

anno II - N° 2 - MARZO/APRILE 2018



# La Chimica e l'Industria online

 Organo Ufficiale della Società Chimica Italiana

# 2



# 2018

ISSN 2283-544X

**In questo numero si parla di:**

**Chimica computazionale nella progettazione, nell'ottimizzazione e nella sperimentazione dei farmaci, Giornate di Chimica analitica in memoria del prof. Dondi**



**MAPEI. PARTNER MONDIALE DEI COSTRUTTORI.**

**Prodotti** e **soluzioni** tecnologicamente all'avanguardia per la realizzazione di nuove opere edili, il restauro e la conservazione di significativi edifici del patrimonio artistico e culturale in tutto il mondo.

È TUTTO **OK**, CON **MAPEI**

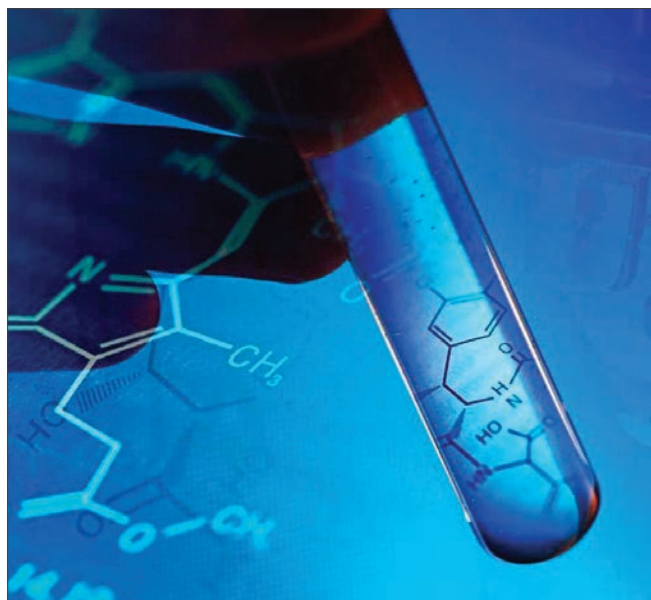
Scopri di più su [mapei.it](http://mapei.it)

 **MAPEI**<sup>®</sup>  
ADESIVI • SIGILLANTI • PRODOTTI CHIMICI PER L'EDILIZIA





# LA CHIMICA COMPUTAZIONALE NELLA PROGETTAZIONE, NELL'OTTIMIZZAZIONE E NELLA SPERIMENTAZIONE DEI FARMACI. UN FUTURO ROSEO PER UNA DISCIPLINA MATURA



Chi si affaccia oggi giorno alla ricerca, industriale o accademica, nel campo della progettazione dei farmaci, dà per scontato che l'utilizzo di tecniche computazionali faccia parte del repertorio dei ferri del mestiere del chimico-medicinale, e oramai

quasi tutti i corsi di laurea, in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Farmacia, ma anche Chimica, Biologia e Biotecnologie, offrono una serie di corsi teorici e pratici sull'applicazione della chimica computazionale e della modellistica molecolare alla progettazione dei farmaci e alla comprensione del rapporto attività-struttura.

Ma ciò che al giovane ricercatore appare oggi scontato, deriva da una lunga esperienza, che dura oramai da più di venticinque anni, in cui si è formato un nucleo di *expertise* italiana molto produttivo e capace di imporsi come leader a livello internazionale.

L'esperienza italiana nel campo delle discipline computazionali applicate alla progettazione dei farmaci, come dicevamo, nasce in maniera significativa a metà degli anni Ottanta, grazie soprattutto ad una rete di contatti con laboratori europei ed americani, pionieri nella disciplina. Tra questi occorre ricordare sicuramente i gruppi del prof. Corwin Hansch, di Peter Goodford e Graham Richards ad Oxford, di Hans Dieter Höltje a Düsseldorf e poi Berlino. Nacquero così le prime unità di 'modellistica molecolare', come si usava chiamarle, basate principalmente a



Bari, Bologna, Napoli. Proprio i colleghi di Napoli, i professori Silipo e Vittoria, organizzarono a Sorrento nel 1988 la prima edizione italiana del convegno internazionale QSAR (Quantitative-Structure Activity Relationships), che si stava imponendo come il forum scientifico di crescita della disciplina.

