}]} \qquad 2.15$$

Dalla 2.15 si evince che quanto più grande sarà il valore della  $K_{eq}$ , tanto più piccolo sarà il valore della  $k_{inh}^S$  con conseguente diminuzione dell'attività dell'antiossidante.

Per determinare questa costante si può utilizzare la spettroscopia IR, oppure l'equazione 2.16

$$\log K_{eq} = 7.354 \cdot \alpha_2^H \cdot \beta_2^H - 1.094 \quad 2.16$$

I parametri  $\alpha_2^H$  e  $\beta_2^H$ , detti di Abraham, rappresentano una scala assoluta di acidità e basicità, rispettivamente [Abraham, M. H.; Grellier, P. J.; Prior, D. V.; Taft, R. W.; Morris, J. J.; Taylor, P. J.; Laurence, C.; Berthelot, M.; Doherty, R. M.; Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Sraidi, K.; Guiheneuf, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8534].

In tabella 2.17 sono riportati i valori di questi parametri per alcune molecole.

**Tabella 2.17**

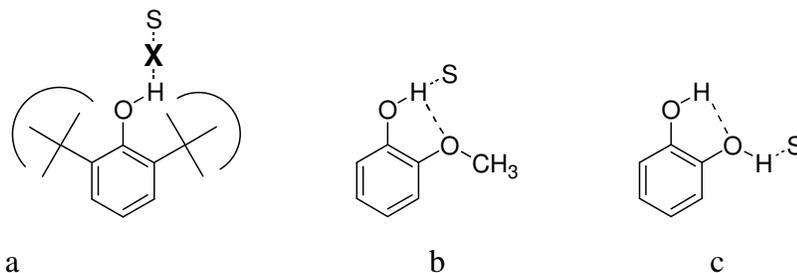
	$\alpha_2^H$	$\beta_2^H$
Catecolo	0.726	-
Fenolo	0.596	0.22
Metanolo	0.41	0.367
Acqua	0.353	0.38
t-Butanolo	0.319	0.49
2-MetossiFenolo	0.26	-
Acetonitrile	-	0.44
Benzene	-	0.14

Discorso a sé stante meritano gli antiossidanti con sostituenti ingombranti in posizione *orto* all'OH, ad esempio i 2,6-di-terz-butilfenoli (fig. 2.18, a). Questi

non sono soggetti a diminuzione di reattività perché il loro stesso ingombro sterico rende difficile una interazione significativa con il solvente, come nell'esempio del BHA precedentemente riportato. Tali molecole sono caratterizzate da valori di  $\alpha_2^H$  molto piccoli.

Anche gli orto metossifenoli (fig. 2.18, b) non risentono dell'interazione con il solvente HBA, in quanto l'OH fenolico è già impegnato in un ponte a idrogeno intramolecolare [de Heer, M. I.; Mulder, P.; Korth, H. G.; Ingold, K. U.; Luszytk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2355].

Al contrario, i catecoli (fig. 2.18, c), che presentano due gruppi OH su atomi di carbonio adiacenti, a causa della loro elevata acidità, subiscono una notevole diminuzione di reattività se usati in solventi polari [Barclay, L. R. C.; Edwards, C. E.; Vinqvist, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6226-6231].



**Figura 2.18** Differenti interazioni con il solvente da parte di un fenolo con ingombro sterico in *orto* (a), di un *o*-metossifenolo (b) e di un catecolo (c)

Per quanto riguarda la vitamina E, il più potente inibitore naturale della perossidazione lipidica, in solvente organico la sua  $k_{inh}$  è maggiore di qualsiasi altro antiossidante biologico liposolubile [Bowry, V. W.; Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 27-34].

Tuttavia, in solventi polari, la reazione in cui i radicali perossili vengono intrappolati dall'antiossidante è molto più lenta: la  $k_{inh}$  in etanolo dell' $\alpha$ -TOH è cinquanta volte più bassa rispetto a quando la reazione è condotta in cicloesano

[Niki, E.; Saito, M.; Kawakami, A.; Kamiya, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *107*, 7053-7065].

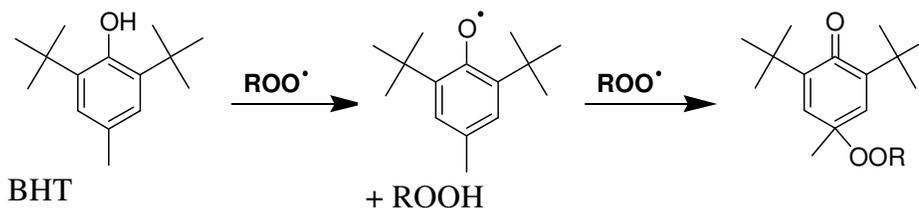
E' stato detto in precedenza che nella reazione di estrazione d'idrogeno la più lenta inibizione osservata in solventi polari è dovuta al legame idrogeno del substrato con solventi accettori di legami a idrogeno (HBA). Perciò, la reattività della vitamina E in un solvente HBA, dipende dalla frazione che non si è legata al solvente [MacFaul, P. A.; Ingold, K. U.; Luszyk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*]. L'effetto del solvente dipende esclusivamente dall'interazione substrato solvente ed è indipendente dalla reattività del radicale coinvolto [Valgimigli, L.; Banks, J. T.; Ingold, K. U.; Luszyk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9966-9971; Valgimigli, L.; Ingold, K. U.; Luszyk, J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7947-7950].

### 2.5.5 Numero di radicali intrappolati

Il secondo parametro necessario per descrivere in maniera adeguata un antiossidante è il numero di radicali che esso intrappola, direttamente correlato alla durata d'azione dell'antiossidante. Tale valore è, solitamente, uguale a 2 per gli antiossidanti fenolici, secondo la reazione 2.19.

Molecole che possiedono più nuclei fenolici, come alcuni flavonoidi naturali, possono intrappolare più di due radicali per molecola. Il numero di radicali intrappolati è detto "coefficiente stechiometrico" ed indicato con *n*.

#### Reazione 2.19:



## 2.6 Un esempio di antiossidanti con $n < 2$ : gli idrochinoni

Queste molecole, come evidenziato dalla loro stessa struttura (fig 2.20), possiedono tutte le caratteristiche necessarie per essere eccellenti antiossidanti: la  $k_{inh}$  della reazione con i radicali perossilici è molto elevata ( $>5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

Nonostante ciò, è stato verificato che, se utilizzati da soli, gli idrochinoni hanno una scarsa capacità d'inibire la perossidazione, a dispetto di quanto ci si dovrebbe aspettare. Questa bassa efficacia, che si riflette in un periodo d'induzione molto più breve di quello del tocoferolo nelle stesse condizioni, ha una spiegazione molto interessante [Roginsky, V.; Barsukova, T.; Loshadkin, D.; Pliss, E. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, 125, 49-58].

Il radicale semichinone si autossida: reagisce con l'ossigeno e non con una seconda molecola di radicale, formando il radicale idroperossile ( $\text{HOO}\bullet$ ), che a sua volta propaga la catena (fig. 2.21).

Si tratta della stessa reazione che *in vivo*, a livello metabolico, porta alla produzione del radicale superossido, specie particolarmente reattiva, responsabile dello stress ossidativo cellulare.

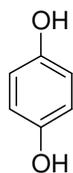


Figura 2.20

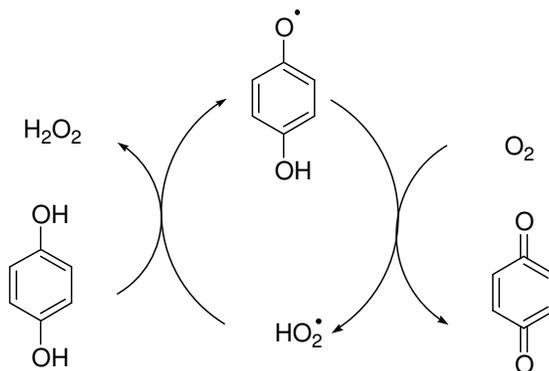


Figura 2.21: Schema della reazione di autossidazione degli idrochinoni

## ***2.7 L'importanza dei polifenoli naturali***

Il sempre crescente interesse per i polifenoli di origine naturale risiede nella necessità di trovare un modo per ovviare al problema dell'uso di additivi sintetici, soprattutto in campo alimentare, e quindi avere a disposizione dei composti di origine naturale risulta un obiettivo tra i più desiderati e sperati. Ovviamente il campo di interesse spazia da quello alimentare, per la corretta conservazione dei cibi, a quello cosmetico, al problema dell'ossidazione degli oli minerali, delle plastiche, delle gomme, al campo biologico, dove riveste primaria importanza il mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari. I polifenoli sono saliti alla ribalta in quanto, in questi ultimi anni, osservazioni e studi scientifici, hanno correlato il loro uso a una diminuita insorgenza di malattie cardiovascolari e degenerative. Parallelamente quindi al crescente interesse da parte dei consumatori si sono moltiplicate le pubblicazioni scientifiche in merito all'argomento

Sempre di più, anche dal punto di vista delle normative, si tende a rispondere all'esigenza crescente dei consumatori e all'esigenza molto concreta di dover utilizzare queste sostanze in campo industriale. Ad esempio, per quanto riguarda il campo alimentare, per il D.M 209 del 27.02.96 le sostanze antiossidanti sono più propriamente quelle che “prolungano il periodo di conservazione dei prodotti alimentari proteggendoli dal deterioramento provocato dall'ossidazione, come l'irrancidimento dei grassi e variazioni di colore”.

La reazione dell'ossigeno atmosferico con alcuni costituenti degli alimenti, specialmente i gliceridi di acidi grassi insaturi, è causa primaria di fenomeni di degradazione ossidativa che possono rendere un prodotto, in tempi più o meno brevi, non idoneo al consumo umano. I fenomeni degradativi influenzano negativamente sia le caratteristiche organolettiche (es. la comparsa di odori e sapori di “rancido”, alterazioni del colore dovute ad imbrunimento enzimatico e/o sviluppo di microrganismi, ecc.) sia quelle nutrizionali (es. degradazione di vitamine liposolubili).

In tabella 2.22 sono citati alcuni dei principali fattori di rallentamento e/o controllo della reazione di ossidazione:

Fasi della reazione	Fattori di controllo
Inizio	Antiossidanti naturali Superossido dismutasi Flavonoidi Composti fenolici Complessanti Glucosio ossidasi/catalasi
Propagazione	Concentrazione di ossigeno Antiossidanti interruttori di catena
Terminazione	Antiossidanti naturali Antiossidanti di sintesi Isomerasi Alcool deidrogenasi

**Tabella 2.22**

La bibliografia riporta esempi numerosi di esperienze atte ad evidenziare l'attività antiossidante di spezie, semi oleosi ed altri vegetali: basti ricordare l'acido caffeico, di terpeni, l'acido rosmarinico, i flavonoidi, le catechine, ecc.

Per il corretto mantenimento degli alimenti, non solo si utilizzano sostanze atte, appunto ad evitare il loro deterioramento, ma si parla anche di *antiossidanti non convenzionali* quando ci si riferisce all'adozione di quei trattamenti tecnologici che sono in grado di controllare le reazioni di ossidazione: confezionamento in atmosfera modificata, trattamenti termici per inibire l'attività enzimatica,

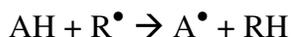
compressione dei prodotti disidratati e/o liofilizzati per ridurre la superficie a contatto con l'aria, ecc. Cerutti in "Il rischio alimentare" (Tecniche Nuove, 1993) distingue nettamente fra antiossidanti, sostanze antiossidanti provviste anche di altre funzioni e sinergismi degli antiossidanti. Le sostanze ad azione antiossidante, nella normativa vigente, risultano invece incluse in una categoria unica comprendente i conservanti: si distinguono (allegato XI del D.M. 209) in Parte A (sorbati, benzoati e p-idrossibenzoati), Parte B (anidride solforosa e solfiti), Parte C (altri conservanti), Parte D (altri antiossidanti).

È sempre maggiore la convinzione che in ambito biologico l'attività antiossidante sia attribuibile non all'attività a sé di una sostanza ma ad un insieme di "sistemi complessi" e l'attività di ricerca viene spinta oggi verso l'identificazione di tutta una serie di sostanze che assumono l'identità di "cofattori" nei fenomeni di blocco/ritardo dei processi di ossidazione.

## CAPITOLO 3

### ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE: COME MISURARLA?

La determinazione in vitro dell'attività antiossidante di un composto sfrutta la rapida e irreversibile reazione di queste sostanze con i radicali liberi, come mostrato in equazione 3.1, in cui  $R^\bullet$  è un generico radicale che viene scelto sia in base alla facilità con cui può essere generato e studiato, sia alla rilevanza che esso ha nei sistemi biologici reali. Nel nostro laboratorio studiamo i radicali perossili, che rappresentano un buon compromesso tra queste due caratteristiche.

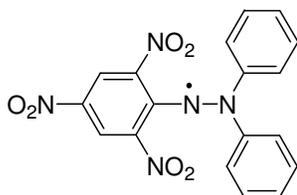


#### Equazione 3.1

Spesso è difficile trovare delle molecole che soddisfino queste caratteristiche contemporaneamente, in quanto le specie radicaliche coinvolte nei processi di danno ossidativo in vivo e in vitro sono quelle che si prestano peggio ad analisi routinarie.

I metodi più comunemente usati per i test di attività antiossidante in vitro sono basati sul decadimento di radicali stabili di sintesi che assorbono intensamente nell'UV-visibile:

#### 3.1 Test del $DPPH^\bullet$



**DPPH**

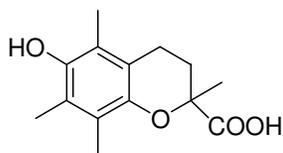
Nel 1958, Blois osservò per primo che il radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile ( $DPPH^\bullet$ )

in soluzione di etanolo si decolorava da violetto a giallo e poteva rappresentare un metodo vantaggioso per misurare la concentrazione totale di antiossidanti nei materiali biologici. Questo radicale è intensamente colorato ( $\lambda_{\text{max}} = 512\text{-}530$  nm) a causa della presenza del gruppo picrico (1,3,5-nitrobenzene) ed è stabilizzato sia dall'ingombro sterico dei sostituenti aromatici sia dalla delocalizzazione della carica del radicale su di essi. Quindi la scomparsa di questo radicale può essere valutata per via spettrofotometrica, in corrispondenza del suo massimo di assorbimento (516 nm). Questo metodo viene comunemente usato per i saggi su cibi ed estratti vegetali a causa della sua facilità e rapidità. Purtroppo però il DPPH• reagisce con gli antiossidanti molto più lentamente dei radicali perossili ROO• (circa 1000 volte).

I metodi riportati in letteratura sono suddivisi principalmente in due classi: quelli *cinetici* e quelli di *titolazione*.

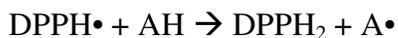
Nei primi, meno usati, si osserva la velocità di decadimento di pseudo-prim'ordine del DPPH• in seguito all'aggiunta di una quantità in eccesso di antiossidante. La costante cinetica ottenuta ( $k_{inh}$ ) dipende dalla struttura dell'antiossidante, dalla BDE del legame OH e può essere confrontata con la  $k_{in}$  per la reazione con i radicali perossili.

I metodi di titolazione invece sono molto più diffusi e consistono nell'incubare il DPPH• e l'antiossidante per un tempo sufficiente a che l'assorbimento UV rimanga costante (circa 30 minuti), la quantità di antiossidante che rimane è indice dell'attività antiossidante. Questo metodo di "titolazione" però non consente di ottenere le relazioni struttura-attività essendo dipendente solo grossolanamente dalla struttura dell'antiossidante, inoltre non viene considerata la velocità con cui avviene la decolorazione del radicale, ma solo quando avviene. I valori ottenuti vengono riferiti al Trolox, un analogo sintetico idrosolubile dell'  $\alpha$ -tocoferolo (fig.: 3.2)

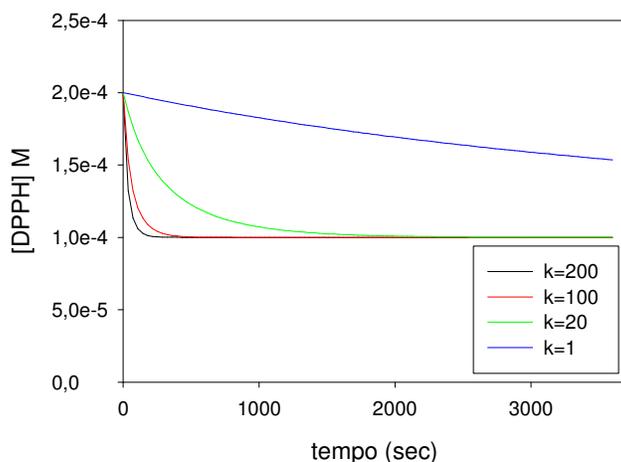


**Figura 3.2: Formula di struttura dell' $\alpha$ -tocoferolo**

Questa è la reazione a cui dà luogo il radicale DPPH• :



Di seguito è riportato un esempio di titolazione di quattro antiossidanti:



**Figura 3.3: Esempio di metodo di titolazione**

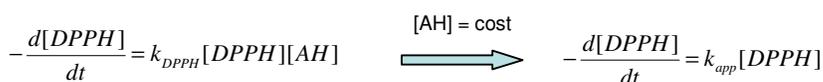
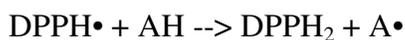
Misurando la velocità di scomparsa di quattro antiossidanti diversi, aventi una costante cinetica di 1, 20, 100 e 200  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  si osserva che, dopo mezz'ora, tre degli antiossidanti hanno reagito con la stessa quantità di DPPH•, nonostante le velocità di reazione siano molto diverse tra loro.

Questo metodo misura solo il parametro  $n$ , cioè la durata d'azione dell'antiossidante, che per i fenoli, la classe principale di antiossidanti interruttori

di catena, è uguale a 2. Per l'antiossidante con  $k = 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , questo metodo fornisce un risultato senza un reale significato chimico, in quanto alla fine della mezz'ora la reazione non è ancora terminata.

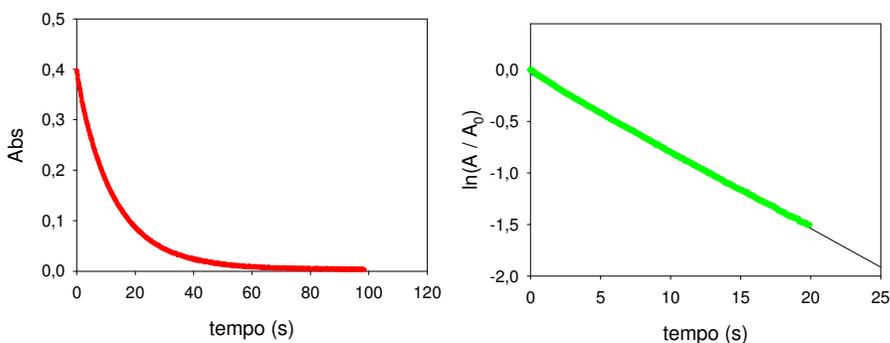
Molto più significativi sono i metodi che utilizzano il DPPH• misurandone la costante cinetica per la sua reazione con l'antiossidante.

In questo caso si studia il decadimento di pseudo prim'ordine del DPPH• in presenza di un eccesso di antiossidante.



Cinetica del 2° ordine

Cinetica di pseudo 1° ordine



**Figura 3.4: Esempio di un metodo di tipo cinetico: il decadimento del *para*-metossifenolo  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$**

L'uso del DPPH• rappresenta un rapido e facile metodo per valutare le attività anti-radicaliche di diversi antiossidanti, ma nell'interpretazione dei dati devono essere prese in considerazione alcune precauzioni. È evidente che l'interazione di un potenziale antiossidante con il DPPH dipende dalla sua struttura. Alcuni composti reagiscono molto rapidamente con il DPPH riducendone un numero di molecole corrispondente al numero di ossidrilici disponibili. Molto spesso però i meccanismi di reazione sono molto più complessi. Per comprendere meglio il meccanismo che coinvolge il DPPH• e gli

antiossidanti sarebbe utile e interessante caratterizzare gli intermedi di reazione e i prodotti della reazione. Per fare questo sarebbe necessario separare questi composti mediante cromatografia e identificarli. L'ideale sarebbe costruire un modello cinetico plausibile e determinare l'ordine delle differenti reazioni e le loro costanti (Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity; Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset).

Sarebbe desiderabile stabilire un metodo per misurare il livello di attività antiossidante totale direttamente sul campione, come un estratto vegetale, ad esempio.

A tal fine in questi ultimi anni sono stati sviluppati molti metodi per misurare "l'attività antiossidante totale", "la capacità antiossidante totale" o "il potenziale antiossidante totale". Tra di essi i saggi più rappresentativi sono il *TEAC* (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), il *TRAP* (Total Radical Absorption Potentials), il *FRAP* (Ferric Reducing /Antioxidant Power) e l' *ORAC* (Oxygen Radical Absorption Capacity).

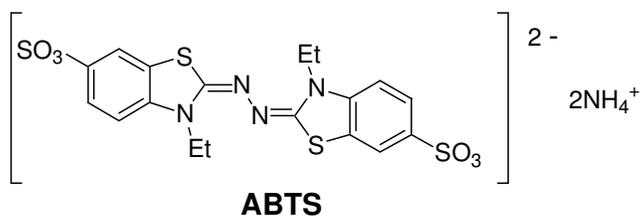
Da un punto di vista del meccanismo, questi metodi sono basati o su una reazione di trasferimento elettronico (SET) o una reazione di trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT) tra un ossidante e un radicale libero. Per i metodi basati sul meccanismo SET (eq. 3.5, M = ione metallico), come il FRAP e il TEAC, gli antiossidanti sono ossidati dagli agenti ossidanti, come il Fe (III) o l' ABTS<sup>+</sup>. Come risultato, un singolo elettrone è trasferito dalla molecola antiossidante all' ossidante. Il cambio di assorbanza dell'antiossidante o dell'ossidante è misurato da uno spettrometro UV-visibile e il valore di assorbanza è usato come misura quantitativa della capacità riducente di un antiossidante.



I metodi basati sul meccanismo HAT (eq. 3.6 e 3.7, FL = sonda fluorescente) come l'ORAC e il TRAP, utilizzano un radicale iniziatore per generare un radicale perossile ROO<sup>•</sup>. Quest'ultimo strappa un atomo di H dalla molecola di antiossidante. Come risultato, la reazione tra il ROO<sup>•</sup> e la molecola bersaglio (la sonda) è ritardata o inibita. Poiché questi distinti metodi chimici sono basati su differenti meccanismi di reazione, è necessario sempre valutare se questi approcci diversi possano fornire dei valori di attività antiossidante paragonabili per lo stesso campione. Dallo studio comparativo di un lavoro di Boxinou e colleghi, apparso sul *J. Agric. Food Chem* del 2002, su una serie numerosa di campioni (927 comuni vegetali) analizzati con due diverse procedure, ORAC e FRAP, si evidenzia come i risultati ottenuti non abbiano una buona correlazione tra di loro. Questa discrepanza sembrerebbe dovuta proprio al diverso meccanismo alla base dei due metodi.

### 3.2 Test di decadimento dell' ABTS<sup>+•</sup>

Il test della decolorazione dell' ABTS<sup>+•</sup>, un radicale catione stabile, è un altro metodo ampiamente usato per la valutazione dell'attività antiossidante di vari composti, riportato per la prima volta da Miller [Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.; Gopinathan, V.; Milner, A. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407]. Esso è basato sul decadimento dell' ABTS<sup>+•</sup> caratterizzato da un intenso assorbimento a circa 700 nm, questo radicale catione viene generato in situ per reazione della molecola neutra con un sistema ossidante, come il potassio persolfato o la miscela met-mioglobina ed acqua ossigenata ed è un metodo applicabile sia a



composti idrofili che lipofili.

Dopo l'aggiunta dell'antiossidante si aspetta che la reazione finisca, misurando la diminuzione

dell'assorbimento del cromoforo all'ultravioletto. Il risultato viene espresso in relazione a una uguale quantità di Trolox, da cui il nome di TEAC (Equivalent Antioxidant Capacity). Esiste in commercio un kit per la rapida realizzazione di questo metodo, con il nome di Randox<sup>®</sup>.

L'unico reale vantaggio di questo metodo consiste nel fatto che esso è applicabile alle molecole idrofile, quindi adatto a misure in ambiente acquoso e quindi all'analisi di campioni come liquidi biologici e bevande. Gli svantaggi però sono alquanto "importanti": se usato mediante il metodo di titolazione, i risultati dipendono marginalmente dalla velocità di reazione con i radicali, inoltre l'ABTS è un radicale catione con una reattività e struttura notevolmente differente dai radicali che si formano in situazioni fisiologiche, come i perossili ROO<sup>•</sup>. Può fornire quindi risultati che poco o niente rispecchiano la realtà.

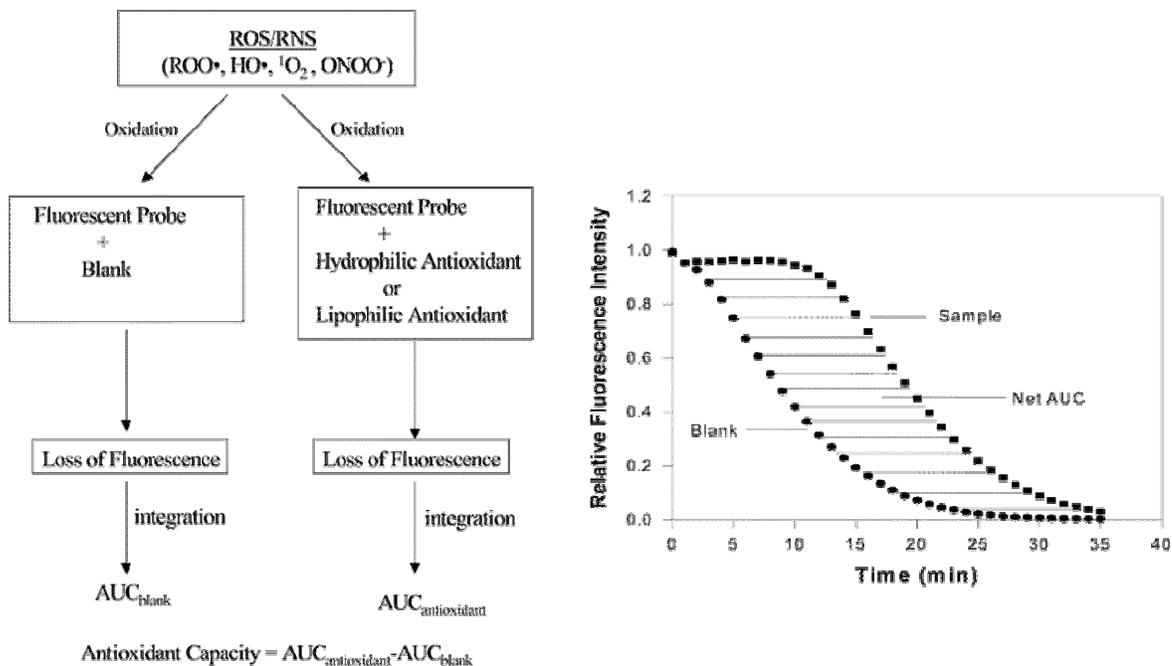
*L'altro gruppo di metodi* si basa sulla capacità degli antiossidanti di bloccare l'ossidazione di un opportuno substrato da parte dei radicali perossili, generati tramite la decomposizione termica di un azoiniziatore idrosolubile, solitamente l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) cloridrato). Sono metodi contraddistinti dalla sigla TRAP (Total Radical Trapping Parameter) ed esprimono i risultati in relazione all'attività antiossidante del Trolox.

Ogni substrato che viene ossidato, a seconda del quale poi dipende il tipo e il nome della tecnica, deve possedere una caratteristica che lo renda rivelabile all'UV o sia fluorescente. I substrati più utilizzati sono il luminolo, che in seguito alla sua ossidazione emette luce, la diclorofluoresceina (DCFH-DA) che viene trasformata in diclorofluoresceina altamente fluorescente, e la ficoeritrina (PE), una proteina che in seguito all'attacco dei radicali perossili perde la sua naturale fluorescenza. Quest'ultima viene utilizzata nel saggio ORAC, spiegato di seguito.

### **3.3 SAGGIO ORAC (*Oxygen Radicals Absorbance Capacity*)**

Attualmente questo è il saggio maggiormente utilizzato per determinare l'attività antiossidante totale di sostanze naturali, estratti vegetali ed alimenti. Il meccanismo d'azione consiste nella perdita di fluorescenza di un idoneo substrato quando viene attaccato dai radicali perossili prodotti dalla decomposizione di un azoiniziatore, di solito il 2,2'-azobis(2-amidinopropano) diidrocloreuro, AAPH, a 37°C. Come sonde si usano la ficoeritrina (PE), una proteina isolata da *Porphyridium Cruentum* e la diclorofluoresceina, la sonda più comunemente utilizzata oggi. La perdita di fluorescenza della sonda è indice dell'estensione del danno dovuto alla sua reazione con i radicali perossili. In presenza di un antiossidante, la diminuzione di fluorescenza è inibita per un certo periodo di tempo. L'effetto protettivo di un antiossidante è misurato considerando l'area sotto la curva di decadimento della fluorescenza (AUC) del campione paragonata a quella del bianco in cui l'antiossidante non è presente. Nel caso della ficoeritrina essa possedeva alcuni limiti: una certa diversa intensità di fluorescenza e reattività verso i radicali perossili che si traduceva in una non riproducibilità da misura a misura. Inoltre questa proteina non è fotostabile, quindi dopo un certo tempo di esposizione alla luce di eccitazione, risultava fotodistrutta. Prior e i suoi collaboratori osservarono poi che la ficoeritrina interagisce con i polifenoli attraverso un legame non-specifico. Tutti questi svantaggi lo portarono quindi ad esaminare un altro tipo di sonda.

A causa della mancanza di un vero substrato ossidabile, questo metodo permette di misurare solo il tempo di inibizione e non la velocità con cui avviene la reazione tra i perossili e il substrato.



**Figura 3.8: Schema del principio di funzionamento del saggio ORAC**

(Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe; Boxinou, Maureen Hampsch-Woodill, and Ronald L. Prior *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619-4626)

Il Dipartimento Americano dell'Agricoltura ha quantificato la capacità dei vari alimenti di assorbire i radicali liberi. Sono state quindi definite le cosiddette unità ORAC che indicano il contenuto di antiossidanti nei diversi tipi di frutta e verdura. È stato stabilito che per contrastare efficacemente l'attività dei radicali liberi occorre ingerire circa 5.000 unità ORAC al giorno pari a circa cinque porzioni di frutta e verdura.

**Scheda Punti ORAC**

<b>Valgono ORAC</b>	<b>1.000 punti</b>	Mezza coppetta di mirtilli, 1 coppetta di fragole, mezza coppetta di more, 3 prugne, 1 arancia, 150 g di spinaci, di cavoli, di barbabietole.
<b>Valgono ORAC</b>	<b>500 punti</b>	Mezzo bicchiere di succo d'arancia, di pompelmo, di mela e di pomodoro, 700 g di ciliegie, 1 grappolino d'uva, 1 kiwi, 1 peperone, 1 patata, 150 g di funghi, 1 cipolla.
<b>Valgono ORAC</b>	<b>200 punti</b>	1 pera, 1 banana, 1 pesca, 1 mela, 1 fetta d'anguria, 3 fette di melone, 3 albicocche, 100 g di carote, 2 zucchine, 1 porzione d'insalata, 1 cetriolo, 1 gambo di sedano, 150 g di broccoli, 1 pomodoro.

Il metodo ORAC è abbastanza discutibile in quanto esso indica la quantità di radicali intrappolati, non la velocità cui il processo avviene, ed è proprio questo il parametro fondamentale che deve risultare elevato perché un antiossidante sia efficace. Tutto questo non viene misurato attraverso il saggio ORAC. È ovvio che frutta e verdura possiedano attività antiossidante, in quanto i fenoli, in essi contenuti, hanno un'elevata attività antiossidante, quindi è normale che un vegetale abbia punti ORAC. Inoltre il metodo di conservazione e preparazione gioca un ruolo importante, specialmente per derivati della frutta e si sa ancora poco sull'assorbimento dei fenoli da parte dell'uomo.

### ***3.4 Metodi di Perossidazione lipidica***

Questi metodi sfruttano la capacità degli antiossidanti di intrappolare i radicali che propagano la catena ossidativa della perossidazione lipidica. I radicali possono essere generati dalla reazione di Fenton tra ioni  $\text{Cu}^{++}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  o, per ottenere una reazione a velocità controllata, dalla decomposizione termica di un

opportuno azoiniziatore, scelti in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche. Il substrato è costituito da acidi grassi polinsaturi (ac. Linoleico) o da loro esteri, da fosfolipidi o da idrocarburi insaturi (stirene, cumene). Se gli esperimenti sono condotti in ambiente acquoso si utilizzano micelle e liposomi per l'inclusione della soluzione. Si utilizzano anche LDL umane (Low Density Lipoprotein), particolarmente interessanti in quanto implicate nella patogenesi della aterosclerosi. Il decorso della reazione viene seguito monitorando il cambiamento della concentrazione delle specie coinvolte; l'ossigeno, nel caso si utilizzi un apparato che ne misura il consumo nel tempo (in uso nel nostro laboratorio) [Amorati, R.; Pedulli, G.F.; Valgimigli, L.; Attanasi, O.A.; Filippone, P.; Fiorucci, C.; Saladino, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2142-2146], in caso di soluzioni acquose si usa un elettrodo di Clark; la formazione di dieni coniugati, misurati tramite HPLC-UV o la formazione di perossidi, messi in evidenza con saggi enzimatici (glutazione per ossidasi/glutazione redattasi). Utilizzando substrati di cui siano note le costanti cinetiche è possibile ricavare la costante cinetica di inibizione  $k_{inh}$ , come di seguito riportato e spiegato.

### 3.4.1 Misura dell'attività antiossidante mediante trasduttore di pressione

Per misurare quindi l'attività antiossidante attraverso lo studio della perossidazione lipidica sono disponibili diverse tecniche, che, per comodità, possono essere suddivise in:

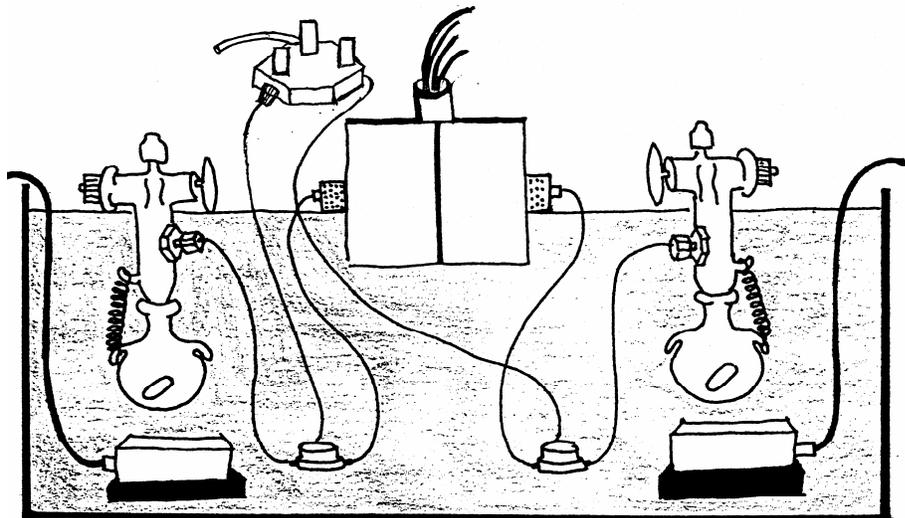
- *Metodi per la determinazione di prodotti di ossidazione:*
  1. ossidoriduzione degli idroperossidi con lo ione ioduro;
  2. determinazione spettrofotometrica di dieni coniugati;
  3. reazione dei prodotti di frammentazione ossidativa di acidi grassi aventi almeno tre insaturazioni (es. malondialdeide) con l'acido tiobarbiturico (TBA).
- *Metodi di valutazione della scomparsa del substrato;*

- *Determinazione del consumo di ossigeno.*

Nel nostro gruppo di ricerca il metodo utilizzato si basa sulla variazione del consumo d'ossigeno in un sistema chiuso e prevede l'impiego di un elettrodo a ossigeno di tipo Clark, che lavora in ambiente acquoso, o di un trasduttore di pressione differenziale che lavora in ambiente organico. Quest'ultimo strumento è stato costruito nel nostro laboratorio, poiché non è presente in commercio.

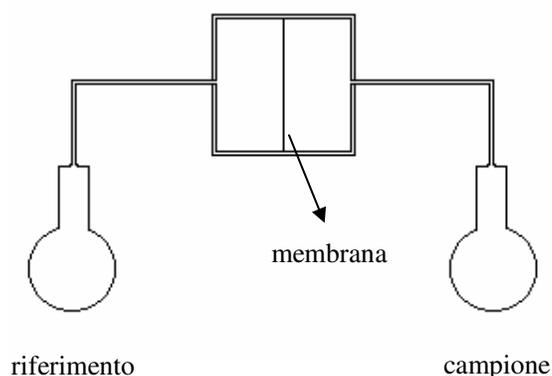
### *3.5 Trasduttore di pressione*

L'apparato per la misura del consumo di ossigeno è costituito da due palloncini identici, uno per il campione ed uno per il riferimento, collegati tra loro da un rubinetto a tre vie (fig.3.9).



**Figura 3.9: Rappresentazione schematica del trasduttore di pressione utilizzato in questo studio.**

La differenza di pressione tra i due è misurata da una membrana piezoelettrica libera di muoversi in risposta alla pressione differenziale (fig. 3.10).



**Figura 3.10: Rappresentazione schematica di un apparato per la misura del consumo d'ossigeno: sono visibili i due palloncini e la membrana**

Ponendo nel palloncino del campione una reazione che utilizzi ossigeno, senza sviluppo o consumo di altri gas, la differenza di pressione che viene a crearsi tra i due canali risulta direttamente proporzionale alla quantità di  $O_2$  consumata, secondo la 3.11, equazione generale dei gas perfetti:

$$\Delta P = \frac{RT}{V} \Delta n \quad 3.11$$

in cui  $V$  è il volume interno dei canali,  $\Delta n$  è la quantità di ossigeno consumato e  $\Delta P$  la pressione differenziale tra il riferimento e il campione.

Il trasduttore di pressione trasforma gli spostamenti della membrana in segnali elettrici che vengono raccolti da un computer ed analizzati con il programma Sigma Plot, che consente la visualizzazione grafica dei dati ottenuti. Affinché questo strumento possa fornire una buona risposta è necessario che il volume interno sia piuttosto piccolo, dal momento che il termine  $V$  è presente al denominatore nell'eq. 3.11.

Per realizzare ciò sono stati adottati opportuni accorgimenti costruttivi che, riducendo al minimo gli spazi morti, permettono di utilizzare campioni di appena 0.5 mL.

Nel palloncino di riferimento viene inserita la stessa miscela di reazione del campione in condizioni tali per cui la catena autossidativa non possa innescarsi. Nel nostro caso, per inibire completamente la reazione (lunghezza della catena =1) si aggiunge al bianco  $\alpha$ -tocoferolo concentrato ( $10^{-2}$  M) in eccesso. La presenza del riferimento è necessaria per un semplice motivo: senza di esso, se fosse presente solo il campione in un recipiente chiuso, si misurerebbe anche l'aumento di pressione dovuto ai gas che si liberano durante la reazione, in particolare azoto dall'azoiniziatore.

L'utilizzo di un trasduttore di pressione differenziale consente di misurare la differenza di pressione tra una miscela campione e una di riferimento contenente anch'essa l'azoiniziatore, per cui viene sottratto l'aumento di pressione dovuto allo sviluppo d'azoto.

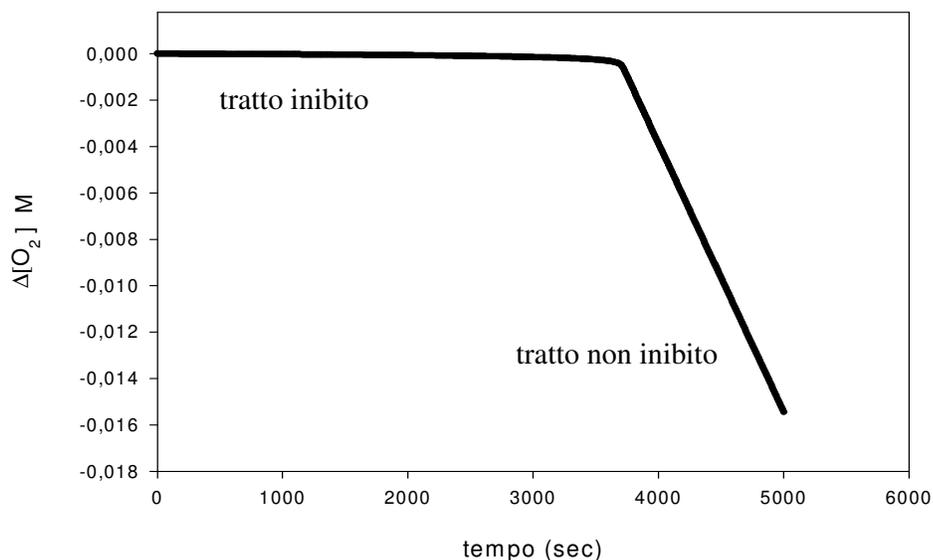
### 3.5.1 Autossidazione inibita: curve e parametri



La reazione di autossidazione può essere studiata misurando il consumo di ossigeno in presenza di opportuni inibitori.

Si ottengono con tale metodo grafici come quello mostrato in figura 3.13, nei quali sono particolarmente evidenti due fasi:

1. **Tratto inibito**, nel quale la reazione è fortemente rallentata dalla presenza dell'antiossidante;
2. **Tratto non inibito**, in cui l'ossidazione non viene più inibita, poiché tutto l'antiossidante è stato consumato.



**Figura 3.13: Grafico dell'andamento del consumo di ossigeno durante una autoossidazione inibita da un buon antiossidante**

Il **tratto inibito** corrisponde al periodo in cui è presente l'antiossidante. Se tutti i radicali prodotti vengono intrappolati dall'antiossidante, il consumo d'ossigeno segue l'equazione 3.14.

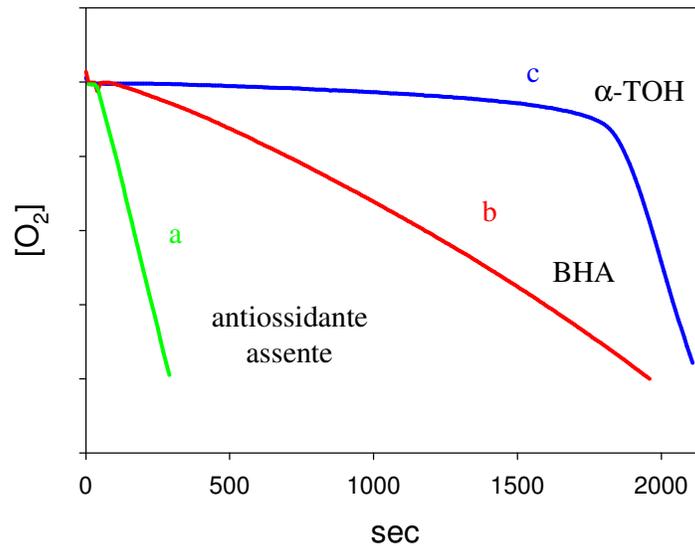
$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{k_p[\text{RH}]R_i}{n k_{inh}[\text{AH}]} \quad 3.14$$

in cui  $n$  rappresenta il coefficiente stechiometrico dell'antiossidante, cioè il numero di radicali intrappolati da ciascuna molecola di antiossidante, di solito uguale a 2, e  $R_i$  è la velocità di produzione dei radicali da parte dell'iniziatore.