Alla fine degli anni Ottanta, tutte le grandi industrie farmaceutiche italiane avevano gruppi di modellistica molecolare che faticosamente, ma in molti casi produttivamente, completavano ed integravano le attività di discovery. Sempre in quegli anni, iniziò l'espansione, nel campo delle relazioni attività-struttura, degli approcci chemiometrici, disciplina da molti anni appannaggio della chimica analitica, ma che trovò nell'analisi multivariata di dati fortemente intercorrelati, quali quelli provenienti dalla valutazione di attività biologica di serie congeneriche di composti, un terreno fertile di espansione. Gruppi di ricerca di Perugia, Milano e Genova hanno promosso la crescita di una disciplina che ha trovato il suo apice alla fine degli anni Novanta, quando ha costituito il ponte metodologico tra le 'vecchie' relazioni struttura-attività e la gran massa di dati prodotta dai software di modellistica molecolare.

Gli anni Novanta sono quelli dell'esplosione di internet, della crescita vertiginosa delle performance di calcolo, dello sviluppo e della diffusione di tecniche biofisiche per lo studio dell'interazione farmaco-recettore, prima tra tutte, la cristallografia a raggi X. Agli inizi degli anni Novanta le università italiane (e anche moltissime europee) non erano cablate, lo standard del computer da scrivania era la serie degli x86 IBM, con velocità di clock, RAM e memoria di massa di qualche potenza di 10 inferiore a quelle del più scadente smartphone di oggi. In questo contesto culturale e tecnologico, la

chimica farmaceutica italiana promosse nel 1994, attraverso la Scuola Avanzata della sua Divisione, un workshop di approfondimento delle tecniche di modellistica molecolare e di chemiometria. Molti dei tutor di quell'esperienza (compreso chi scrive) hanno poi negli anni proseguito la carriera accademica e industriale, ma ancora più importante, molti di quelli che hanno seguito il corso hanno poi installato, nelle proprie sedi, un'unità di modellistica molecolare.

Gli anni Duemila, ad oggi, sono gli anni della maturità della disciplina, in Italia.

In questo numero de *La Chimica e l'Industria* viene presentata una serie di approcci che non possono mancare nel repertorio del chimico farmaceutico che intenda seguire il percorso di un potenziale farmaco dalla sua scoperta alla fase di ottimizzazione preclinica.

Le tecniche di dinamica molecolare, considerate approcci 'duri', consentono ora, con prestazioni inimmaginabili sino a poco tempo fa, di simulare eventi di binding e unbinding di una piccola molecola alla sua controparte recettoriale e di seguire su scala molecolare il meccanismo di riconoscimento, legame, attivazione o inibizione, offrendo la possibilità di comprendere come modificare la piccola molecola per ottimizzare una qualsiasi di queste fasi.

L'ottimizzazione delle cosiddette proprietà ADME, cioè di tutto ciò che è relativo al destino farmacocinetico di un farmaco somministrato ad un essere vivente, è un altro degli asset, proposti in questo numero, della chimica computazionale farmaceutica. Basti solo pensare all'impatto che l'ottimizzazione ADME ha avuto nella riduzione del numero di molecole che hanno abbandonato la sperimentazione clinica per problemi farmacocinetici e il valore economico, scientifico e temporale che questa riduzione ha avuto. L'ottimizzazione delle proprietà ADME trova la sua logica evoluzione nella capacità di predire tossicità e genotossicità di small molecules. L'accuratezza di tali predizioni, in determinati contesti, ha fatto sì che diventassero dei 'surrogate endpoints' addirittura accettati da agenzie regolatorie.

Infine, ma non certo da ultimo per importanza, l'aspetto della gestione dei big data e della loro rilevanza nella progettazione ed interpretazione degli studi di sperimentazione clinica.

Abbiamo detto che la disciplina ha raggiunto una fase di maturità. Questa maturità dovrà essere incanalata, ed è compito di tutti noi farlo, verso ancora una maggiore integrazione con la chimica di sintesi, con l'analisi, con la biologia molecolare e cellulare.



# Specialists in gaskets

# TEXPACK®

Richiedete il nuovo catalogo generale al nostro Customer Service

Texpack® srl - unipersonale

Azienda certificata UNI EN ISO 9001: 2008

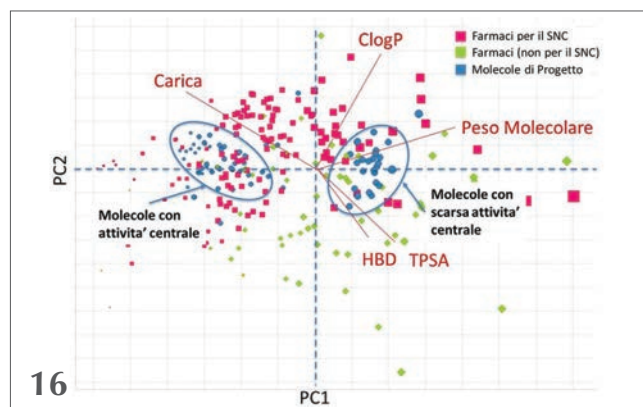
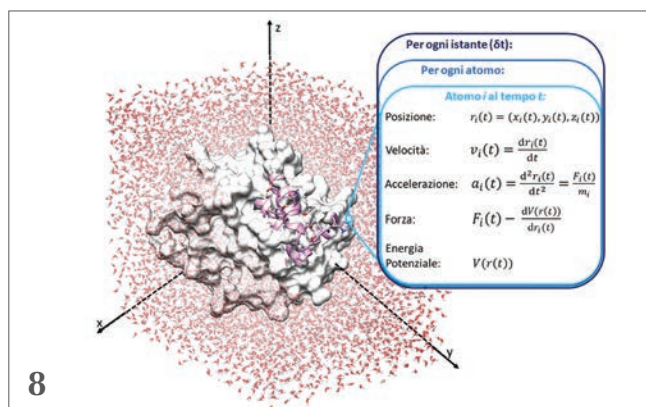
Via Galileo Galilei, 24 - 25030 Adro (BS) Italia

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

info@texpack.it - www.texpack.it



Copertina: immagine tratta dall'articolo Kovarich *et al.*, pag. 23



## EDITORIALE

- 3 LA CHIMICA COMPUTAZIONALE NELLA PROGETTAZIONE, NELL'OTTIMIZZAZIONE E NELLA SPERIMENTAZIONE DEI FARMACI. UN FUTURO ROSEO PER UNA DISCIPLINA MATURA  
Gabriele Costantino

## CHIMICA & FARMACEUTICA

- 8 L'INFLUENZA DEL TEMPO NEL COMPORTAMENTO MOLECOLARE: UN'INTRODUZIONE ALLA DINAMICA MOLECOLARE  
Veronica Salmaso, Stefano Moro

- 16 PREDIZIONE DI PROPRIETÀ ADME/PK NELLA RICERCA DI NUOVI FARMACI  
Alfonso Pozzan, Stefano Fontana, Simone Braggio

- 23 VALUTAZIONE QSAR DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE  
Simona Kovarich, Manuela Pavan, Arianna Bassan, Elena Fioravanzol

- 30 RELAZIONI PK/PD NELLA PREDIZIONE DELLE DOSI PER FASE CLINICA  
Francesco Fiorentini