Il **tratto non inibito**, invece, si riferisce al periodo in cui tutto l'antiossidante è stato consumato e l'autoossidazione procede liberamente, seguendo una cinetica in assenza d'inibizione. Corrisponde ad una retta che presenta lo stesso coefficiente angolare della retta che si ottiene in assenza di antiossidante (eq. 3.15).

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{k_p[\text{RH}]\sqrt{R_i}}{\sqrt{2k_t}} \quad 3.15$$

Nella figura 3.16 viene descritto il tipico andamento dei tre casi limite di una reazione di autoossidazione: non inibita, rallentata ed inibita. In particolare la retta verde corrisponde ad una reazione in assenza di antiossidante, mentre le curve rossa e blu rappresentano l'andamento di una reazione inibita, rispettivamente, da un antiossidante poco efficace, come il BHA, e da un buon antiossidante, quale l' $\alpha$ -tocoferolo.



**Figura 3.16** Andamento di un'autoossidazione non inibita (a), rallentata (b), inibita (c).

D'importanza rilevante è la grandezza  $k_p/\sqrt{2k_t}$ , detta ossidabilità del substrato, che indica la facilità con cui il substrato subisce la reazione di autoossidazione e contiene al suo interno le due costanti  $k_p$  e  $2k_t$ .

La  $2k_t$  può essere calcolata a partire da studi cinetici sul decadimento di radicali perossilici compiuti utilizzando la spettroscopia EPR. Dall'intersezione delle tangenti ai due tratti è possibile ricavare il tempo d'induzione, detto  $\tau$ , che corrisponde alla durata del periodo d'induzione. Se l' $R_i$  è costante, è

direttamente proporzionale alla concentrazione di antiossidante ed è legato al  $\tau$  dalla 3.17, da cui si può ricavare  $n$  (3.18).

$$R_i = \frac{n[\text{AH}]}{\tau} \quad 3.17$$

$$n = \frac{R_i \tau}{[\text{AH}]} \quad 3.18$$

Ogni qualvolta si variano le condizioni di reazione, è bene calcolare nuovamente l' $R_i$  per quel determinato iniziatore.

### 3.5.2 Substrato ossidabile

Sono numerosi i substrati ossidabili che possono essere usati nelle reazioni di autossidazione, tuttavia i più utilizzati sono stirene e cumene.

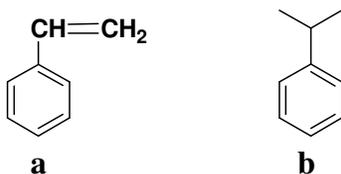


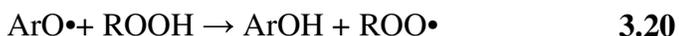
Figura 3.19 Stirene (a) e Cumene (b)

In particolare lo **stirene** (fig. 3.19, **a**) presenta diversi vantaggi rispetto ad altri potenziali substrati [Burton, G. W.; Ingold, K. U.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6472-6477].

Innanzitutto, la sua costante di propagazione di catena,  $k_p$ , è piuttosto elevata ( $41 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [Howard, J. A.; Ingold, K.U.; *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2729-2736].

Ciò significa che anche in presenza di un ottimo antiossidante l'ossidazione avviene ad un valore misurabile e la lunghezza di catena è maggiore di 1. In secondo luogo, poiché lo stirene non contiene idrogeni estraibili, forma un

poliperossido anziché un idroperossido. Ad esempio, la reazione 3.20, che complica gli studi cinetici nella maggior parte dei substrati organici, è trascurabile in stirene, così come la 3.21.



Trasferimenti di catena attraverso l'addizione di un fenossile allo stirene avvengono solo se lo stesso fenolo è presente in concentrazione molto elevata ( $> 5 \times 10^{-4}$  M) o in presenza di fenoli sostituiti che siano peggiori antiossidanti. Per ragioni termochimiche questo processo è trascurabile per polifenoli sostituiti, che sarebbero antiossidanti migliori rispetto al fenolo.

Così, il trasferimento di catena non è rilevante per i 4-metossi-fenoli e per la maggior parte dei fenoli con sostituenti alchilici in posizione *orto*. Per quanto riguarda il tocoferolo, essendo il miglior antiossidante liposolubile in sistemi biologici, non ci sono prove di trasferimento di catena durante l'autossidazione dello stirene da esso inibita. Infine, nelle condizioni d'uso, lo stirene non dà luogo a fenomeni di autocatalisi. In virtù di queste sue caratteristiche lo stirene è il substrato ossidabile di scelta nelle autossidazioni inibite per ricavare la  $k_{inh}$  dell'antiossidante in esame.

Tuttavia, usando questo substrato non è possibile calcolare il coefficiente stechiometrico  $n$  per antiossidanti scarsi. Ciò è dovuto al fatto che tali molecole non inibiscono l'autossidazione, ma semplicemente la rallentano. Dalla misurazione del consumo di ossigeno, pertanto, si ottiene una curva in cui il tratto inibito, non evidente, non è facilmente misurabile.

In questo caso risulta opportuno l'impiego di un altro substrato, quale il **cumene** (fig. 3.19, b). Quest'ultimo, come mostrato in tabella 4.4, ha una  $k_p$  e una ossidabilità notevolmente inferiori allo stirene. La sua autossidazione procede, quindi, lentamente e la curva mostra un tratto inibito più evidente, anche in presenza di antiossidanti scarsi, per i quali diventa possibile calcolare l' $n$ .

Utilizzando la spettroscopia EPR si è scoperto che la  $k_t$  del cumene varia in funzione della concentrazione, in virtù della decomposizione del tetrossido (fig. 1.9) e delle reazioni che ad essa fanno seguito: si formano addotti radicalici che propagano la catena [Lucarini, M.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4497].

**Tabella 3.22**

substrato ossidabile	$k_p$	$2k_t$	ossidabilità
<b>STIRENE</b>	41	$4.2 \times 10^7$	$6.3 \times 10^{-3}$
<b>CUMENE</b>	0.37	$4.72 \times 10^4$	$1.7 \times 10^{-3}$

### 3.6 Autoossidazione in micelle

Gli studi di perossidazione lipidica sono resi impossibili dal fatto che il substrato ossidabile, di solito una molecola organica lipofila come lo stirene o il cumene, è insolubile in soluzione acquosa omogenea. Questo problema è stato risolto ponendo il substrato ossidabile in sospensione, all'interno di strutture, come micelle e liposomi, in grado appunto di tenerle in sospensione. La reazione di autoossidazione viene "iniziata" da iniziatori idrosolubili, come l' AAPH o liposolubili, come l'AMV. Ovviamente, nel caso di una reazione di questo tipo le cinetiche complessive di ossidazione dipenderanno non solo dalle costanti cinetiche sopra descritte ma anche dalle costanti cinetiche di entrata ed uscita dei reagenti e degli intermedi di reazione dalle micelle o dai liposomi.

### 3.7 Metodi radiolitici

Irraggiando una soluzione acquosa con un fascio di elettroni ad alta energia si ottiene la radiolisi dell'acqua e si formano  $H\bullet$ ,  $HO\bullet$  ed elettroni solvatati ( $e_{aq}^-$ ). L'aggiunta di  $N_2O$  permette di eliminare questi elettroni in modo da studiare la reattività delle specie rimanenti. Possono essere generati anche altri radicali, come  $l'N_3^\bullet$  dalla reazione di  $HO\bullet$  con  $N_3^-$ ;  $CCL_3OO\bullet$  dalla radiolisi di  $CCL_4$  e  $O_2^{\bullet-}$ , aggiungendo  $HCOONa$ . Questi radicali reagiscono con l'antiossidante  $AH$  trasformandolo nel radicale  $A\bullet$ , che viene evidenziato attraverso il suo assorbimento UV. Questo metodo può risultare utile per studiare il comportamento degli antiossidanti nei solventi acquosi e per ottenere informazioni sul radicale  $HO\bullet$ , il radicale più aggressivo che esista in natura, in grado anche di causare danni al DNA. Numerosi lavori sul metodo radiolitico applicato ai polifenoli sono stati pubblicati da Jovanovic [Jovanovic, S.V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.G. Flavonoids as Antioxidants; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*; 4846. Jovanovic, S. V.; Hara, Y.; Steenken, S.; Simic, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**; *119*; 5337].

Anche questa tecnica ha un grosso limite: i radicali che vengono generati possiedono una reattività diversa da quelli fisiologici, soprattutto rispetto ai perossili derivanti dagli acidi grassi polinsaturi.

I risultati che si ottengono con i radicali  $HO\bullet$  non possono essere applicati ai radicali perossili, in quanto essi sono altamente reattivi con quasi tutti i substrati organici, quindi la velocità della loro reazione con gli antiossidanti non dipende dalla struttura di questi ultimi.

### 3.8 Peroxyl Radical Clock

Nel 2001 venne pubblicato un articolo di Tallman e Pratt [Tallman, K. A.; Pratt, D. A.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123; 11827-11828] il quale indica un metodo per misurare la costante cinetica di inibizione  $k_{inh}$  attraverso l'analisi dei prodotti che si ottengono durante l'ossidazione inibita dell'acido linoleico e dei suoi esteri. (LH).

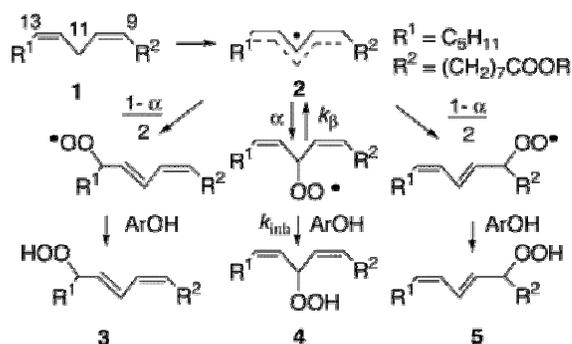


Figura 3.23: Reazioni di ossidazione dell'acido linoleico e dei suoi esteri

La tecnica si basa sul fatto che il radicale bis-allilico ( $L^\bullet$ ), che si forma dopo lo strappo dell'idrogeno da LH, può reagire con l'ossigeno in tre posizioni, di cui quella cineticamente favorita è la centrale, mentre quelle termodinamicamente più stabili sono le laterali. Poiché l'addizione dell'ossigeno in posizione centrale è reversibile (vedi figura 3.24), con un  $k_\beta = 1.9 \times 10^6$ , i prodotti di ossidazione che si ottengono sono generalmente 3 e 5. L'aggiunta di antiossidante  $ArOH$  può intrappolare una certa frazione di perossile nella posizione centrale (4), in quantità tanto maggiore quanto più è alta la costante cinetica  $k_{inh}$ . Le concentrazioni relative dei perossili possono essere misurate attraverso un'analisi HPLC-MS-MS, sfruttando la loro diversa frammentazione. Questo metodo è specifico per antiossidanti con elevata reattività.

### 3.9 Altri metodi: reazione con i radicali alchilici e alcossilici

La reazione degli antiossidanti con i radicali alchilici non è particolarmente significativa nei sistemi biologici a causa della presenza ubiquitaria dell'ossigeno ma lo diventa nello sviluppo di inibitori della polimerizzazione nelle materie plastiche. La velocità dell'estrazione di idrogeno da parte dei radicali alchilici primari può essere misurata utilizzando il metodo del "radical clock" che consiste in una reazione competitiva tra il processo bimolecolare oggetto di studio e il riarrangiamento monomolecolare ( $k_r$ ) di un idoneo substrato (fig. 3.24)

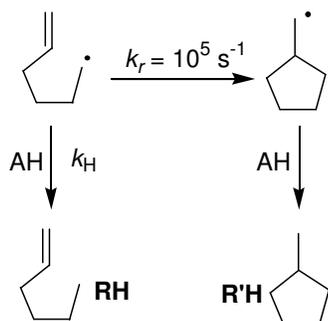


Figura 3.24

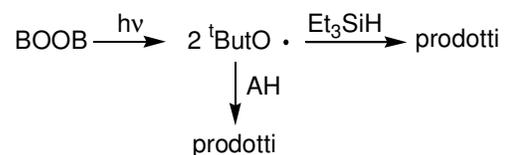
Dalle concentrazioni relative dei prodotti è possibile risalire alla costante cinetica  $k_H$  tramite l'equazione 3.25:

$$k_H[\text{AH}] = k_r \frac{[\text{RH}]}{[\text{R}'\text{H}]} \quad (3.25)$$

Numerosi studi condotti nel nostro laboratorio sulla reattività dei fenoli verso i radicali alchilici ha mostrato che il logaritmo di  $k_H$  è proporzionale in maniera lineare alla BDE (OH) dell'OH fenolico e dipende dall'ingombro sterico dei

sostituenti in *orto* all'OH [Franchi, P.; Lucarini, M.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L.; Lunelli, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**; *121*; 507-514].

La costante cinetica di velocità per la reazione di un antiossidante nei confronti dei radicali alcossilici viene misurata dalla reazione competitiva con un opportuno donatore di idrogeno, come il trietil silano.



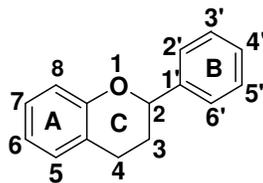
I radicali alcossilici però sono caratterizzati da una reattività molto elevata, sono quindi poco selettivi e non adatti a studi sull'attività degli antiossidanti.

## CAPITOLO 4

### I FLAVONOIDI

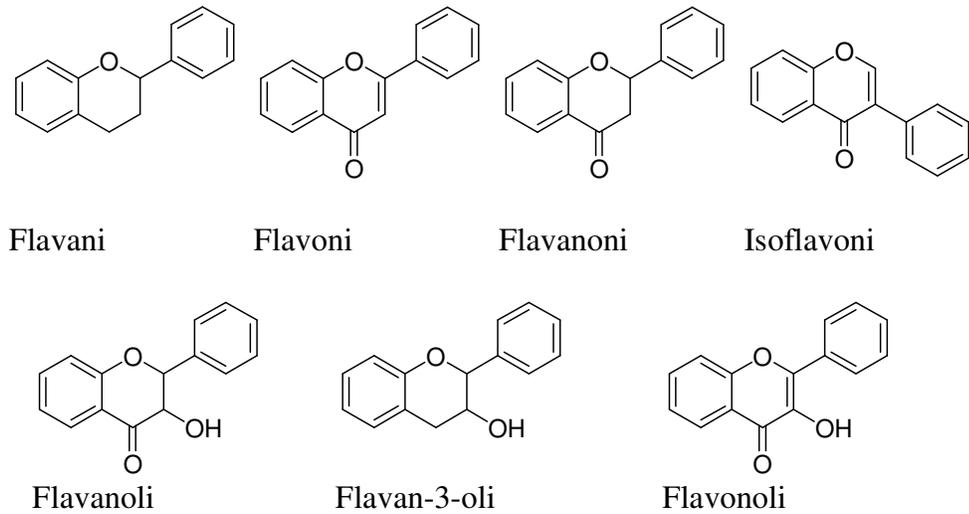
I flavonoidi sono composti polifenolici, più precisamente difenilpropani, presenti comunemente in natura (nelle piante ne sono stati ritrovati oltre 4000) e negli alimenti [Cao, G; Sofic, E.; Prior, R. L. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, 22, 5, 749-760].

In particolare ne sono ricchi frutta, verdura, the, cioccolato e vino. Dal punto di vista strutturale sono caratterizzati da uno scheletro 2-fenil-cromanico, detto flavanico (fig. 4.1).



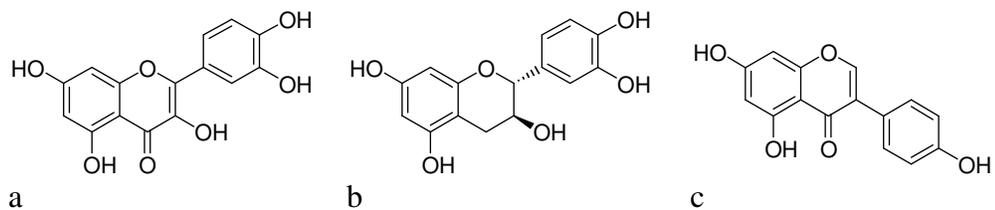
**Fig. 4.1: Struttura dello scheletro flavanico**

Questa ampia famiglia comprende flavoni, flavani, isoflavani e i 2,3 diidroderivati, detti flavanoni. Gli anelli aromatici A e B sono, di solito, variamente sostituiti, mentre in base allo stato di ossidazione dell'anello eterociclico C si ha un'ulteriore suddivisione in sotto-classi (fig. 4.2).



**Figura 4.2: Flavonoidi, esempi di alcune sotto-classi**

Sono stati isolati e caratterizzati migliaia di diversi flavonoidi, di cui sono riportati alcuni esempi in figura 4.3: il flavanolo quercetina (a), il flavan-3-olo (+) catechina (b) e l'isoflavone genisteina (c).



**Fig. 4.3: Esempi di flavonoidi noti: (a) Quercetina, (b) Catechina, (c) Genisteina**

La biosintesi di queste molecole vede come precursori tirosina e fenilalanina, che forniscono l'anello aromatico B, mentre l'anello aromatico A deriva dal malonil-CoA.

I flavonoidi sono comuni componenti della dieta umana e la loro assunzione giornaliera è compresa tra 0.02 e 2 g, a seconda delle abitudini individuali. Sono assunti prevalentemente come glucosidi, cioè legati ad un residuo zuccherino. Studi recenti hanno mostrato che alcuni di questi glucosidi vengono assorbiti intatti a livello intestinale, grazie ad un carrier del glucosio sodio-dipendente [Walle, T. Free Rad. Biol. Med. 2004, 36, 829-837]. Per quanto riguarda la loro biotrasformazione, gli agliconi possono subire diverse reazioni, tra cui coniugazione con tioli, in particolare glutatione, e ossidazione da parte dei citocromi P<sub>450</sub>.

Diversi studi hanno evidenziato per i flavonoidi numerose proprietà, tra cui l'attività antiossidante, antitumorale, antischemica ed antinfiammatoria. Quest'ultima sembra essere dovuta alla capacità dei flavonoidi d'inibire una serie di enzimi, tra cui le lipoossigenasi, cicloossigenasi e monossigenasi.

Per quanto riguarda le proprietà antiossidanti dei flavonoidi, esse sono esplicate attraverso due meccanismi:

- azione come antiossidanti preventivi, in virtù dell'attività chelante nei confronti dei metalli Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>;
- azione come antiossidanti interruttori di catena nei confronti dei radicali perossili, ROO•.

Va ricordato, inoltre, che i flavonoidi possono avere effetti secondari tossici. Alcuni di queste molecole possono stimolare la formazione del tumore al seno a causa della somiglianza con l'estradiolo (fig. 4.4). La genisteina (figura 4.3, c), in particolare, può agire da SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) (fig. 4.5) a livello dei recettori per gli estrogeni. Ciò significa che funge sia da agonista che da antagonista a seconda del contesto cellulare in cui si trova e tale caratteristica può essere utile nella cura selettiva di tumori al seno ormone-dipendenti.

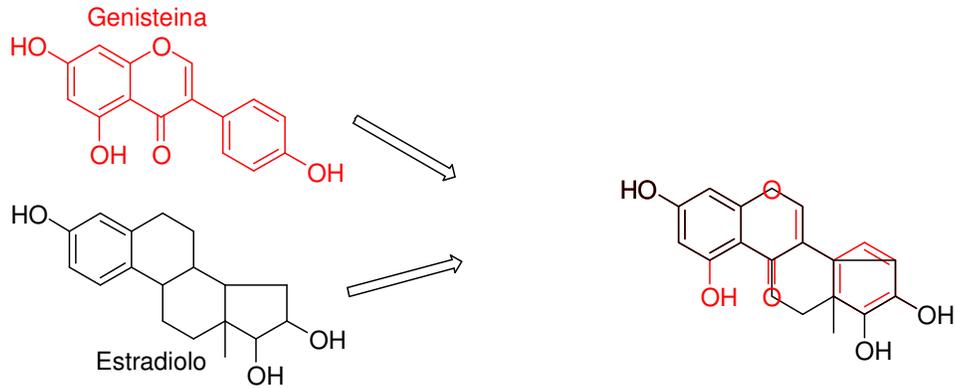


Fig. 4.4: Confronto tra le strutture di Genisteina ed Estradiolo

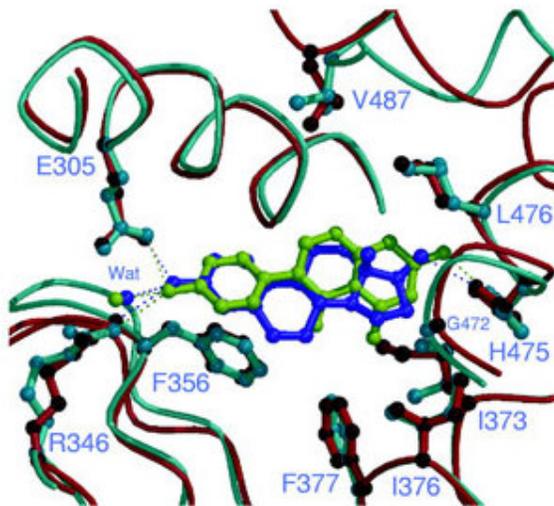


Fig. 4.5: Affinità della Genisteina per il recettore degli estrogeni

A dispetto di questi benefici effetti, alcuni flavonoidi in vitro sono risultati essere mutageni. La causa di ciò è da ricondurre alla loro attività pro-ossidante. I flavonoidi, alla stregua degli idrochinoni, hanno un potenziale d'ionizzazione molto basso e reagiscono facilmente con l'ossigeno atmosferico, autossidandosi. Nella loro forma ossidata (*orto* e *para* chinoni) sono specie elettrofile in grado di formare addotti covalenti con i nucleofili endogeni, tra cui le basi del DNA e il glutatione.