## CHIMICA & ANALITICA

- 38 GIORNATE DI CHIMICA ANALITICA IN MEMORIA DEL PROF. FRANCESCO DONDI. RECENTI SVILUPPI IN SCIENZA DELLE SEPARAZIONI E IN BIOANALITICA  
Alberto Cavazzini
- 40 NUOVE FASI STAZIONARIE CHIRALI PER SEPARAZIONI ULTRAFASST: ASPETTI CINETICI  
Martina Catani, Omar H. Ismail, Simona Felletti, Francesco Gasparrini, Alberto Cavazzini
- 43 NUOVE FASI STAZIONARIE CHIRALI PER SEPARAZIONI ULTRAFASST: ASPETTI TERMODINAMICI  
Simona Felletti, Martina Catani, Omar H. Ismail, Francesco Gasparrini, Alberto Cavazzini

- 46 ELETTRIDI STAMPATI E SOSTENIBILITÀ  
Stefano Cinti

- 49 QUALITY BY DESIGN IN ANALISI FARMACEUTICA  
Benedetta Pasquini, Serena Orlandini, Sandra Furlanetto

- 52 DERIVATIZZAZIONE ASSISTITA DA ULTRASUONI PER L'ANALISI GC-MS DI COMPOSTI ORGANICI POLARI NEL PARTICOLATO ATMOSFERICO  
Francesco Manarini, Mara Russo, Marco Visentin, Maria Chiara Pietrogrande

- 55 VALUTAZIONE DELLA BIOACCESSIBILITÀ DEI POLIFENOLI NEL RADICCHIO ROSSO (*CHICORIUM INTYBUS*)  
Caterina Bergantin, Annalisa Maietti, Alberto Cavazzini, Paola Tedeschi, Nicola Marchetti

- 58 CISPLATIN CONJUGATE WITH CYANOCOBALAMIN: SOFT IONIZATION/HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY AS A NEW BLADE FOR ITS CHARACTERIZATION  
Giovanni Ventura, Cosima Damiana Calvano, Francesco Palmisano, Tommaso Riccardo Innocenzo Cataldi

- 61 IPA IN *MULLUS BARBATUS*: ESTRAZIONE CON QuEChERS  
Emanuela Frapiccini, Anna Annibaldi, Mattia Betti, Silvia Illuminati, Mauro Marini, Monica Panfili, Giuseppe Scarponi, Cristina Truzzi

## DALLA LETTERATURA

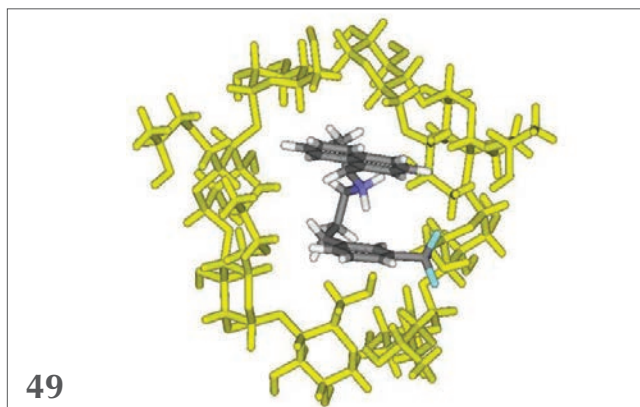
- 66 a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

## LA CHIMICA ALLO SPECCHIO

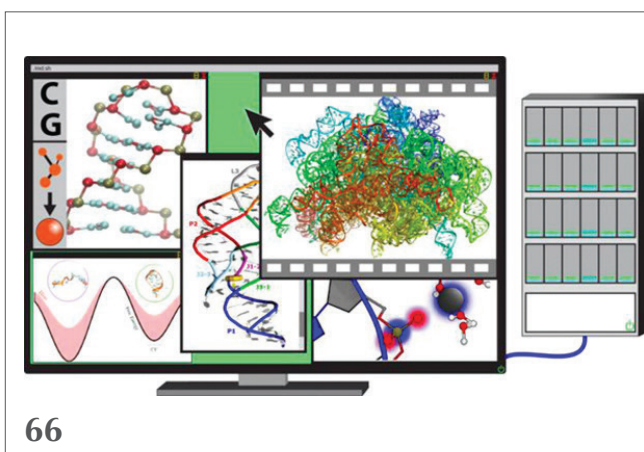
- 68 MA L'INDUSTRIA CHIMICA È VERAMENTE PIÙ SICURA?  
Claudio Della Volpe