## CAPITOLO 5

### IL RUOLO DELLO ZOLFO IN MOLECOLE FENOLICHE AD ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Sappiamo che una delle reazioni chimiche più studiate, in quanto interviene nel danno causato dai radicali liberi ai sistemi biologici ed organici, è l'autossidazione dei composti contenenti carboni insaturi e i lipidi, interesse motivato dal fatto che queste reazioni sono importanti sia in ambito biologico sia per la loro rilevanza in ambito tecnologico.

Questa reazione può essere inibita o al limite ritardata dagli antiossidanti interruttori di catena, molecole capaci di intrappolare i radicali liberi senza trasformarsi in intermedi reattivi. I fenoli, che rappresentano la principale famiglia di antiossidanti di questo tipo, possono donare un atomo di idrogeno fenolico per formare un radicali fenossile stabilizzato per risonanza, relativamente poco reattivo verso l'ossigeno e i materiali organici. [Mulder, P.; Korth, HG.; Ingold, K.U. *Helv.Chim.Acta* **2005**, 88, 370-374].

La misura in cui l'autossidazione è ritardata dipende dalla costante di velocità della reazione di inibizione tra l'antiossidante e i radicali perossili che propagano la catena (Fig. 5.1).

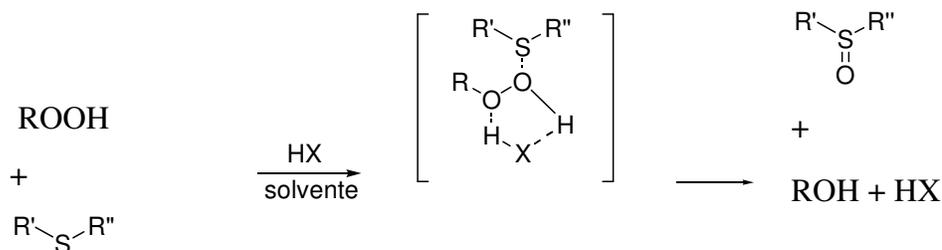


**Figura 5.1: Reazione tra un antiossidante ArOH e un radicale perossile ROO•**

Durante gli ultimi anni numerosi studi sono stati condotti per chiarire il meccanismo alla base della velocità della reazione sopraindicata e per sintetizzare famiglie di fenoli che presentassero un'attività antiossidante migliore

rispetto a quella dell' $\alpha$ -TOH, il piú efficace antiossidante liposolubile presente in natura. Molti dei fenoli sintetizzati mostrano eccellenti caratteristiche, come un'elevata reattività verso i radicali perossili e una ottima stabilità all'aria.

Tra gli inibitori dell'ossidazione dei substrati idrocarburici da parte dei radicali liberi, i fenoli contenenti zolfo sono di particolare interesse poiché essi possono comportarsi come antiossidanti interruttori di catena, intrappolando i radicali perossili attraverso il trasferimento di un atomo di idrogeno dal gruppo fenolico e come antiossidanti preventivi, decomponendo gli idroperossidi ai corrispondenti alcoli, attraverso una reazione di attacco nucleofilo dello zolfo sull'ossigeno (fig. 5.2):



**Fig. 5.2: Reazione di decomposizione degli idroperossidi**

Uno dei possibili risvolti pratici sta nel fatto che i prodotti ossidati degli alchilfenoli non sono particolarmente stabili, ma possono andare incontro a degradazione con formazione di forti elettrofili in grado di attaccare le molecole biologiche con effetti anche cancerogeni. L'esempio piú noto è quello del BHT (2,5-di-*terz*-butil idrossitoluene) che attraverso la formazione di un chinone metide è in grado di causare il cancro al polmone [Lemercier et al. *Chem. Res. Toxicol.*; **2004**; *17*, 1675-1683].

I derivati solforati potrebbero invece formare addotti ossigenati piú stabili e quindi meno propensi a dare effetti tossici.

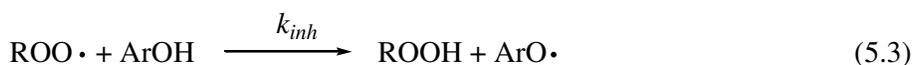
In questo contesto gli analoghi dei flavonoidi contenenti zolfo possono rivestire una grande importanza, in quanto rappresentano bioisosteri di composti presenti in natura, ma con minori effetti tossici.

### 5.1 Il ruolo dello zolfo come sostituyente

La sintesi di queste molecole ci ha permesso di iniziare uno studio sulla reattività e struttura-attività di questa classe di antiossidanti utilizzando dei sistemi modello. Ad esempio abbiamo studiato l'effetto del legame a idrogeno e dell'ingombro sterico sull'attività di questi antiossidanti contenenti zolfo, sintetizzando dei fenoli *para*-sostituiti con i gruppi –SR, –SOR e SO<sub>2</sub>R e studiando un fenolo *orto*-sostituito con il gruppo –SR.

Dalla fine degli anni 80 Ingold e collaboratori hanno studiato una serie di derivati correlati all' 1-tio- $\alpha$ -tocoferolo e, al contrario di quanto ci si aspettava, essi erano meno reattivi verso i radicali perossili rispetto ai derivati cromanolici [Zahalka, H.A.; Robillard, B.; Hughes, L.; Burton, G.W.; Janzen, E.G.; Kotake, Y.; Ingold, K.U.; *J. Org. Chem.* **1998**, 53, 3739-3745]. In particolare essi trovarono che la minore reattività era dovuta sia alla minore  $k_{inh}$  (vedi l'equazione 1) sia al fatto che queste molecole intrappolano meno di due radicali perossili.

Questo indica anche che il meccanismo di inibizione è differente da quello semplice consistente nelle due reazioni 5.3 e 5.4.



D'altra parte uno studio sul 2,3-diidrobenczo[b]furan-5-olo e sul 2,3-diidrobenczo[b]tiofene-5-olo, analoghi dell'alfa-tocoferolo aventi un anello

condensato a 5 atomi, suggeriva che la capacità antiossidante dei derivati con lo zolfo è migliore di quelli ossigenati.

In uno studio comparativo delle proprietà antiossidanti di ammine cicliche aromatiche [Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli G.F.; Valgimigli, L.; Gimes, D.; Tordo, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11546-11553], i derivati contenenti zolfo sono meno reattivi che i corrispondenti ossigenati. Infatti la sostituzione dell'atomo di ossigeno eterociclico delle fenossazine con lo zolfo (a formare le fenotiazine) o con il selenio (a formare le fenoselenazine) incrementa l'energia di dissociazione (la BDE) del legame N-H di 2.1 e 3.2 kcal/mol rispettivamente, rendendo così il trasferimento dell'atomo di idrogeno dalle ultime due ammine un attacco radicalico meno esoergonico. In accordo a quanto detto, le costanti di velocità per la reazione con entrambi i radicali,  $\text{ROO}\cdot$  e  $\text{CH}_3\cdot$ , decrescono nell'ordine  $\text{O} > \text{S} > \text{Se}$ .

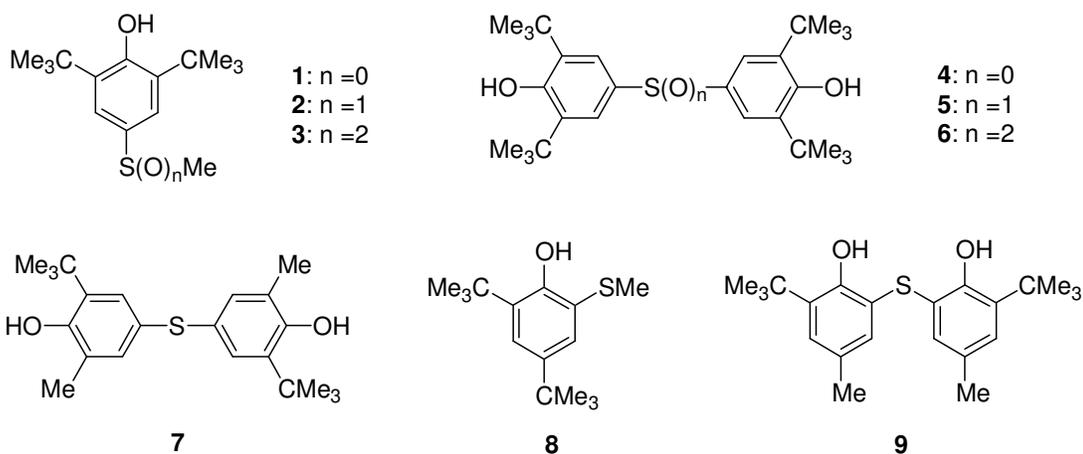
Recenti studi sull'effetto antiossidante dei bis(4-idrossi-3,5-diter-butilfenil) solfuri e polisolfuri, è stato riportato che questi composti ritardano l'ossidazione degli idrocarburi sia terminando la catena ossidativa con il trasferimento dell'atomo di idrogeno ai radicali perossili sia catalizzando la decomposizione degli idroperossidi. È stato trovato che l'attività inibitoria aumenta con il numero degli atomi di zolfo [Farzaliev, V.M.; Allakhverdiev, M. A.; Sattar-zade, R. I.; Rzaeva, I. A.; *Russ. J. Appl. Chem.* **2001**, 74, 2083-2086]. Una simile ricerca su solfuri correlati portava alla conclusione che questi composti superano di gran lunga l'attività antiossidante del commerciale 2,6-diter-butil-4-metilfenolo (BHT).

Per chiarire meglio il comportamento dei derivati con lo zolfo e stimare quantitativamente gli effetti della sua presenza sulle proprietà antiossidanti dei fenoli, abbiamo intrapreso uno studio termodinamico e cinetico dei 2,6-di-terz-butilfenoli sostituiti alla posizione 4 con gruppi tiometile (SR), sulfinile (SOR) e sulfonile ( $\text{SO}_2\text{R}$ ). Gli ultimi sono stati studiati poiché i solfuri sono ossidati più facilmente a dare solfossidi e solfoni sotto le condizioni sperimentali impiegate per effettuare la reazione di autossidazione. Quindi la struttura dell'inibitore

dell'ossidazione può cambiare il corso della reazione con un conseguente cambio nel comportamento antiossidante.

Abbiamo anche studiato anche una coppia di fenoli contenenti zolfo come sostituito in posizione *orto* al gruppo ossidrilico poiché queste strutture sono presenti nel sito attivo della galattosio ossidasi, dove il radicale tirosile è connesso alla vicina cisteina attraverso un legame tioetere. La conoscenza del comportamento termodinamico e cinetico di tali aminoacidi modificati e l'effetto dello zolfo sulla stabilità dei radicali *o*-fenossili è essenziale per lo sviluppo di nuovi enzimi artificiali per l'ossidazione verde degli alcoli [Pratt, R. C.; Stack, T. D. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8716-8717].

I fenoli studiati sono mostrati nello Schema 5.5. Queste strutture sono state scelte per studiare gli effetti dello zolfo come sostituito nelle posizioni dell'anello coniugate con il gruppo ossidrilico. I gruppi *ter*-butili in *orto* sono utili, nel caso di studi EPR, per incrementare la persistenza del corrispondente radicale fenossile dovuta alla protezione sterica del radicale centrato all'ossigeno.

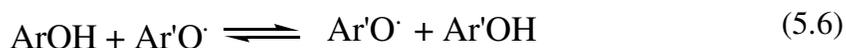


Schema 5.5

### 5.1.1 Entalpia di dissociazione del legame O-H (BDE)

I valori di BDE per i composti sono stati determinati usando la tecnica di equilibrizzazione radicalica EPR che, tra i vari metodi sperimentali usati per la determinazione delle lunghezze di legame, sembra garantire ad oggi la migliore accuratezza.

Per questo motivo abbiamo misurato la costante di equilibrio,  $K_e$ , per la reazione di trasferimento dell'atomo di idrogeno tra un fenolo di riferimento (Ar'OH) e uno dei fenoli esaminati (ArOH) e i corrispondenti radicali fenossile (eq. 5.6) generati sotto continua fotolisi a temperatura ambiente (25 °C) in soluzione di benzene deossigenata contenente un 10 % di *ter*-butil-perossido.



Il 2,6-di-*ter*-butil-4-metilfenolo (BHT), il cui valore di BDE rivisto è 80.1 kcal/mol, [Mulder, P.; Korth, H-G.; Pratt, D. A.; DiLabio, G. A.; Valgimigli, L.; Pedulli, G. F.; Ingold, K. U.; *J. Phys. Chem A* **2005**, 109, 2647-2655] è stato sempre usato come fenolo di riferimento, eccetto che nel caso di **8**, che è stato equilibrato con 2,4,6-trimetilfenolo (BDE = 82.2 kcal/mol).

Le misure sono state ripetute sotto differenti intensità di luce al fine di valutare la costanza di  $K_e$  e quindi, il raggiungimento dell'equilibrio. Nel calcolo della  $K_e$  sono state usate le concentrazioni iniziali di ArOH e Ar'OH e le relative concentrazioni dei radicali sono state ottenute sia dall'integrazione numerica sia dalla simulazione degli spettri EPR. Le BDE delle specie ArOH sono state calcolate, assumendo che il termine antropico possa essere non considerato, attraverso l'eq. 5.7 dal valore di  $K_e$  e dal valore della BDE del fenolo di riferimento Ar'OH.

$$\text{BDE (ArOH)} = \text{BDE (Ar}'\text{OH)} - RT \ln (K_e) \quad (5.7)$$

➤ *Costante di velocità delle reazioni di inibizione*

La determinazione della costante di velocità per la reazione con i radicali perossili,  $k_{in}$  (eq. 5.8) dei derivati sopra menzionati, è stata fatta monitorando l'inibizione di una autossidazione, iniziata termicamente, di stirene e cumene.



Il cumene è stato usato principalmente con gli antiossidanti meno attivi, a causa della sua bassa ossidabilità, rispetto allo stirene, che permette di evidenziare e calcolare meglio il periodo di induzione.

La reazione è stata seguita monitorando il consumo di ossigeno durante una autossidazione con il nostro apparato che registra l'assorbimento di gas, di cui si può trovare ampia descrizione nel seguente riferimento: [Amorati, R.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L.; Attanasi, O. A.; Filippone, P.; Fiorucci, C.; Saladino, R.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2142-2146] e che usa come detector un commerciale trasduttore di pressione differenziale. Le reazioni, iniziate dalla decomposizione termica dell' AMVN (2,2'-azobis(2,4-dimetil-valeronitrile), sono state condotte a 30° C sotto condizioni controllate in una soluzione satura di ossigeno di un substrato ossidabile, sia in assenza che in presenza di ciascun antiossidante. L'  $\alpha$ -Tocoferolo è stato usato come antiossidante interruttore di catena di riferimento.

La costante di velocità  $k_{inh}$  di ogni composto è stata determinata attraverso un trattamento cinetico consistente nella misura della velocità di ossidazione in presenza ( $-d[\text{O}_2]/dt = R$ ) e in assenza ( $(-d[\text{O}_2]/dt)_0 = R_0$ ) dell'antiossidante in funzione del tempo [Roginsky, V.; Lissi, E.A. *Food Chem.* **2005**, 92, 235-254; Roginsky, V. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 414, 261-270; Loshadkin, D.; Roginsky, V.; Pliss, E. *Int. J. Chem. Kinet.* **2002**, 34, 162-171].

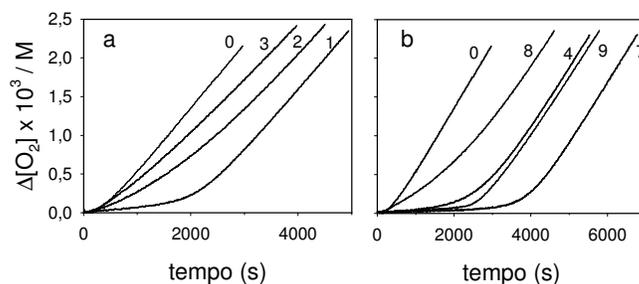
I valori di  $k_{in}$  sono stati ottenuti attraverso l'equazione 5.9, usando la nota costante di velocità per la reazione di propagazione, la  $k_p$  del substrato ossidabile (RH).

$$F = \ln \frac{1 + R/R_0}{1 - R/R_0} - \frac{R_0}{R} = \frac{k_{inh} \cdot R_0}{k_p [RH]} t + constant \quad (5.9)$$

Nel caso dello stirene la  $k_p$  è  $41 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Nel caso del cumene le sue cinetiche di ossidazione sono dipendenti dalla concentrazione di substrato e la costante  $k_p$  è stata calcolata come  $0,32 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  dal valore riportato precedentemente della  $2k_t$  di  $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  misurato seguendo il decadimento dei radicali cumilperossili in cumene puro con l'EPR, e l'ossidabilità del cumene puro ( $k_p/2k_t^{0,5} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{0,5} \text{ s}^{-0,5}$ ) [Howard, J. A.; in *Free Radicals*; Kochi, J. K., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1975; Vol.2, Capitolo 12].

Il termine  $n$  (eq. 5.10) rappresenta il coefficiente stechiometrico, cioè il numero di radicali perossili intrappolati da ogni molecola di antiossidante, ed è determinato come abbiamo precedentemente detto (vedi capitolo 3) dalla lunghezza del periodo di induzione  $\tau$  durante il quale la velocità di consumo di ossigeno è fortemente ridotta (vedi figura 5.11).

$$n = \frac{R_i \tau}{[AH]} \quad (5.10)$$



**Figura 5.11.** Consumo di ossigeno osservato a  $30^\circ\text{C}$  durante l'autossidazione iniziata da AMVN ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) del cumene ( $7.1 \text{ M}$ ) in assenza (0) e in presenza di alcuni fenoli contenenti zolfo ( $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ).

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 5.12

**TABELLA 5.12:** Entalpie di dissociazione del legame O-H (**BDE**) di fenoli sostituiti **1-9** misurate a temperatura ambiente in benzene contenente il 10% di *di-ter*-butil perossido, costanti di velocità  $k_{inh}$  per le loro reazione con i radicali perossili in cumene (o stirene) a 30 °C e numero di radicali intrappolati da ogni molecola di antiossidante,  $n$ .

Composto	BDE	Substrato	$k_{inh} \times 10^{-4}$	$n$
	/ kcal mol <sup>-1</sup>	ossidabile <sup>a</sup>	/ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	
<b>1</b>	78.3 ± 0.1	C	3.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1
		S	4.0 ± 0.3	-
<b>2</b>	81.6 <sup>b</sup>	C	0.29 ± 0.05	1.6 ± 0.2
<b>3</b>	81.7 ± 0.4	C	0.22 ± 0.01	1.3 ± 0.4
<b>4</b>	78.5 ± 0.2	C	2.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
<b>5</b>	-	C	0.34 ± 0.04	2.2 ± 0.1
<b>6</b>	82.3 ± 0.3	C	0.13 ± 0.02	1.6 ± 0.1
<b>7</b>	79.6 ± 0.2	S	61 ± 10	3.1 ± 1
<b>8</b>	82.2 ± 0.2	C	0.39 ± 0.05	1.6 ± 0.2
<b>9</b>	81.0 ± 0.1	S	21 ± 1	2.2 ± 0.1
<b>BHT</b>	80.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	S	1.1 <sup>d</sup>	2
<b>BHA<sup>e</sup></b>	77.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	S	11.0 <sup>f</sup>	2

<sup>a</sup> Misurato in cumene (C) o in stirene (S).

<sup>b</sup> Stimato dal grafico di Figura 5 usando il valore di  $k_{inh}$  determinato sperimentalmente.

<sup>c</sup> Valore corretto, [Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G. F.; Cabiddu, S.; Fattuoni, C. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 9259-9263; Mulder, P.; Korth, H-G.; Pratt, D. A.; DiLabio, G. A.; Valgimigli, L.; Pedulli, G. F.; Ingold, K. U.; *J. Phys. Chem A* 2005, 109, 2647-2655].

<sup>d</sup> [Enes, R. J. F.; Tomè, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Amorati, R.; Fumo M.G.; Valgimigli, L.; Pedulli, G. F. *Chem.-Eur. J.* 2006, 12, 4646-4653].

<sup>e</sup> 2,6-di-*ter*-butil-4-metossifenolo.

<sup>f</sup> [Burton, G.W.; Doba, T.; Gabe, E. J.; Hughes, L.; Lee, F. L.; Prasad, L.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 7053-7065].

La figura 5.11 mostra che i derivati **1**, **2** e **3** si comportano come inibitori dell'autossidazione dello stirene, la loro attività antiossidante decresce con l'aumentare del grado di ossidazione dello zolfo, essendo maggiore per il solfuro e molto bassa per il solfene. Quando abbiamo analizzato i bis-fenoli **4**, **5** e **6** come inibitori, i tracciati del consumo di ossigeno sono sorprendentemente simili a quelli ottenuti con **1**, **2** e **3** rispettivamente alla stessa concentrazione. Questo risultato era inaspettato in quanto sulla base della struttura della molecola prevedevamo i tracciati di consumo di ossigeno lunghi la metà e i coefficienti stechiometrici due volte più grandi come conseguenza della presenza di due gruppi OH, come già trovato per il 4,4'-metilenebis(2,6-di-*terz*-butilfenolo) [Amorati, R.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 5198-5204].

È da ricordare che un risultato simile fu ottenuto da Farzaliev e collaboratori, inibendo l'autossidazione del cumene iniziata da AIBN in presenza del derivato **4** e riportando un *n* uguale a due.