38



49



66

68



[http://www.soc.chim.it/riviste/chimica\\_industria/catalogo](http://www.soc.chim.it/riviste/chimica_industria/catalogo)

#### DIRETTORE RESPONSABILE

Ferruccio Trifirò

#### REDAZIONE SCIENTIFICA

Anna Simonini

Piazzale R. Morandi, 2 - 20121 Milano - tel. +39 345 0478088

[anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)

#### COMITATO DI REDAZIONE

Alessandro Abbotto, Federico Bella, Nicola Cardellicchio, Martino Di Serio, Daniele Donati, Matteo Guidotti, Oreste Piccolo, Anna Simonini, Marco Taddia, Ferruccio Trifirò, Fiorenza Viani

#### COMITATO SCIENTIFICO

Angela Agostiano, Alberto Albinati, Vincenzo Barone, Luigi Campanella, Sergio Carrà, Donatella Caruso, Silvia Colombo, Gabriele Costantino, Gianluca Farinola, Carla Isernia, Aldo Laganà, Francesco Paolucci, Italo Pasquon, Francesco Luigi Pignataro, Raffaele Riccio, Adriana Saccone, Elena Selli, Lucia Toniolo, Giovanni Villani



#### HANNO COLLABORATO

Silvia Cauteruccio, Monica Civera, Claudio Della Volpe

#### PROGETTO GRAFICO E IMPAGINAZIONE

Sara Moscardini - [info@hamletcommunication.com](mailto:info@hamletcommunication.com) - Skype: hamlet262

#### CONCESSIONARIA DI PUBBLICITÀ

Agicom Srl

Viale Caduti in Guerra, 28 - Castelnuovo di Porto (Roma)

Tel. +39 06 9078285, fax +39 06 9079256

[agicom@agicom.it](mailto:agicom@agicom.it)

Skype: [agicom.advertising](https://www.skype.com/en/contacts/agicom)

#### EDITORE

PAS-SCI Srl

Roma

Reg. Tribunale di Milano n. 134 del 11/04/2017

ISSN 2283-544X





VERONICA SALMASO, STEFANO MORO  
MOLECULAR MODELING SECTION (MMS)  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
STEFANO.MORO@UNIPD.IT

# L'INFLUENZA DEL TEMPO NEL COMPORAMENTO MOLECOLARE: UN'INTRODUZIONE ALLA DINAMICA MOLECOLARE

*Non c'è vita senza tempo... e questo è sicuramente vero anche a livello molecolare. In questi ultimi anni, sta diventando sempre più forte la consapevolezza che per rappresentare in maniera realistica la struttura di un sistema molecolare e per poterne calcolare in maniera accurata alcune delle sue proprietà, tale struttura deve poter essere influenzata dalla coordinata tempo. Le tecniche computazionali di dinamica molecolare hanno proprio questo come loro obiettivo principale.*

Lo studio del processo di riconoscimento di un farmaco (*drug*), o più generalmente di un candidato farmaco, con il suo bersaglio molecolare (*drug target*) ha un ruolo chiave nella razionalizzazione del meccanismo d'azione di un farmaco e nella sua ottimizzazione. In questi ultimi anni, la possibilità di predire il meccanismo di riconoscimento (*binding*) in assenza del dato sperimentale è risultata particolarmente attrattiva per ridurre i tempi (solitamente tra 10 e i 12 anni di sperimentazione), e conseguentemente le risorse economiche (oggi giorno anche superiori al miliardo di euro per sperimentazione) necessarie per lo sviluppo di un nuovo farmaco, in particolare nelle sue fasi iniziali. In questo contesto, a partire dagli anni Ottanta, ha visto la sua affermazione in un ambito farmaceutico, sia industriale che accademico, quella che è stata definita progettazione di farmaci supportata da tecniche computazionali (*Computer-Aided Drug Design, CADD*), approccio a cui è stata riservata la copertina della rivista *Fortune* del 5 ottobre 1981, con il titolo "*Next Industrial Revolution: Designing Drugs by Computer at Merck*" (Prossima rivoluzione industriale: progettare farmaci al computer in Merck).

All'interno degli approcci CADD, le tecniche di progettazione basate sulla disponibilità della struttura tridimensionale del bersaglio molecolare di interesse, definite come "*Structure-Based Drug Design (SBDD)*", hanno visto accrescere il loro interesse, soprattutto grazie ai notevoli progressi nell'ambito della biochimica strutturale e della cristallografia a raggi X. In particolare quest'ultima rimane la tecnica d'elezione per ottenere un modello a risoluzione atomica della struttura tridimensionale di macromolecole d'interesse biologico, siano esse acidi nucleici, proteine, complessi multiproteici o virus [1]. La disponibilità della struttura tridimensionale del bersaglio molecolare di interesse farmaceutico-farmacologico, ovvero correlabile ad un particolare stato patologico, rappresenta sicuramente il punto di partenza fondamentale per poter virtualizzare il processo di riconoscimento ligando-recettore. Anche se non entreremo in alcuni dettagli operativi, è chiaro che la qualità della struttura cristallografica a nostra disposizione è un elemento cruciale per poter procedere con la necessaria accuratezza al processo di virtualizzazione. Un secondo aspetto fondamentale è legato alla possibilità di stabilire con esattezza in





quale particolare regione del nostro bersaglio molecolare avvenga il riconoscimento con il ligando (farmaco o suo candidato). Definiremo questa particolare regione del bersaglio molecolare come *sito di riconoscimento* o *sito di legame*, che in funzione del tipo di bersaglio molecolare che stiamo considerando (enzima, recettore, trasportatore oppure acido nucleico) potrà assumere la definizione biochimica-farmacologica di sito catalitico, sito ortosterico, sito allosterico oppure sito di intercalazione. Disponendo quindi della struttura tridimensionale del nostro bersaglio molecolare e avendo indicazioni, dirette o indirette, del sito di riconoscimento del nostro ligando, è possibile oggi anticipare, attraverso un processo di virtualizzazione, quale/quale potrebbero essere le possibili modalità di riconoscimento tra un ligando ed il suo bersaglio molecolare: definiremo convenzionalmente questo approccio come *docking molecolare*. L'obiettivo principale del docking molecolare è quindi quello di anticipare computazionalmente la plausibile struttura tridimensionale del complesso intermolecolare ligando-recettore energeticamente più stabile.

Una delle principali limitazioni di molte tecniche di SBDD, inclusa quella di docking molecolare, è che la rappresentazione del nostro sistema molecolare è congelata rispetto alla coordinata tempo, e quindi statica ed immutabile. Come è facilmente comprensibile, questo introduce molto spesso una riduzione importante del grado di realismo di queste rappresentazioni e inserisce inevitabilmente un elevato margine di errore in molte delle proprietà che descrivono il nostro sistema molecolare. Nasce quindi la necessità di dare vita alle nostre rappresentazioni molecolari... e non c'è vita senza tempo.

### Virtualizzazione della coordinata tempo: la dinamica molecolare classica

La dinamica molecolare (MD) è una tecnica di simulazione computazionale che permette di studiare l'evoluzione temporale delle posizioni e delle interazioni tra gli atomi di un sistema molecolare, tramite l'integrazione delle loro equazioni del moto secondo le leggi della meccanica classica.