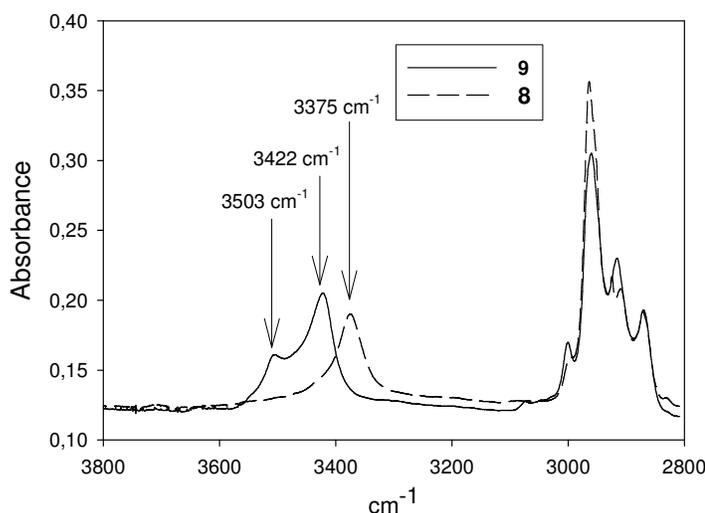
Abbiamo evidenziato un comportamento anomalo anche analizzando il bis(3-*terz*-butil-4-idrossi-5-metilfenil) solfuro (composto **7**), che differisce dal **4** per la presenza sull'anello di un metile piuttosto che di un *ter*-butile su una delle posizioni orto al gruppo ossidrilico. Il composto **7** termina 3 catene radicaliche invece che 4 come aspettato per i bisfenoli.

È stata studiata anche l'attività antiossidante dei fenoli **8** e il bisfenolo **9** contenenti uno zolfo bivalente in posizione *orto* al gruppo ossidrilico. I tracciati di

consumo di ossigeno registrati durante l'autossidazione inibita del cumene mostrati in figura 5.11 indicano chiaramente che il bisfenolo **9** è un antiossidante di gran lunga migliore del derivato **8**. Il rapporto tra le costanti di velocità trovate sperimentalmente è di circa 54 a favore del derivato **9**. Anche in questo caso, come per il composto **4**, il numero delle catene di ossidazione terminate da ogni molecola di inibitore è circa 2, nonostante la presenza di due unità fenoliche per ciascuna molecola.

### 5.1.2 Misure FT-IR

Nei due composti **8** e **9** contenenti entrambi orto-sostituenti può formarsi un legame idrogeno intramolecolare tra il protone dell'ossidrile e l'atomo di zolfo, come rivelato anche da precedenti studi IR ed NMR su derivati simili come struttura [Schaefer, T.; Salman, R. S.; Wildman, T. A.; Clark, P. D. *Can. J. Chem.* 1982, 60, 342-348; Lucarini, M.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L.; Amorati, R.; Minisci, F.; *J. Org. Chem.* 2001, 66, 5456-5462].



**Figura 5.13: Spettri FT-IR di una soluzione 0.05 M di **8** (linea tratteggiata) e **9** (linea continua)**

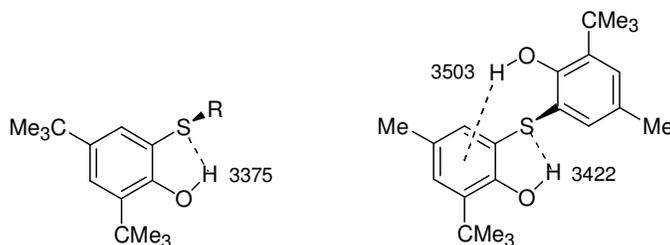
Poiché questo tipo di interazione (il legame a idrogeno) ha un forte effetto sulle proprietà antiossidanti dei fenoli, abbiamo condotto delle misure FT-IR per

confermare questi dati e identificare la natura delle specie legate con legami a idrogeno. La figura 5.13 mostra gli spettri FT-IR di entrambi i fenoli (0.05 M) registrati a temperatura ambiente in carbonio tetracloruro, tra 2800 e 3800  $\text{cm}^{-1}$ .

Lo spettro del monofenolo **8** mostra un singolo picco nella regione dell'assorbimento dell'OH, ad una frequenza ( $3375 \text{ cm}^{-1}$ ) caratteristica di specie legate con un legame a idrogeno intramolecolare.

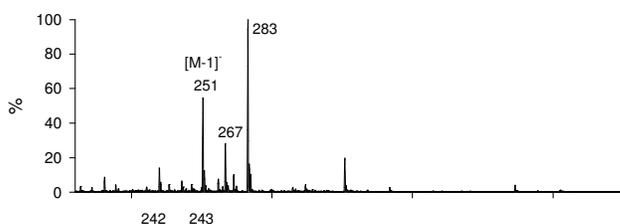
Poiché l'assenza di linee al di sopra di  $3600 \text{ cm}^{-1}$  indica che non ci sono gruppi ossidrilici liberi, la molecola **8** deve esistere in una singola geometria presumibilmente simile a quella adottata dal 2-(metiltio)fenolo, per cui l'IR e l'NMR suggeriscono che la conformazione preferita è quella in cui l'interazione OH---S forza l'orbitale 3p dello zolfo sul piano dell'anello benzenico e il gruppo metile completamente fuori dal piano molecolare. (vedi schema 5.14).

Lo spettro IR del bisfenolo **9** mostra, invece, due assorbimenti: uno centrato a  $3422 \text{ cm}^{-1}$  e l'altro a  $3503 \text{ cm}^{-1}$ . Entrambe le posizioni e le intensità di queste bande sono indipendenti dalla concentrazione del fenolo e le loro frequenze sono caratteristiche di gruppi ossidrilici legati intramolecolarmente con legami a idrogeno. La prima, osservata a frequenze vicine a quella dell'unica banda visibile per il composto **8**, può essere attribuita al gruppo OH legato all'atomo di zolfo [Schaefer, T.; Salmam, R. S.; Wildman, T. A.; Clark, P. D. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 342-348], mentre il secondo assorbimento (osservato a frequenze più alte e quindi indicativo di una interazione più debole) potrebbe essere dovuta al secondo gruppo ossidrilico legato con legame a idrogeno o agli elettroni  $\pi$  dell'anello benzenico o all'altro gruppo OH. Una possibile struttura per il composto **9** è rappresentata sempre nello schema 5.14.



Schema 5.14

Al fine di chiarire le ragioni del valore anomalo di  $n$  ottenuto per i composti **4**, **7** e **9**, abbiamo effettuato anche l'analisi dei prodotti facendoli reagire con i radicali perossili e studiando i prodotti ottenuti attraverso uno spettrometro di massa a ionizzazione con elettrospray (ESI-MS), una tecnica che si è rivelata utile per dare informazioni sugli intermedi delle reazioni di autoossidazione. I risultati ottenuti in negativo indicano che dopo 15-30 minuti, oltre al picco corrispondente al fenolo di partenza si vedono due picchi a massa +16 e +32, cioè i picchi dovuti all'aggiunta al fenolo di partenza di un atomo di ossigeno



prima e un secondo atomo di ossigeno dopo, con la formazione del solfossido e del solfone (Fig. 5.15).

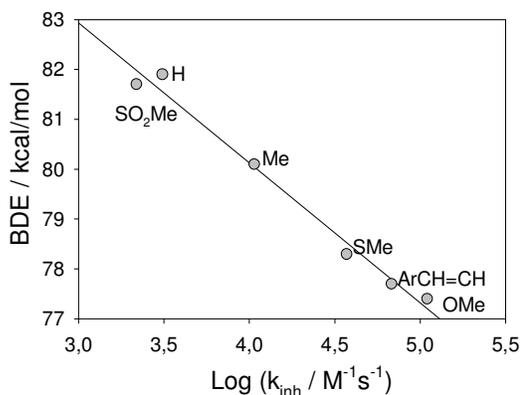
**Figura 5.15: Spettro ESI-MS dei prodotti formati dalla reazione dell'AIBN ( $5 \times 10^{-2}$  M) in AcN con il fenolo sostituito **1** (il campione ha reagito per 15 minuti)**

Possiamo affermare che la relativa efficacia dei derivati **1-6** come inibitori dell'ossidazione è in accordo con il ben noto effetto che i *para* sostituenti hanno sulla BDE dei fenoli e cioè che i sostituenti elettron-attrattori (SOR ed SO<sub>2</sub>R) aumentano la forza dei legami O-H, mentre i sostituenti elettro-donatori (SR) la fanno diminuire. Il contributo additivo del gruppo *p*-tiometil è di -3.6 kcal/mol, un valore intermedio tra quello del metile (-1.7 kcal/mol) e del metossi (-4.4 kcal/mol). Questo risultato dimostra che l'atomo di zolfo comporta una lunghezza di legame O-H più piccola rispetto all'ossigeno, similmente a quanto trovato nelle fenotiazine per la forza del legame N-H [Lucarini, M.; Pedrielli, P.;

Pedulli, G. F.; Valgimigli, L.; Gimes, D.; Tordo, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11546-11553].

È stato sorprendente notare che i valori di BDE del solfone **3** (81.7 kcal/mol) e del composto **6** (82.3 kcal/mol) sono molto vicini a quello trovato per il 2,6-di-terz-butilfenolo (81.9 kcal/mol); ciò sta a significare che il gruppo p-SO<sub>2</sub>R, che è considerato un forte elettrone-attrattore, si comporta come un atomo di idrogeno in *para*. Anche le costanti cinetiche di inibizione per **3** e **6**, 2.2 e 1.3 x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> rispettivamente, sono paragonabili a quella del 2,6-di-terz-butilfenolo (3.1 x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Questo punto meriterebbe maggiore attenzione e sarebbe da approfondire attraverso un approccio computazionale.

Non è stato possibile osservare alcuno spettro EPR dei radicali fenossile dei due solfossidi **2** e **5**, per cui non è stato possibile misurare le entalpie di dissociazione del legame O-H. Un modo per stimare questi valori consiste nel valutare le costanti di velocità  $k_{inh}$ , partendo dal fatto che le BDE dei fenoli che hanno lo stesso sostituente in *orto* variano linearmente con il logaritmo della  $k_{inh}$ . La figura 5.16 mostra il grafico ottenuto usando tutti i valori di BDE e di  $k_{inh}$  riportati in letteratura per i 2,6-di-ter-butilfenoli sostituiti in posizione 4. Dal grafico il valore di BDE del derivato **2** può essere stimato pari a 81.6 kcal/mol.



**Fig. 5.16:** – Entalpie di dissociazione del legame O-H (BDE) di 2,6-di-*tert*-butilfenoli sostituiti in 4 in funzione del logaritmo della costante di velocità per la loro reazione con i radicali perossili.

Il contributo additivo di un *o*-SCH<sub>3</sub> alla BDE dell'OH fenolico può essere determinato come -0.85 kcal/mol, sottraendo il contributo del fenolo e dei due *ter*-butili (*o*-CMe<sub>3</sub> = -1.75; *p*-CMe<sub>3</sub> = -1.9 kcal/mol) alla BDE (OH) del composto **8** [Brigati, G.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4828-4832]. Questo valore è significativamente più piccolo rispetto al contributo dato dal gruppo *p*-SCH<sub>3</sub> (-3.6 kcal/mol) a causa della formazione di un legame a idrogeno intramolecolare nel fenolo di partenza. In effetti lo spettro IR di figura 3 mostra un singolo picco, a 3375 cm<sup>-1</sup>, quindi nella regione sopra i 3000 cm<sup>-1</sup>, indicando così che la struttura adottata in soluzione a temperatura ambiente è quella in cui l'OH punta verso il gruppo SCH<sub>3</sub>.

È interessante paragonare questi numeri con i corrispondenti valori riportati per il gruppo metossile (vedi tabella 5.17) in posizione orto e para, e cioè -0.2 e 4.4 [Brigati, G.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4828-4832].

	BDE(OH) (kcal/mol)	
	SCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<i>orto</i>	-0.85	-0.2
<i>para</i>	-3.6	-4.4

**Tabella 5.17: Effetto additivo dei sostituenti tiometile e metossile sulla BDE (O-H)**

È evidente quindi che il legame a idrogeno intramolecolare dell'OH fenolico con il gruppo SCH<sub>3</sub> adiacente è più debole rispetto a quello con il metossile.

Un interessante osservazione è stata fatta valutando la grande differenza tra i valori di  $k_{inh}$  e di BDE dei composti **8** e **9**, entrambi aventi un sostituito tio in *orto* al gruppo ossidrilico. Il bisfenolo **9** è 54 volte più reattivo dell'**8**, invece che solo due volte, come da aspettarsi. Questa differenza può essere razionalizzata sulla base della struttura dei due antiossidanti. Nell'*o*-metiltio-fenolo **8**, legato

intramolecolarmente con legame a idrogeno, il ponte tra l'idrogeno ossidrilico e l'atomo di zolfo adiacente (vedi schema 2) incrementa l'energia di dissociazione del legame O-H stabilizzando il fenolo di partenza e rendendo più difficile, per ragioni steriche, l'approccio dei radicali perossili al gruppo O-H. Il risultato è una minore reattività verso l'attacco dei radicali sia per ragioni termodinamiche che cinetiche.

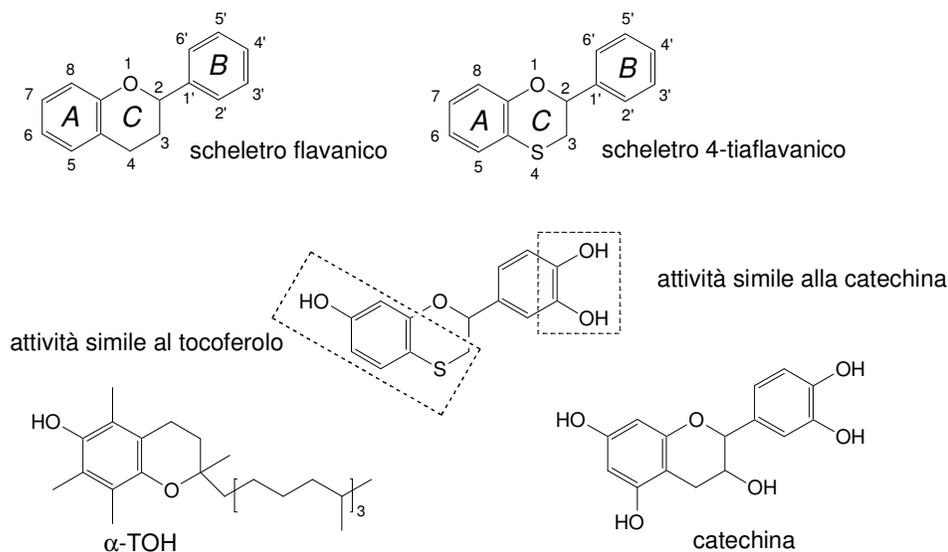
Nel bisfenolo **9** invece, il gruppo OH legato con legame a idrogeno intramolecolare allo zolfo dovrebbe essere scarsamente reattivo come in **8**, laddove il secondo O-H, dando un legame più debole (presumibilmente legandosi agli elettroni  $\pi$  dell'altro anello benzenico) è meno costretto nella struttura della molecola e quindi più accessibile ai radicali perossili. Così, l'atomo di idrogeno del secondo gruppo O-H può essere estratto più facilmente poiché è meno ingombrato stericamente e caratterizzato da una forza di legame minore, infatti il valore della BDE (O-H) del composto **9** è più basso di 1.2 kcal/mol rispetto al valore della molecola **8**.

## ***5.2 Attività antiossidante e antiradicalica di 4-Tiaflavani variamente sostituiti***

Sulla base dei risultati ottenuti e dell'interesse suscitato da queste molecole, recentemente è stata sintetizzata una nuova classe di fenoli contenenti zolfo, chiamati 4-tiaflavani, aventi un atomo di zolfo in posizione 4 dell'anello C. [Amorati, R.; Fumo, M.G.; Pedulli, G.F.; Menichetti, S.; Pagliuca, C.; Viglianisi, C.; *Helv. Chim. Acta*, 89, **2006**, 2462-2472].

Abbiamo determinato l'attività antiossidante di questi tiaflavani idrossi-sostituiti, mostrati in figura 5.19, misurando la loro abilità nell'inibire l'autossidazione dello stirene o del cumene. Questi derivati eterociclici, se opportunamente sostituiti, sono capaci di mimare l'attività antiradicalica sia dei flavonoidi aventi

un gruppo catecolico sull'anello B (come la catechina) sia dei tocoferoli (la vit. E) proprio grazie al nucleo del tiacromanolo (anelli A e C) (fig. 5.18).



**Figura 5.18: Scheletri del flavano e del 4-tiaflavano. La seconda struttura mostra il nucleo tiacromanolico.**

L'ottimizzazione della struttura di questi composti risulta un obiettivo di notevole interesse al fine di sviluppare antiossidanti sintetici in grado di soddisfare anche altri criteri, come una buona solubilità, biodisponibilità ed assenza di tossicità. Non di meno gli idrossi-tiaflavani discussi in questa parte hanno mostrato una efficace protezione *in vitro* contro il danno ossidativo al DNA causato sia dai radicali perossili sia dagli ossidrili derivanti dalla reazione di Fenton [Lodovici, M.; Menichetti, S.; Viglianisi, C.; Caldini, S.; Giuliani, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1957].

A tal proposito sono state valutate le attività anti-radicaliche di questi tiaflavani misurandone la loro abilità di decolorare il radicale DPPH<sup>•</sup> in soluzione di metanolo, abilità espressa come SC<sub>50</sub> [Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. *Food Sci. Technol.* **1995**, 28, 25]. I risultati ottenuti sono stati poi paragonati a quelli ottenuti misurando le costanti cinetiche di velocità  $k_{inh}$  per la reazione di estrazione dell'idrogeno da parte dei radicali perossili durante

l'autossidazione del cumene in presenza di questi inibitori. Dobbiamo ricordare però, come già detto nel capitolo 3, che la decolorazione del DPPH• viene misurata dopo un definito periodo di tempo (circa 20 minuti) [Menichetti, S., Aversa, M. C.; Cimino, F.; Contini, A.; Viglianisi, C.; Tomaino, A., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3066], quindi questo metodo riflette più la stechiometria che la velocità del processo di inibizione [Roginsky, V.; Lissi, E. A., *Food Chem.* **2005**, 92, 235]. Inoltre c'è da sottolineare che c'è una relazione strutturale molto piccola tra il DPPH• e i radicali liberi realmente responsabili dello stress ossidativo (essenzialmente radicali perossili ROO•) [Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C., *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2309].

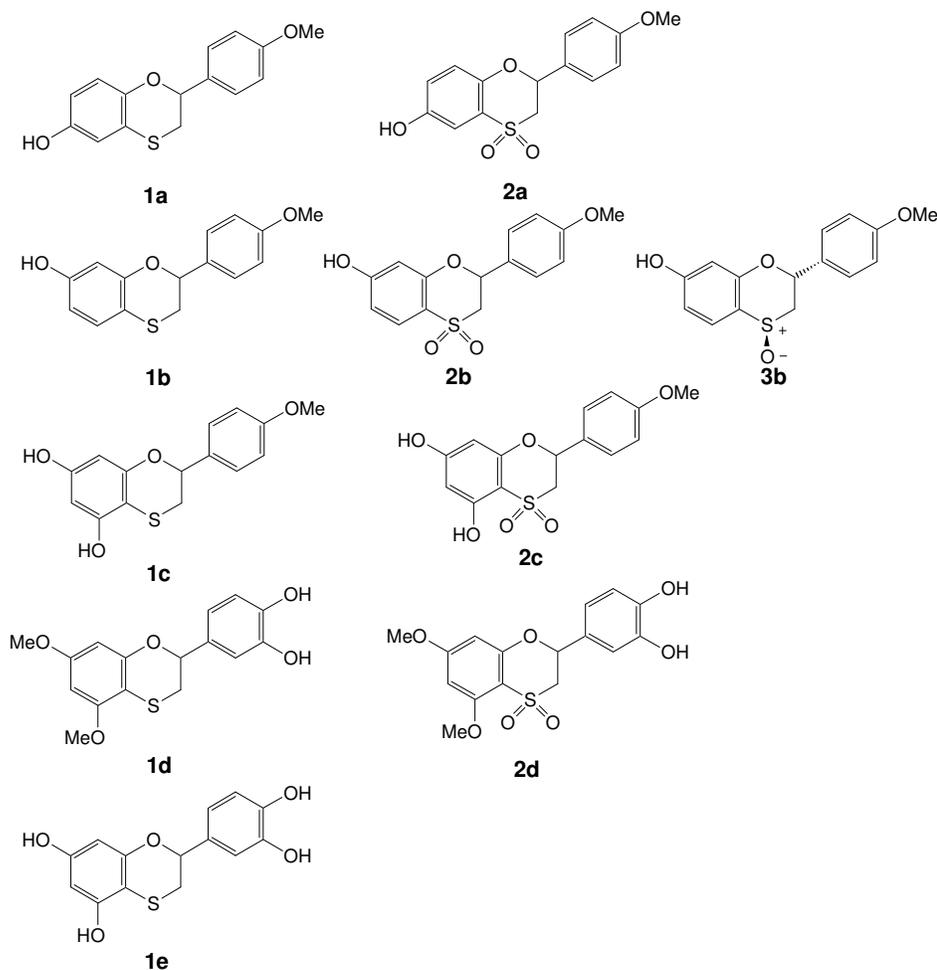


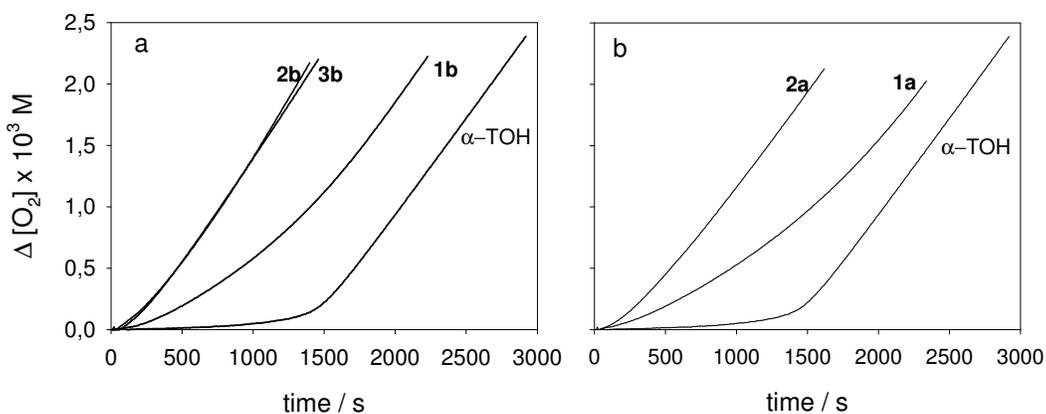
Figura 5.19: Strutture dei tiaflavani di cui è stata valutata l'attività antiossidante

I valori di  $k_{inh}$  sono stati misurati con la seguente equazione cinetica (5.20)

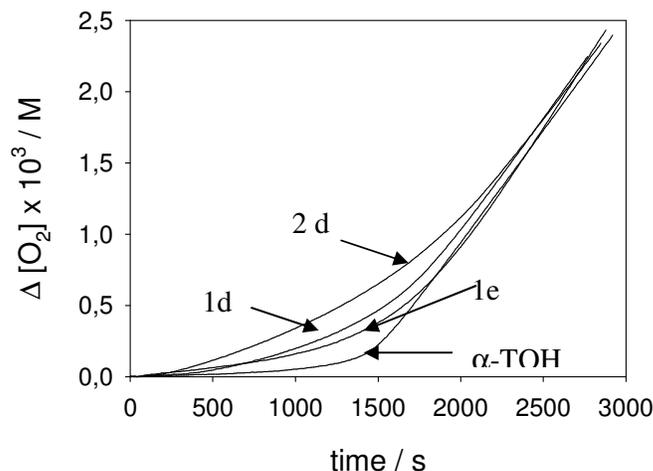
$$\frac{R_{ox,0}}{R_{ox}} - \frac{R_{ox}}{R_{ox,0}} = \frac{nk_{inh}[AH]_0}{\sqrt{2k_t R_i}} \quad (5.20)$$

Questa equazione permette di misurare la  $k_{inh}$  anche quando le velocità di inibizione e di terminazione della catena di autossidazione sono paragonabili. L'uso di questa equazione prevede la conoscenza della velocità di iniziazione, l' $R_i$ , la quale viene determinata in precedenti esperimenti usando un fenolo di riferimento (l' $\alpha$ -TOH). La costante di terminazione  $2k_t$  per la ricombinazione dei radicali perossili è riportata in letteratura [Enes, R. F.; Tomè, A. C.; Cavaleiro J. A. S.; Amorati S.; Fumo, M. G.; Valgimigli, L.; Pedulli, G. F. *Chem.- Eur. J.* **2006**, 12, 4646] ed è uguale a  $4.2 \times 10^7$  e  $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  rispettivamente per i radicali stiril-perossili e i cumil-perossili.

Le figure 5.21 e 5.22 mostrano come gli antiossidanti contenenti il nucleo catecolico, i composti **1d**, **2d** e **1e**, danno dei periodi di inibizione molto chiari e distinti.

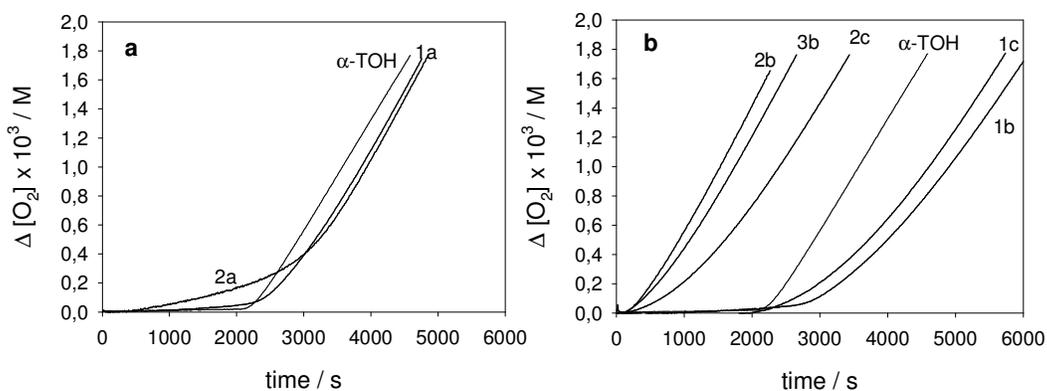


**Figura 5.21:** Tracciati del consumo di ossigeno durante l'autossidazione di stirene (4.3 M), iniziata da AMVN (5 mM) in clorobenzene in presenza di  $\alpha$ -tocoferolo ( $\alpha$ -TOH; 5  $\mu\text{M}$ ) e tiaflavani (5  $\mu\text{M}$ ) contenenti a) l'atomo di zolfo e b) l'atomo di ossigeno in posizione *para* rispetto al gruppo fenolico OH dell'anello A.



**Figura 5.22:** Consumo di ossigeno a 30°C durante l'autossidazione di stirene (4.3 M), iniziata da AMVN (5 mM) in clorobenzene in presenza dei tiaflavani contenenti l'anello catecolico (1d, 1e, 2d) e  $\alpha$ -tocoferolo (5  $\mu$ M).

Usando il cumene riusciamo a evidenziare il tratto inibito anche nei derivati meno reattivi, e quindi possiamo misurare l' $n$  anche di composti come l'**1a**, l'**1b**, il **2a** e l'**1c**.



**Figura 5.23:** Consumo di ossigeno a 30°C durante l'autossidazione del cumene (7.1 M), iniziata da AMVN (5 mM) in presenza dei tiaflavani (5 mM) contenenti a) l'atomo di ossigeno e b) l'atomo di zolfo in posizione para rispetto al gruppo OH dell'anello A.

In tabella 5.24 sono riportati i valori sperimentali delle costanti di velocità  $k_{inh}$  e i valori di  $SC_{50}$  pubblicati precedentemente [Menichetti, S.; Aversa, M. C.; Cimino, F.; Contini, A.; Viglianisi, C.; Tomaino, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3066].

**Tabella 5.24: Parametri dell'attività antiossidante e antiradicalica per i derivati 1, 2 e 3b**

	Composto	$k_{inh} / M^{-1}s^{-1}$ <sup>a)</sup>	$n^a)$	$SC_{50} / \mu M$ <sup>b)</sup>
1	<b>1a</b>	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^5$	2.2 <sup>c)</sup>	23
2	<b>2a</b>	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^4$ <sup>c)</sup>	2.4 <sup>c)</sup>	210
3	<b>1b</b>	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	2.9 <sup>c)</sup>	18
4	<b>2b</b>	$< 10^3$	n.d. <sup>d)</sup>	> 300
5	<b>3b</b>	$< 10^3$	n.d.	> 300
6	<b>1c</b>	$(3.9 \pm 0.8) \times 10^5$	2.8 <sup>c)</sup>	12
7	<b>2c</b>	$(2.3 \pm 0.5) \times 10^3$ <sup>c)</sup>	2 <sup>e)</sup>	> 300
8	<b>1d</b>	$(5.5 \pm 1.1) \times 10^5$	1.7	16
9	<b>2d</b>	$(2.6 \pm 0.5) \times 10^5$	1.8	15
10	<b>1e</b>	$(6.8 \pm 1.3) \times 10^5$	2.1	8
11	catecolo	$(5.3 \pm 0.5) \times 10^5$	1.9	
12	$\alpha$ -TOH	$3.2 \times 10^6$ <sup>f)</sup>	2	

<sup>a)</sup> Misurato in stirene, media di tre misure. L'errore nella determinazione di n è  $\pm 0.2$ ;

<sup>b)</sup> Concentrazione di antiossidante che causa la diminuzione del 50% dell'assorbanza di 100  $\mu M$  di DPPH•, 20 minuti dopo il mescolamento. <sup>c)</sup> Ottenuto in cumene. <sup>d)</sup> Non determinato. <sup>e)</sup> Valore assunto (vedi testo). <sup>f)</sup> Dati dal rif.: Burton, G. W.; Doba, T.; Gabe, E. J.; Hughes, L.; Lee, F. L.; Prasad, L.; Ingold, K. U.; *J. Org. Chem. Soc.* 1985, 107, 7053.

Un primo esame dei dati evidenzia che la presenza del gruppo catecolico dà un grosso contributo all'efficacia antiossidante di questi composti, indipendentemente dalla natura della parte tiocromanolica, dalla presenza dei sostituenti OH e dallo stato di ossidazione dell'atomo di zolfo. Prendendo in considerazione i tiaflavani **1d** (con due gruppi metili), **1e** (con due gruppi OH) e il **2d** (il solfene) tutti contenenti un gruppo catecolico, essi hanno delle costanti cinetiche che vanno da  $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , valori molto simili a quelli del catecolo stesso ( $5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Tenendo conto che l' $\alpha$ -TOH ha una  $k_{inh}$  di  $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e che il BHT (2,6-di-terz-butil-4-metilfenolo) e il BHA (2,6-di-terz-butil-4-metossifenolo), due comuni antiossidanti sintetici, hanno una  $k_{inh}$  rispettivamente di  $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Burton, G. W.; Doba, T.; Gabe, E. J.; Hughes, L.; Lee, F. L.; Prasad, L.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7053], i tiaflavani **1d**, **1e** e **2d** risultano dei buoni inibitori. (Fig. 5.22).

Un'altra serie di antiossidanti ad attività moderata è rappresentata dai tiaflavani **1a-c**, contenenti lo zolfo nel suo stato di ossidazione più basso, con  $k_{inh}$  che vanno da  $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $3.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Un'interessante osservazione va fatta per i composti **1a** e **1b**, che hanno un solo gruppo OH nell'anello aromatico A. (Fig. 5.23). Il derivato **1b**, con il gruppo OH che può coniugare con l'atomo di zolfo eterociclico, è leggermente meno efficace del primo che ha un atomo di ossigeno, anziché lo zolfo, in posizione coniugata con l'OH. Questo comportamento è in linea con i precedenti dati riportati da Ingold e collaboratori [Zahalka, H. A.; Robillard, B.; Hughes, L.; Lusztyk, J.; Burton, G. W.; Janzen, E. G.; Kotake, Y.; Ingold, K. U. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3739] sull'attività del sintetico tia-tocoferolo e con i nostri recenti dati sull'attività antiossidante di fenoli aciclici tio-sostituiti [Amorati, R.; Fumo, M. G.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F.; Menichetti, S. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6325]. Questi dati confermano i risultati ottenuti con i 2,6-di-terz-butilfenoli sostituiti, visti in precedenza (paragrafo 5.1) [Amorati, R.; Fumo, M. G.; Menichetti, S.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F., *J. Org. Chem.* **2006**, 71(17), 6325-6332].

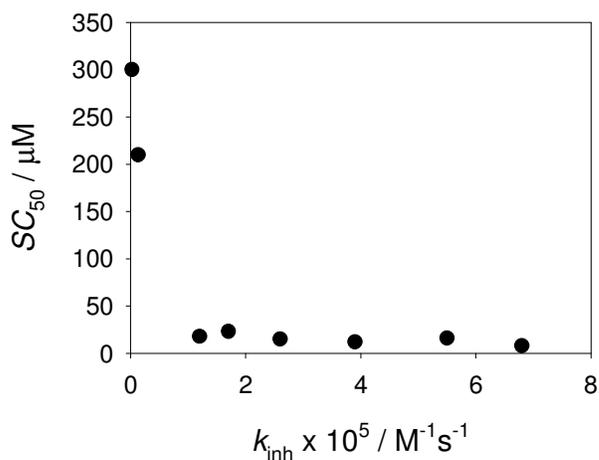
L'introduzione di un altro gruppo OH sull'anello A, come nel derivato **1c**, incrementa l'attività antiossidante della molecola che, vediamo dalla tabella, possiede un  $k_{inh}$  simile a quella dei composti con il nucleo catecolico. Questo aumento sembra sia dovuto sostanzialmente ad effetti elettronici, poiché il secondo gruppo OH sul carbonio 5 è presumibilmente legato al vicino atomo di zolfo con un legame idrogeno che lo rende meno disponibile per l'estrazione da parte del radicale perossile.

L'ossidazione dello zolfo bivalente sull'anello C a stati di ossidazione più alti è critica per l'attività antiossidante di queste molecole. Come si vede dalla tabella e dai tracciati di autossidazione (Fig. 5.21 e 5.23) i solfoni **2b**, **2c** e il solfossido **3b** non mostrano un significativo effetto di ritardo sull'autossidazione dello stirene o del cumene. I risultati sono razionalizzati considerando il forte effetto elettron-attrattore esercitato dal solfone e dal solfossido, il quale riduce notevolmente l'abilità dell'OH fenolico di reagire con i radicali perossili. L'ossidazione dei solfuri a solfoni influisce anche sull'attività dei tiaflavani contenenti il catecolo, sebbene meno fortemente (vedi composti **1d** e **2d**). Questi risultati indicano che ogni modificazione strutturale su queste molecole, anche su posizioni che non sono direttamente coinvolte nell'interazione con i radicali perossili, possono influenzare i risultati desiderati.

Un'analisi del parametro  $n$ , cioè il numero di radicali intrappolati da ciascuna molecola di inibitore, mostra che questi tiaflavani si comportano come i classici antiossidanti interruttori di catena. Alcune eccezioni appaiono in figura 5.23: i tiaflavani in cui il gruppo OH fenolico coniuga con l'atomo di zolfo (**1b** e **1c**) mostrano che, alla fine del ben evidente periodo di inibizione, corrispondente a un  $n = 2$ , vi è un ritardo nella velocità di consumo dell'ossigeno. Questo effetto, visibile solo qualora si usi il cumene come substrato ossidabile, è molto probabilmente dovuto a una residua attività antiossidante di prodotti ossidati della reazione. Anche il comportamento del composto **1e** risulta alquanto strano, in quanto questa molecola inibisce la reazione di autossidazione dello stirene per un lasso di tempo molto simile a quello del derivato **1d**, nonostante il fatto che il

primo contenga sia il nucleo cromanolico sia quello catecolico, e quindi ci saremmo aspettati un periodo di inibizione lungo il doppio.

Per paragonare quindi i risultati ottenuti con due tecniche differenti abbiamo messo in relazione, nel seguente grafico (Fig.: 5.24), i valori delle costanti cinetiche  $k_{inh}$  dei tiaflavani studiati con i corrispondenti valori delle  $SC_{50}$  ottenuti precedentemente. È evidente che i tiaflavani debbano essere suddivisi in due gruppi, a seconda che abbiano una  $k_{inh}$  più bassa o più alta di  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . I valori della  $SC_{50}$  saranno rispettivamente molto più alti di 25 e o minori o uguali a 25, senza alcuna dipendenza lineare dalle costanti cinetiche di velocità.



**Figura 5.24: Grafico della relazione esistente tra la  $SC_{50}$  e la costante di inibizione  $k_{inh}$  per i derivati 1-3**

Per comprendere e razionalizzare questa osservazione dobbiamo considerare che il test del DPPH• consiste nel misurare, in soluzione alcolica (MeOH), la concentrazione di antiossidante che causa il 50% di diminuzione dell'assorbanza di 100  $\mu\text{M}$  di DPPH• dopo 20 minuti. Come evidenziato da Berset e collaboratori [Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Food Sci. Technol.* **1995**, 28, 25] con buoni antiossidanti come l'acido ascorbico o il tocoferolo, la reazione raggiunge rapidamente lo stato stazionario e il valore di  $SC_{50}$  riflette soltanto la

stechiometria della reazione, cioè il numero di radicali intrappolati da ogni molecola di antiossidante. Al contrario, con antiossidanti meno efficaci, i valori di  $SC_{50}$  tengono conto sia della stechiometria sia della cinetica di inibizione, permettendo così una stima della reattività dei composti testati. In questo caso, ci si aspettava che il valore di  $SC_{50}$  per gli antiossidanti molto efficaci, capaci di intrappolare due radicali per ciascuna molecola, fosse di 25  $\mu\text{M}$ , essendo la concentrazione iniziale di DPPH• di 100  $\mu\text{M}$ . Quindi i valori trovati di 23 e 28  $\mu\text{M}$  per **1a** e **1b**, rispettivamente sembrano corrispondere ai fattori stechiometrici di questi due antiossidanti ( $n = 2.2$  e  $2.9$ , rispettivamente). Nel caso dei tre derivati aventi il catecolo, gli anomali valori di  $SC_{50}$  ottenuti sono una chiara indicazione che  $n$  è maggiore di due. Questo risultato è probabilmente dovuto all'intervento di reazioni secondarie che rigenerano le strutture catecoliche dall'*orto*-chinone inizialmente formato nell'intrappolamento di due radicali DPPH•. È stato recentemente riportato che gli esteri dell'acido protocatecoico (= 3,4-di-idrossibenzoato) in soluzioni alcoliche siano in grado di intrappolare circa 5 equivalenti di DPPH• attraverso un complesso meccanismo, il quale implica la riduzione dell'intermedio *orto*-chinone attraverso una addizione nucleofila di una molecola di alcool, con la formazione di nuovi derivati catecolici che, uno alla volta, possono reagire con i radicali DPPH• [Saito, S.; Okamoto, Y.; Kawabata, J. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004, 68, 1221; Saito, S.; Gao, H.; Kawabata, J. *Helv. Chim. Acta* 2006, 821].

Queste reazioni secondarie però non sembrano essere importanti nei solventi non alcolici, dove  $n$  è infatti sempre molto prossimo a 2.

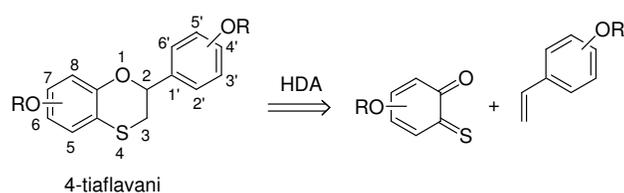
L'ultimo gruppo di questi tiaflavani studiati comprende i solfoni **2a-c** e il solfossido **3b**. Questi composti si sono rivelati per niente reattivi sia verso i radicali perossili sia verso il DPPH•, cosicché non è stato possibile esprimere alcuna correlazione. Per tre di essi, i valori di  $SC_{50}$  sono fuori dal range di valori misurabile, ad eccezione del **2a** e per due di essi i valori di  $k_{inh}$  sono troppo bassi per essere determinati. Evidentemente questi tiaflavani sono antiossidanti molto scarsi. Abbiamo quindi avuto conferma di come tutti i composti contenenti un

nucleo catecolico sull'anello B siano buoni antiossidanti, indipendentemente dalle sostituzioni sulla porzione cromanolica. In assenza del nucleo catecolico, la sostituzione sull'anello A dei gruppi OH conferisce alle molecole un'attività antiossidante soddisfacente, a meno che lo zolfo non sia nei suoi stati di ossidazione più alti.

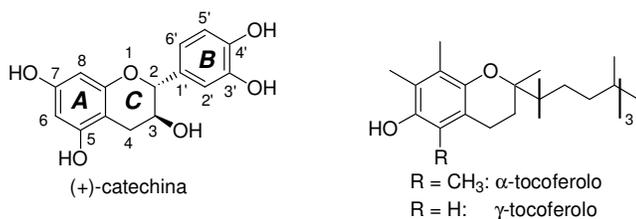
I test basati sul DPPH● possono essere utili per uno screening preliminare, ma per evitare conclusioni errate bisogna tenere a mente che il radicale DPPH● ha caratteristiche e reattività diverse da quelle dei radicali biologicamente rilevanti.

### 5.3 Attività antiossidante di analoghi dei cromanoli contenenti zolfo

Queste molecole sono facilmente sintetizzabili attraverso una reazione di Dies-Alder tra un diene (specie elettrone-povera), in questo caso un *o*-tiochinone



sostituito e un dienofilo (una specie elettrone-ricca), in questo caso un opportuno alchene (Fig. 5.25)



**Figura 5.25:** Schema della sintesi di questi composti.

Questa classe di molecole fenoliche presenta potenzialità interessanti, in quanto entrambe le porzioni costituenti la molecola possono essere facilmente modificate per conferire al prodotto finale le caratteristiche desiderate.

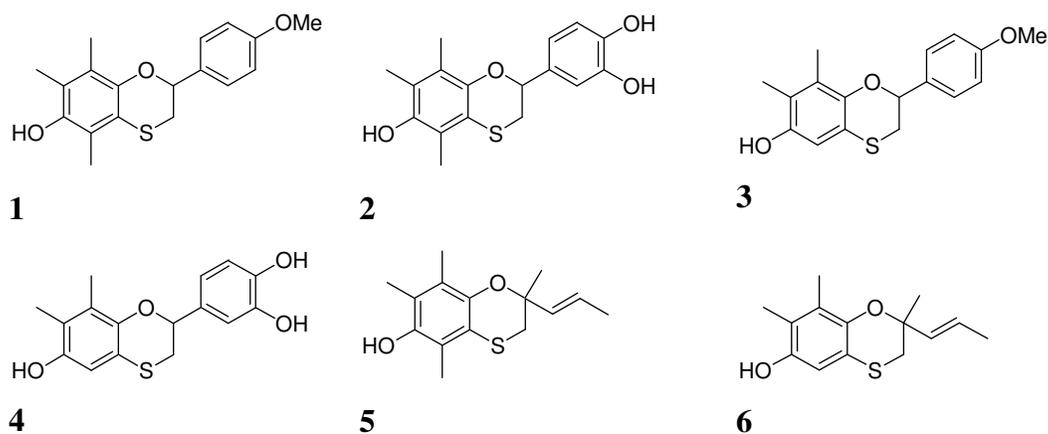
Innanzitutto abbiamo focalizzato l'attenzione sulla polioidrossilazione di entrambi gli anelli aromatici per ottenere analoghi dei flavonoidi contenenti l'atomo di zolfo [Capozzi, G.; Lo Nostro, P.; Menichetti, S.; Nativi C.; Sarri, P. *Chem.*

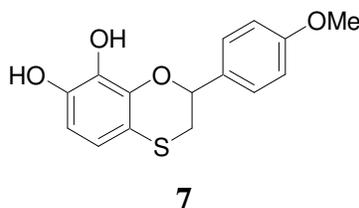
*Commun.*, **2001**, 551-552; Menichetti, S.; Aversa, M. C.; Cimino, F.; Contini, A.; Viglianisi, C.; Tomaino, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3066-3072].

È stato ipotizzato che l'introduzione di un gruppo metile nell'anello A, per similarità con l'anello dell' $\alpha$ -tocoferolo, potesse incrementare l'attività antiossidante, laddove le sostituzioni sull'anello B potevano essere convenienti per conferire alla molecola caratteristiche aggiuntive come antiossidante. Un'attuale tendenza è proprio quella di connettere parti diverse di una molecola con frammenti molecolari biologicamente attivi.

La struttura base dalla quale siamo partiti con questo studio è stata quella con l'OH fenolico in *para* all'atomo di ossigeno eterociclico, poiché è stato dimostrato che un atomo di zolfo coniugato con l'OH impartisce a questi composti un'attività antiossidante minore rispetto all'ossigeno [Burton, G.W.; Doba, T.; Gabe, E.J.; Hughes, L.; Lee, F.L.; Prasad, L.; Ingold, K.U. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7053-7065; Amorati, R.; Fumo, M. G.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F.; Menichetti, S. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6325].

Per caratterizzare le proprietà inibitorie dei nuclei tiacromanolici e il loro comportamento per la presenza di un anello B idrossilato, abbiamo intrapreso uno studio cinetico, termodinamico e teorico molto dettagliato, sintetizzando i composti **1-7** (Fig. 5.26):





**Fig. 5.26: Strutture dei tiaflavani analizzati in questo lavoro**

La determinazione della costante cinetica di velocità per la reazione con i radicali perossili, la  $k_{inh}$ , è stata fatta studiando l'inibizione di un'autossidazione dello stirene, iniziata termicamente e condotta in condizioni controllate. Durante il periodo inibito, la velocità di consumo dell'ossigeno è data dall'eq. 5.27:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{k_p[RH]R_i}{n k_{inh}[AH]} \quad (5.27)$$

Nel caso degli antiossidanti monofunzionali (**1**, **3**, **4**, **6**, **7** e il catecolo usato come modello nel caso dei tiacromanoli con questo tipo di nucleo come sostituente) i valori di  $k_{inh}$  sono stati calcolati usando la forma integrata dell'eq. 5.31 (eq. 5.28):

$$\Delta[O_2]_t = -\frac{k_p}{k_{inh}}[RH]\ln(1-t/\tau) \quad (5.28)$$

In presenza di una miscela di due generici antiossidanti ( $Ar_1OH$  e  $Ar_2OH$ ), il consumo di ossigeno è dato dall'equazione 5.33, dipendendo dalla  $k_{inh}$  e dal coefficiente stechiometrico  $n$  di entrambi gli inibitori. Con antiossidanti bifunzionali, cioè con due diverse porzioni presenti contemporaneamente, entrambi contribuenti all'attività antiossidante, l'eq. 5.29 vale ancora se le due parti sono isolate e non coniugano fra di loro, così che ciascuna di esse reagisca in maniera indipendente.

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{k_p[\text{styrene}]R_i}{n_1k_{inh1}[Ar_1OH] + n_2k_{inh2}[Ar_2OH]} \quad (5.29)$$

I valori sperimentali ottenuti sono mostrati in tabella di seguito (tabella 5.30)

Antiossidante	$k_{inh} \times 10^{-6} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$n$
$\gamma$ -TOH	1.4 <sup>a</sup>	2
$\alpha$ -TOH	3.2 <sup>a</sup>	2
<b>1</b>	0.51 ± 0.02	1.7 ± 0.1
<b>2</b>	0.92 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.1

<b>3</b>	0.48 ± 0.02	1.7 ± 0.1
<b>4</b>	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1
<b>5</b>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.1
<b>6</b>	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1
<b>7</b>	0.42 ± 0.2	1.9 ± 0.1
Catecolo	0.52 ± 0.02	1.9 ± 0.1

**Tabella 5.30: Costanti cinetiche di velocità per la reazione con i radicali perossili ( $k_{inh}$ ) e coefficienti stechiometrici ( $n$ ) misurati in una miscela di stirene /clorobenzene per i tiacromanoli e relativi composti.**

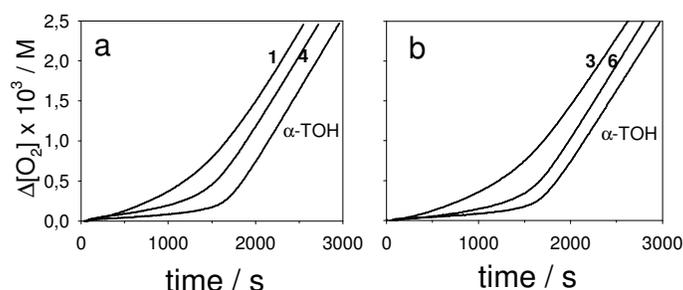
Calcolando quindi i valori delle  $k_{inh}$  sono stati studiati i contributi dei vari gruppi e dei sostituenti all'attività dei tiacromanoli. Analizzando i risultati ottenuti, osservando innanzitutto la parte a struttura cromanolica, il confronto tra i composti **1** e **4** e il **3** con il **6**, differenti solo per la presenza di un sostituente metile sul carbonio 5, si vede che la  $k_{inh}$  è più alta quando entrambe le posizioni orto al gruppo ossidrilico dell'anello A contengono sostituenti alchili (Fig. 5.35). Questo comportamento è comune anche per altri antiossidanti ed è spiegato in termini di un bilancio favorevole tra l'effetto elettron-donatore di un gruppo metile, che riduce la BDE del legame OH e l'ingombro sterico attorno all'OH fenolico [Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G. F.; Cabiddu, S.; Fattuoni, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9259-9263].

È interessante notare come i rapporti tra le costanti  $k_{inh}$  dei due composti **1-4** e **3-6** (0.4) siano quasi uguali a quelli trovati fra il  $\gamma$ - e l' $\alpha$ -tocoferolo (0.44) [Burton, G.W.; Doba, T.; Gabe, E.J.; Hughes, L.; Lee, F.L.; Prasad, L.; Ingold, K.U. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7053-7065].

La presenza dell'atomo di zolfo nell'anello C dei tiacromanoli non apporta significativi miglioramenti alla loro attività antiossidante rispetto al tocoferolo, correlati strutturalmente. Il confronto tra i composti **1** e **3**, correlati al  $\gamma$ -

tocoferolo, e il **4** e il **6**, correlati all' $\alpha$ -tocoferolo mostra che i valori della  $k_{inh}$  nei tiacromanoli sono circa tre volte piú bassi.

La figura 5.31 mostra chiaramente l'efficacia antiossidante di **1**, **3**, **4**, **6** e dell' $\alpha$ -tocoferolo.

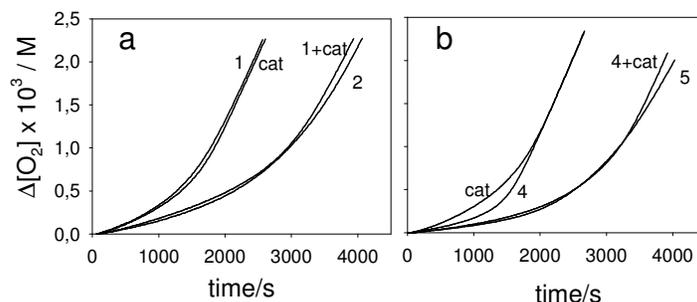


**Figura 5.31:** Grafici del consumo di ossigeno osservati durante l'autossidazione di stirene (4.3 M) iniziata da AMVN ( $5 \times 10^{-3}$  M) in una soluzione di clorobenzene a 30°C in presenza di  $\alpha$ -tocoferolo ( $\alpha$ -TOH) or tiacromanoli ( $5 \times 10^{-6}$  M).

I risultati ottenuti per i tiacromanoli, aventi differenti sostituenti all'atomo di carbonio in posizione 2 dell'anello C, sembrano indicare che la natura di questi gruppi non è rilevante nel determinare l'attività antiossidante di questi composti. Non c'è differenza tra le  $k_{inh}$  e gli  $n$  dei derivati **1** e **3** e per i derivati **4** e **6**, dove il sostituito legato al C<sub>2</sub> è, rispettivamente, un 4-metossifenile e un gruppo allile, come si vede in figura 5.30.

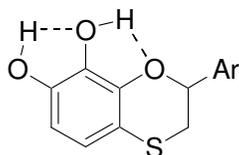
Nei tiacromanoli bifunzionali **2** e **5**, i valori delle due  $k_{inh}$  ottenuti mostrano che essi sono quasi simili a quelli ottenuti per i derivati **1** e **4** per il catecolo, rispettivamente, come conseguenza del fatto che le diverse porzioni agiscono in maniera indipendente. Per confermare questo comportamento, abbiamo studiato anche il comportamento di miscele equimolari di **1** col catecolo e di **4** col

catecolo. La figura 5.32 mostra come i due tracciati ottenuti dai derivati **2** e **5** siano quasi sovrapponibili a quelli delle due miscele.



**Figura 5.32.** Grafici del consumo di ossigeno osservati durante l'autossidazione di stirene (4.3 M) iniziata da AMVN ( $5 \times 10^{-3}$  M) in una soluzione di clorobenzene a  $30^\circ\text{C}$  in presenza di catecolo (cat,  $5 \times 10^{-6}$  M), tiacromanoli **1**, **2**, **4**, **5** ( $5 \times 10^{-6}$  M) e miscele 1:1 tra il catecolo e sia l' **1** che il **2** (ogni componente della miscela  $5 \times 10^{-6}$  M). Grafico a: analoghi del  $\alpha$ -tocoferolo; b: analoghi dell' $\alpha$ -tocoferolo

Abbiamo esaminato anche il composto **7** che è stato ottenuto introducendo 2 gruppi ossidrilici nell'anello A. Nonostante la presenza del gruppo *orto*-di-ossidrilico come nel catecolo e di due sostituenti elettron-donatori (i gruppi alcossile e alchiltio) il derivato **7** è caratterizzato da una moderata attività antiossidante poiché la sua  $k_{inh}$  è più bassa rispetto a quella del catecolo.



Questo comportamento è ragionevolmente attribuito alla formazione simultanea di due legami a idrogeno (vedi figura al lato) che riduce fortemente la reattività dei gruppi ossidrilici della molecola verso i radicali perossili. Ciò potrebbe essere non del tutto uno svantaggio nel caso in cui si utilizzino solventi polari poiché l'attività antiossidante di **7** sarebbe scarsamente dipendente dal legame idrogeno

con le molecole di solvente, a differenza dei catecoli la cui attività inibitoria è molto sensibile alla polarità del solvente [Foti, M. C.; Barclay, L. R. C.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12881-12888].

Per ottenere anche una stima termochimica dell'attività antiossidante dei tiacromanoli e dell'effetto dell'atomo di zolfo eterociclico nell'anello C, abbiamo determinato l'entalpia di dissociazione del legame OH nel tiacromanolo **4**, che è strutturalmente correlato all' $\alpha$ -tocoferolo.

I valori di BDE sono stati misurati usando la tecnica di equilibrizzazione radicalica EPR. La BDE del legame OH per il derivato **7** è pari a 78.9 kcal/mol, 1.8 kcal/mol più alta di quella dell' $\alpha$ -tocoferolo. Questa differenza, indicante una legame O-H più forte nel caso della molecola **7**, è in linea con i risultati cinetici e quindi con l'attività antiossidante più scarsa.

Concludendo, questa famiglia di composti, che ha aperto la strada a una serie di lavori su molecole ad attività antiossidante contenenti zolfo, si comporta da buoni inibitori dell'autossidazione dello stirene, essendo caratterizzati da una costante cinetica di velocità per la reazione con i radicali perossili solo tre volte circa più bassa rispetto a quella dei corrispondenti tocoferolo. Questo comportamento è stato spiegato in termini di un aumento della non-planarità dello scheletro molecolare quando lo zolfo è presente nella molecola, rispetto ai tocoferolo, con una conseguente riduzione della stabilizzazione dovuta alla corretta coniugazione degli elettroni del radicale fenossile. La semplicità nel poter aggiungere altri gruppi funzionali in questi composti è un'importante caratteristica la quale, in questi studi, è stata esplorata per introdurre delle funzioni sinergiche a quelle antiossidanti, ad esempio l'introduzione del gruppo orto-diidrossi nell'anello B.

Sebbene in questo caso non siano stati ottenuti vantaggi rispetto al comportamento delle miscele equimolari dei "genitori" non è da escludere che in sistemi più complessi, come le LDL e i liposomi, dove la diffusione degli

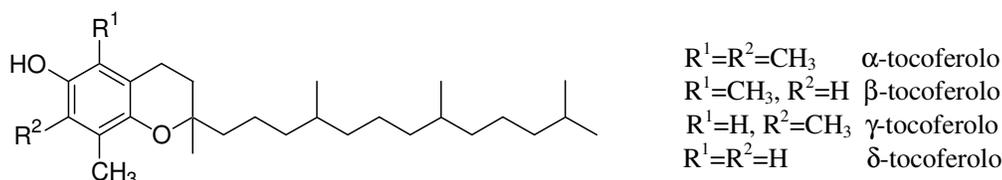
inibitori tra le particelle diventa uno step determinante per la velocità della reazione in totale, il legame covalente tra le porzioni antiossidanti potrebbe essere rilevante per aumentare l'attività di inibizione [Alessi, M.; Paul, T.; Scaiano, J. C.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6957-6965].

Di grande interesse sarebbe appunto ideare e studiare tiacromanoli aventi sostituenti utili per altre applicazioni, come l'ancoraggio di polimeri o nanoparticelle.

## CAPITOLO 6

### IL PROFILO ANTIOSSIDANTE DELL' $\alpha$ -SELENOTOCOFEROLO

Nello sviluppo di nuovi antiossidanti, al fine di rinforzare la nostra difesa contro lo stress ossidativo, la struttura dell'  $\alpha$ -tocoferolo (Fig. 6.1) rappresenta il più delle volte un naturale punto di partenza.



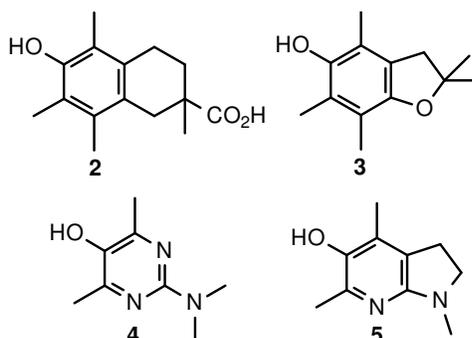
1

**Fig. 6.1:** La Vitamina E, termine generico per indicare una serie di cromanoli correlati strutturalmente, chiamati tocoferoli, di cui l'  $\alpha$ -tocoferolo è il più abbondante.

Le possibilità di variazione della struttura sono numerose.

Una ventina di anni fa, Ingold e collaboratori scoprirono che la riduzione dell'anello non aromatico da sei a cinque membri (2) apportava un significativo incremento dell'attività antiossidante, presumibilmente dovuto a una migliore stabilizzazione del radicale fenossile. La catena laterale dell'  $\alpha$ -Tocoferolo è stata variamente modificata per sintetizzare degli analoghi idrosolubili o con migliori proprietà farmacocinetiche (3). Recentemente variazioni nell'anello fenolico, esemplificate dai pirimidin-5-oli (4) e i piridin-3-oli (5), hanno prodotto antiossidanti con una migliore stabilità all'aria e una maggiore capacità di donare

un atomo di idrogeno [Pratt, D. A.; DiLabio, G. A.; Brigati, G.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4625; Wijtman, M.; Pratt, D. A.; Valgimigli, L.; DiLabio G.A.; Pedulli, G. F.; Porter, N. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4370].



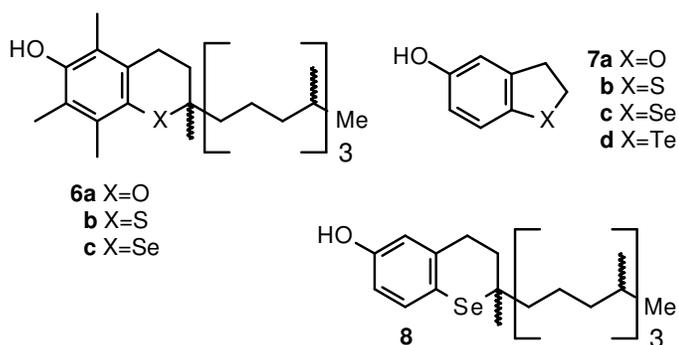
**Figura 6.2**

La natura dell'eteroatomo nell'anello eterociclico fuso è un altro target di studio. Gli antiossidanti basati sulle strutture dei piridinoli e dei pirimidinoli sopra menzionati usano delle sostituenti amminici per migliorare la potenza antiossidante. Ingold ha preparato l'analogo racemico dell' $\alpha$ -Tocoferolo contenente zolfo (**6b**) che si è rivelato essere meno efficace come donatore di un atomo di idrogeno rispetto al tocoferolo genitore (**6a**) [Zahalka, H. A.; Robillard, B.; Hughes, L.; Luszyk, J.; Burton, G. W.; Janzen, E. G.; Kotake, Y.; Ingold, K. U., *J. Org. Chem.* **1998**, 53, 3739].

Sull'onda di queste sintesi e studi sulle varie migliorie apportabili dai diversi sostituenti, sono stati sintetizzati e studiati una serie di analoghi sostituiti con calcogeni (**7a-d**) e, in particolare, il derivato sostituito con il selenio (**7c**) sembrava particolarmente promettente, in quanto rigenerato da un co-riducente [Malmstrom, J.; Jonsson, M.; Cotgreave, I. A.; Hammarstrom, L.; Sjodin, M.; Engman, L., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3434].

In precedenza era stato sintetizzato un analogo dell' $\alpha$ -tocoferolo sostituito col selenio, mancante solo del metile sull'anello aromatico (**8**), sebbene questo composto non sia mai stato studiato per la sua attività antiossidante [Al-Maharik,

N.; Engman, L.; Malmstrom, J.; Schiesser, C. H., J. Org. Chem. 2001, 66, 6286]. Per valutare l'efficacia di questi derivati contenenti selenio, abbiamo valutato l'attività antiossidante dell'analogo racemico dell' $\alpha$ -Tocoferolo contenente il selenio (**6c**), sintetizzato da Engman e collaboratori. (Fig. 6.3).

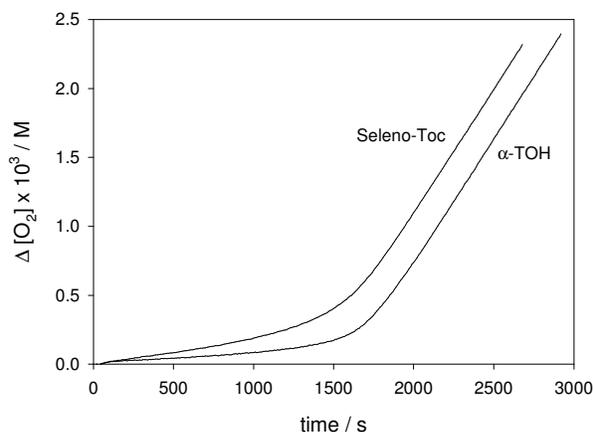


**Figura 6.3:** Strutture degli analoghi dell' $\alpha$ -tocoferolo oggetto dello studio

È stato misurato anche il valore della BDE (O-H) del seleno-tocoferolo usando la tecnica di equilibratura radicalica EPR.

Le misure cinetiche sono state effettuate studiando l'autossidazione inibita di un substrato ossidabile, in questo caso stirene, in presenza di seleno-tocoferolo

e  $\alpha$ -tocoferolo come antiossidante di riferimento (vedi Fig. 6.4).



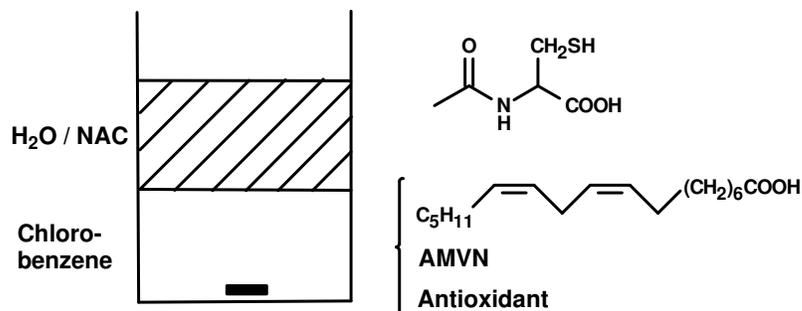
**Figura 6.4.** Consumo di ossigeno durante un'autossidazione di stirene (4.7 M) iniziata termicamente in clorobenzene a 30 °C, in presenza di AMVN

( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) come iniziatore e seleniotocoferolo (**6c**) o  $\alpha$ -tocoferolo (**6a**),  $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$ .

Il composto in esame, il **6c**, ha mostrato in stirene un chiaro periodo inibito,  $\tau$ , il che significa una netta inibizione del consumo di ossigeno. La  $k_{inh}$  misurata per questo composto,  $1.2 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e il coefficiente stechiometrico  $n = 1.9$ , sono molto simili a quelli dell' $\alpha$ -tocoferolo che, come già detto, ha una  $k_{inh}$  di  $3.2 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e un  $n = 2$ . Quindi il seleno-tocoferolo (**6c**) è soltanto leggermente meno attivo dell'analogo contenente ossigeno, in accordo con il valore di BDE(OH) leggermente più alto,  $78.1 \pm 0.3 \text{kcal mol}^{-1}$  del primo (il **6c**) contro  $77.15 \text{kcal mol}^{-1}$  dell' $\alpha$ -tocoferolo. Il valore della BDE dell'analogo contenente il selenio è approssimativamente  $0.95 \text{kcal mol}^{-1}$  più alto del valore della BDE dell' $\alpha$ -tocoferolo, in perfetto accordo con la differenza calcolata di  $0.94 \text{kcal mol}^{-1}$  [Shanks, D.; Frisell, H.; Ottosson, H.; Engman, L., *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 846-852].

Per valutare se il seleno-tocoferolo (**6c**) fosse rigenerabile da un co-riducente, esso è stato testato in un modello di perossidazione lipidica bi-fasica, come descritto nel seguente riferimento: [Malmstrom, J.; Jonsson, M.; Cotgreave, I. A.; Hammarstrom, L.; Sjodin, M.; Engman, L., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3434].

Brevemente, si tratta di un recipiente termostato contenente una soluzione clorobenzenica di acido linoleico (Fig. 6.5).



**Figura 6.5: Modello bifasico usato per studiare la rigenerazione degli antiossidanti interruttori di catena.**

Inizialmente, viene aggiunto l'antiossidante da testare seguito da una soluzione acquosa di un co-riducente (*N*-acetil-cisteina, NAC). La miscela viene agitata e portata all'equilibrio per 30 minuti prima di indurre l'ossidazione con l'aggiunta di una soluzione di azoiniziatore. L'ossidazione è seguita prelevando un campione di fase organica ogni 10 minuti, separando i componenti con HPLC (*High-Pressure Liquid Chromatography*), e monitorando la formazione di dieni coniugati a 234 nm.

In assenza di NAC, il seleno-tocoferolo ha un periodo di inibizione di 58 minuti, mentre l' $\alpha$ -tocoferolo ha un  $t_{inh}$  di 80 minuti. Il periodo d'inibizione dell'analogo **7c**, in presenza di NAC, aumenta fino a 320 minuti mentre ciò non avviene per l'analogo del seleno-tocoferolo (**6c**) (fig. 6.6). Quindi, sebbene il semplice analogo **7c** fosse rigenerabile, il seleno-tocoferolo **6c** non lo è [Kumar, S.; Johansson, H.; Engman, L.; Valgimigli, L.; Amorati, R.; Fumo, M. G.; Pedulli G. F., *J. Org. Chem.*, **2007**].

Il processo di rigenerazione più semplice dovrebbe coinvolgere il trasferimento di un atomo di idrogeno dal tiolo, contenuto nella fase acquosa, ai radicali fenossili formati nella fase organica. Questo meccanismo è possibile solo se l'entalpia di dissociazione del tiolo è più bassa, o al limite paragonabile, a quella dell'O-H fenolico e se la velocità del trasferimento di idrogeno è significativa [Amorati, R.; Ferroni, F.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L., *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9654-9658].

Sebbene non ci siano in letteratura dati sperimentali abbondanti sull'entalpia di dissociazione del legame S-H, sembra ragionevole assumere che la BDE del legame S-H sia compresa tra 85-90 kcal/mol [Calabr do Couto, P.; Costa Cabral, B. J.; Martino Simoes, J. A. *Chem. Phys. Lett.* 2006, 421, 504-507].

Quindi considerando che la BDE del legame O-H dei composti come l'analogo **6c** e **7c** abbia un valore compreso tra 76 e 81 kcal/mol, l'NAC molto probabilmente non agisce, come agente rigenerante, attraverso il trasferimento di un atomo di idrogeno.

Nel modello utilizzato da Engman, all'interfaccia tra la fase acquosa e la fase organica, sarebbe possibile la rigenerazione con un meccanismo di trasferimento

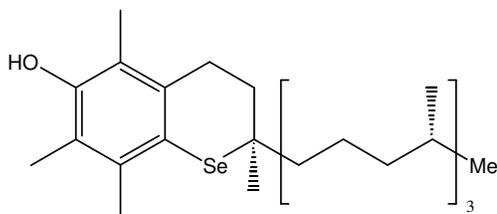
elettronico. I potenziali di riduzione dei due analoghi non sono valori tabulati né tantomeno facilmente misurabili, attraverso però opportuni calcoli e deduzioni si evidenzia che essi sono tali da rendere possibile il meccanismo di trasferimento elettronico.

Recentemente poi è stato riportato il potenziale di riduzione dell' NAC e sembra sia leggermente più positivo ( $\Delta E^\circ = + 63 \text{ mV}$ ) rispetto a quello del glutatione, il cui potenziale in acqua a  $25^\circ\text{C}$  e  $\text{pH} = 7$  è  $E^\circ = -240 \text{ mV}$  [ Schafer, F. Q.; Buettner, G. R., *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 30, 1191-1212]. Sembra quindi che la rigenerazione di composti come l'analogo **7c** dai loro radicali fenossili in fase acquosa, attraverso un trasferimento elettronico, sia una reazione possibile dal punto di vista termodinamico.

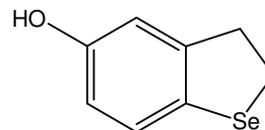
La differenza quindi tra il comportamento di **6c** (selenotocoferolo) e il **7c** potrebbe risiedere nel fatto che il primo si ossida più facilmente (BDE più bassa) e si riduce più difficilmente del secondo.

Considerando che il trasferimento elettronico avviene all'interfaccia tra fase acquosa e fase organica, anche la partizione dei radicali tra i due solventi potrebbe giocare un ruolo importante.

Dai risultati fin qui ottenuti, si può concludere che la rigenerabilità degli antiossidanti contenenti selenio nel sistema bifasico è favorita da un alto valore di BDE(OH) dell'antiossidante.



**Figura 6.6**      **Analogo 6 c**



**Analogo 7 c**



## CAPITOLO 7

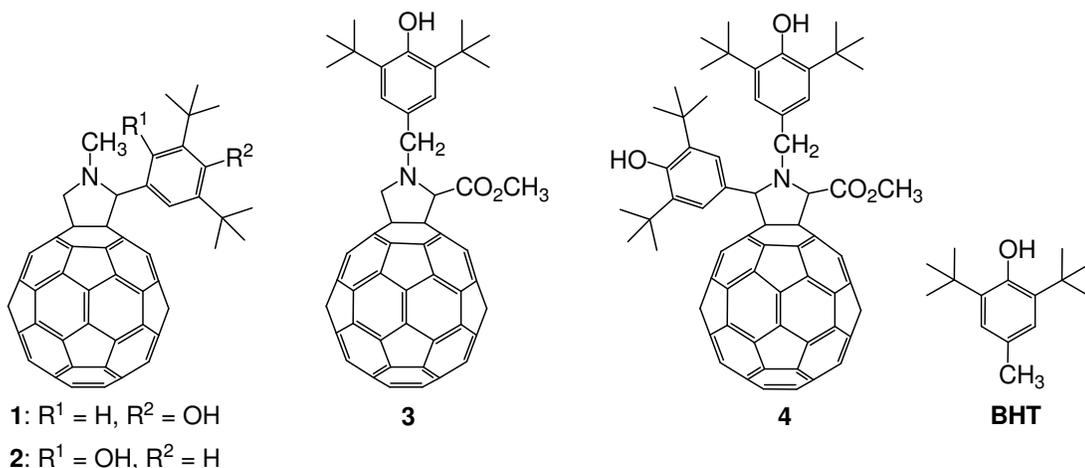
### L'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI FULLERENI MODIFICATI CONTENENTI BHT

Negli ultimi anni è stato dimostrato che i derivati dei fullereni possono essere usati come agenti protettivi contro le malattie neurodegenerative correlate allo stress ossidativo. [Dugan, L.L.; Lovett, E.G.; Quick, K.L.; Lotharius, J.; Lin, T.T.; O'Malley, K.L.; *Parkinsonism Relat. Disord.* **2001**, 7, 243-246].

Questa osservazione è direttamente correlata al fatto che i fullereni e i suoi derivati organici sembra possano intrappolare molti radicali per molecola: questi composti possono essere considerati come “spugne” di radicali. Per questo motivo il [60] fullerene può diventare una struttura di partenza per lo sviluppo di nuovi composti “scavengers” di radicali. Per esempio è stato dimostrato che un certo numero di derivati idrosolubili dei fullereni si comportano come potenti “scavengers” di ROS in culture cellulari e possono proteggere i cheratinociti della pelle umana dalle radiazioni UV e dal danno ossidativo causato dal *ter*-butil-idroperossido [Xiao, L.; Takada, H.; Maeda, K.; Haramoto, M.; Nobuhiko, M.; *Biomed. Pharmacoter.* **2005**, 59, 351-358].

Inoltre sono già stati sintetizzati derivati dei fullereni uniti covalentemente a molecole con note proprietà antiossidanti, come i flavonoidi. [De La Torre M. D. L.; Rodrigues, A.G.P.; Tomè A.C.; Silva, A.M.S.; Cavaleiro, J.A.S; *Tetrahedron* **2004**, 60, 3581-3592].

Abbiamo misurato l'attività antiossidante di quattro derivati del C<sub>60</sub> (figura 7.1), incorporanti uno o due gruppi arilici strutturalmente correlati al BHT, un antiossidante fenolico dei più utilizzati in campo industriale.



**Figura 7.1: Strutture dei fullereni incorporanti il BHT sintetizzati**

Per effettuare valutazioni sulle possibili variazioni nel comportamento antiossidante di strutture correlate al BHT come conseguenza della sua coniugazione con il [60]fullerene, e in particolare se ci fosse un effetto sinergico tra le due porzioni di molecola, abbiamo misurato uno dei due parametri fisico-chimici che sono cruciali nel determinare la facilità con cui gli antiossidanti fenolici riducono la velocità di ossidazione di substrati ossidabili e cioè la costante di velocità per la reazione dell'antiossidante con i radicali perossili, la  $k_{inh}$  [G. W. Burton, T. Doba, E. J. Gabe, L. Hughes, F.L. Lee, L. Prasad, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7053-7065; J. A. Howard in *Free Radicals* (Ed. J. K. Kochi), Wiley-Interscience, New York, **1975**, Vol. 2, Chapter 12], mentre sempre nel mio laboratorio è stata determinata la BDE del legame OH, cioè l'energia di dissociazione di questo legame quando si rompe durante la reazione [M. Lucarini, P. Pedrielli, G. F. Pedulli, S. Cabiddu, C. Fattuoni, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9259-9263].

I valori di BDE ottenuti, calcolati con la tecnica di equilibrizzazione EPR sono mostrati in Tabella 7.2, insieme alle costanti di velocità  $k_{inh}$  per la loro reazione con i radicali perossili in cumene a 30 °C e il numero di radicali perossili intrappolati per ciascuna molecola,  $n$ .

Composto	BDE (kcal mol <sup>-1</sup> )	$k_{inh}$ 10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$n$
<b>1</b>	80.1 ± 0.1	7.3 ± 1.1	2
<b>2</b>	-	0.40 ± 0.10	n.d.
<b>3</b>	80.3 ± 0.2	8.2 ± 1.1	2
<b>4</b>	{ 80.4 ± 0.3 80.3 ± 0.3	6.7 ± 1.3	4
<b>BHT</b>	79.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	10.7 ± 1.0	2
<b>[60]Fullerene</b>	-	0.31 ± 0.11	n.d.

**Tabella 7.2: Valori di BDE (O-H) misurati a temperatura ambiente in benzene contenente il 10% di di-ter-butyl-perossido, valori di  $k_{inh}$  per la reazione dei composti con i radicali perossili in cumene a 30°C e numero di radicali  $n$  intrappolati da ogni molecola.**

Dai valori della tabella 7.2 e dalla figura 7.3 si può vedere che i composti **1** e **3** hanno una moderata attività antiossidante, paragonata a quella del BHT. Le costanti di inibizione sono solo leggermente più basse di quelle del BHT cioè la presenza del [60]fullerene non apporta miglioramenti all'abilità del BHT intrappolare i radicali. Il fenolo **2** è praticamente privo di ogni attività antiossidante, presumibilmente per la formazione di un legame a idrogeno intramolecolare tra l'OH fenolico e l'atomo di azoto dell'anello pirrolidinico, per cui si ha un aumento della forza del legame O-H. Il composto **4**, sebbene caratterizzato da un valore di  $k_{inh}$  simile a quello di **1** e **3**, mostra un'attività

antiossidante almeno due volte più grande degli altri fenoli, questo per la presenza di due unità fenoliche nella stessa molecola capaci di intrappolare 4 radicali perossili. Un accurato esame della figura 7.3 porta all'osservazione che le curve dei consumi di ossigeno di **1**, **3** e **4** dopo la fine del periodo di inibizione, non sono esattamente parallele a quella osservata per il BHT. Questo suggerisce che questi composti anche quando non ci sono più gruppi fenolici in soluzione, conservano ancora una debole attività antiossidante, probabilmente dovuta al gruppo C<sub>60</sub> da solo.

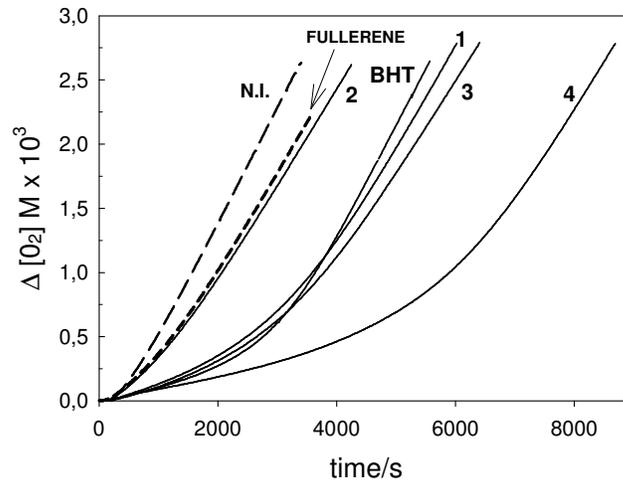
A tale proposito è interessante considerare uno studio di Hwang [I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee, P. P. Kanakamma, C. K.-F. Shen, T.-Y. Luh, C. H. Cheng, K. C. Hwang, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4614-4620] il quale attribuisce al C<sub>60</sub> un'attività antiossidante nei liposomi maggiore di quella dell' $\alpha$ -tocoferolo, basata sulla relativa abilità di una serie di antiossidanti (alla stessa concentrazione) di prevenire le variazioni di pH nella fase acquosa interna dei liposomi durante la generazione di radicali idrossidi o superossido. Gli autori di questo lavoro, suggerivano che questo comportamento fosse dovuto ai molteplici siti di legame (30 doppi legami) disponibili sul C<sub>60</sub> ad accettare molti radicali perossili per molecola, in opposizione all' $\alpha$ -tocoferolo che ne intrappola "solo" due per molecola. L'abilità del C<sub>60</sub> di aggiungere numerosi radicali *ter*-butil-perossili per formare dei perossidi stabili è stata provata anche dalla spettroscopia NMR, ma bisogna ricordare che l'abilità antiossidante di un dato composto non è data dalla stechiometria della sua reazione con i radicali perossili bensì dalla velocità con cui avviene tale reazione. Per questa ragione abbiamo misurato l'attività antiossidante del fullerene non sostituito nelle stesse condizioni sperimentali impiegate per i derivati **1-4**. La costante di velocità  $k_{inh}$  risultante ( $k_{inh} = 313 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) indica che, contrariamente a quanto riportato in precedenza, il [60]fullerene di per sé è un antiossidante "chain-breaking" molto debole. Dividendo poi questo valore per 30, che è il numero di doppi legami nella struttura del C<sub>60</sub>, la sua attività "intrinseca" ( $k_p \sim 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) verso il radicale perossile non è più grande di quella dello stirene ( $k_p \sim 41 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Howard, J. A. in *Free Radicals*, Vol. 2 (Ed. J.

K. Kochi), Wiley-Inter-science, New York, **1975**, Chapter12]. La ragione per cui il [60]fullerene si comporti come un debole antiossidante piuttosto che propagare la reazione di ossidazione come lo stirene è il fatto che il risultante radicale centrato al carbonio non è reattivo verso l'ossigeno, similmente al  $\beta$ -carotene. La velocità di reazione del [60]fullerene da solo, o come parte di molecola nei composti sintetizzati, non giustificerebbe lo sviluppo di questi  $C_{60}$  legati ai fenoli se non fosse che il  $C_{60}$  è risaputo essere un efficiente intrappolatore di radicali alchili, circa 3000 volte più efficace del BHT e 23 volte dell' $\alpha$ -tocoferolo, come mostrato dal confronto delle costanti di velocità della loro reazione a temperatura ambiente (la costante di velocità per la reazione di addizione del radicale benzile al [60]fullerene è riportata pari a  $1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 298 K [Walbiner, M.; Fischer, H.; *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 4880-4881] e può essere paragonata al valore di  $4,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  misurato alla stessa temperatura per la reazione di estrazione dell'idrogeno dal BHT da parte del radicale neofile [Franchi, P.; Lucarini, M.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L.; Lunelli, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 507-514]).

Poiché i radicali centrati al carbonio reagiscono velocemente con l'ossigeno molecolare, questa addizionale capacità di intrappolare radicali è rilevante a basse pressioni parziali di ossigeno, per esempio, sotto condizioni di ipossia in vivo o in polimeri, dove la diffusione di ossigeno è limitata.

Le evidenze sperimentali quindi mostrano che l'introduzione del [60]fullerene nella molecola non apporta sostanziali miglioramenti alla velocità di reazione con i radicali perossili rispetto al precursore BHT. La velocità di inibizione leggermente più bassa riflette il valore leggermente più alto di BDE. Sebbene questi composti si comportino come antiossidanti moderatamente efficaci in condizioni aerobiche, il gruppo  $C_{60}$  può contribuire, in condizioni ipossiche, all'intrappolamento di radicali alchili e questa caratteristica rende questi fullereni modificati interessanti in quanto utilizzabili per interessanti applicazioni in campo farmaceutico e nella chimica dei polimeri, per esempio come inibitori della polimerizzazione [E. B. Zeinalov, G. Koßmehl, *Pol. Degrad.*

*Stab.* **2001**, 71, 197-202]. In questo ambito, l'impalcatura del C<sub>60</sub> potrebbe contribuire fornendo proprietà utili a questi composti, come una limitata mobilità, una diffusione limitata all'interno delle matrici o una localizzazione preferenziale in alcuni compartimenti biologici.



**Figura 7.3:** Consumo di ossigeno osservato durante l'autossidazione del cumene, iniziata da AMVN ( $5 \times 10^{-3}$  M) a 30°C in assenza di antiossidante (non inibita, n.i.), in presenza di BHT, di fullerene, o di ciascuno dei quattro derivati studiati ( $5.0 \times 10^{-6}$  M).

## INDICE

	Pag.
CAPITOLO 1	
<b>LA REAZIONE DI AUTOSSIDAZIONE</b>	1
<b>1.1 La reazione di autossidazione</b>	1
<b>1.2 Il meccanismo</b>	2
1.2.1 Stadio di iniziazione	3
1.2.2 Stadio di propagazione	5
1.2.3 Trasferimento di atomi di idrogeno	6
1.2.4 Stadio di terminazione	7
<b>1.3 Perché studiare la perossidazione lipidica</b>	9
CAPITOLO 2	
<b>RADICALI LIBERI E ANTIOSSIDANTI</b>	12
2.1 I radicali liberi	12
2.2 Gli antiossidanti	13
2.3 Gli antiossidanti e il loro meccanismo d'azione	14
2.3.1 Definizione	14
2.4 Classificazione degli antiossidanti	15
2.4.1 Antiossidanti preventivi	15
2.4.2 Antiossidanti interruttori di catena	17

<i>2.5 L'efficacia di un antiossidante</i>	20
<i>2.5.1 Considerazioni cinetiche</i>	21
<i>2.5.2 Termodinamica della reazione d'inibizione: la BDE dei fenoli</i>	22
<i>2.5.3 Effetti sterici</i>	25
<i>2.5.4 Effetto cinetico del solvente</i>	27
<i>2.5.5 Numero di radicali intrappolati</i>	31
<i>2.6 Un esempio di antiossidanti con <math>n &lt; 2</math>: gli idrochinoni</i>	32
<i>2.7 L'importanza dei polifenoli naturali</i>	33

### **CAPITOLO 3**

<b><i>ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE: COME MISURARLA ?</i></b>	36
<i>3.1 Test del DPPH<sup>•</sup></i>	36
<i>3.2 Test di decadimento dell'ABTS+<sup>•</sup></i>	41
<i>3.3 Saggio ORAC (Oxygen Radicals Absorbance Capacity)</i>	43
<i>3.4 Metodi di Perossidazione lipidica</i>	45
<i>3.4.1 Misura dell'attività antiossidante mediante trasduttore di pressione</i>	46
<i>3.5 Trasduttore di pressione</i>	47
<i>3.5.1 Autossidazione inibita: curve e parametri</i>	49
<i>3.5.2 Substrato ossidabile</i>	52
<i>3.6 Autossidazione in micelle</i>	54
<i>3.7 Metodi radiolitici</i>	55
<i>3.8 Peroxyl Radical Clock</i>	56
<i>3.9 Altri metodi: reazione con i radicali alchilici e alcossilici</i>	57

### **CAPITOLO 4**

<b><i>I FLAVONOIDI</i></b>	59
----------------------------	----

## **CAPITOLO 5**

### ***IL RUOLO DELLO ZOLFO IN MOLECOLE FENOLICHE AD ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE*** 63

#### *5.1 Il ruolo dello zolfo come sostituyente* 65

##### *5.1.1 Entalpia di dissociazione del legame O-H (BDE)* 68

##### *➤ Costante di velocità della reazione di inibizione* 69

##### *5.1.2 Misure FT-IR* 73

#### *5.2 Attività antiossidante e antiradicalica di 4-tiaflavani variamente sostituiti* 78

#### *5.3 Attività antiossidante di analoghi dei cromanoli contenenti zolfo* 88

## **CAPITOLO 6**

### ***IL PROFILO ANTIOSSIDANTE DELL' $\alpha$ -SELENOTOCOFEROLO*** 97

## **CAPITOLO 7**

### ***L' ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI FULLERENI MODIFICATI CONTENENTI BHT*** 103