La possibilità di utilizzo di tecniche di questo tipo si basa sul fatto che un sistema classico è interamente determinato dall'assegnazione, a un dato istante di tempo, delle esatte posizioni e velocità di tutte le

particelle che lo compongono e dalla conoscenza delle leggi d'interazione: ogni configurazione, passata e futura, è in linea di principio ottenibile risolvendo esplicitamente il sistema di equazioni differenziali accoppiate che ne descrivono l'evoluzione. Se ciò vale in meccanica classica, non è invece vero in meccanica quantistica, nell'ambito della quale la predizione esatta del comportamento di un sistema risulta impossibile: non si possono infatti determinare simultaneamente con precisione assoluta posizioni e velocità delle particelle (principio di indeterminazione di Heisenberg). Di conseguenza, la dinamica molecolare è un metodo classico, e non può essere utilizzata per spiegare processi come la rottura o la formazione di un legame chimico, in cui la meccanica quantistica è essenziale alla corretta descrizione del fenomeno. Fortunatamente la meccanica classica può interpretare realisticamente una gran parte dei casi d'interesse per la biofisica e la farmacologia molecolare.

In dinamica molecolare sono rispettate le leggi della meccanica classica, in particolare la legge di Newton:

$$F_i = m_i a_i$$

dove  $i$  corrisponde ad ogni atomo di un sistema di  $N$  atomi,  $m_i$  è la massa dell'atomo considerato,  $a_i$  è la sua accelerazione e  $F_i$  è la forza che agisce su di esso, dovuta all'interazione con gli altri atomi.

Conoscendo la forza relativa di ogni atomo ad ogni istante  $t$  è possibile determinarne l'accelerazione nel sistema in quell'istante

$$a_i(t) = F_i(t)/m_i = d^2 r_i(t)/dt^2$$

con  $r_i(t)$  posizione dell'atomo  $i$  al tempo  $t$  (Fig. 1).

Il tempo viene discretizzato in intervalli regolari, chiamati *timestep* ( $\delta t$ ), utilizzati per far evolvere il sistema lungo la coordinata temporale. L'equazione del moto viene integrata per via numerica, consentendo di calcolare l'evoluzione delle posizioni e delle velocità ad ogni *timestep*. Le coordinate e le velocità di ciascun atomo nello *step* corrente sono calcolate considerando le coordinate e le velocità assunte dall'atomo nello *step* precedente. Le coordinate iniziali della simulazione corrispondono a

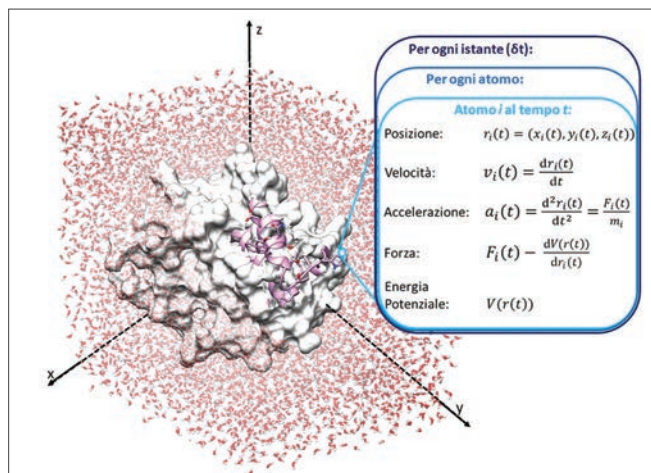


Fig. 1 - Un ciclo di dinamica molecolare, con indicazione delle variabili computate per ogni atomo del sistema

quelle della struttura di partenza, e le velocità iniziali sono generate in maniera casuale. Ad ogni *step*, l'accelerazione di ogni atomo viene calcolata a partire dalle forze che agiscono sullo stesso, computate dall'energia potenziale relativa ad ogni atomo:

$$F_i(t) = -dV(r(t))/dr_i(t)$$

dove  $V(r(t))$  è l'energia potenziale in funzione della posizione  $r$  al tempo  $t$ , data dalla somma delle energie intra ed intermolecolari dell'atomo  $i$  al tempo  $t$  (energia del campo di forze).

Il cuore di un programma di dinamica molecolare consiste nell'iterazione di un ciclo comprendente il calcolo delle forze agenti in un determinato istante su ciascun atomo o molecola e l'esecuzione del moto delle particelle per un timestep  $\delta t$ .

La lunghezza di  $\delta t$  deve essere breve a sufficienza da permettere di approssimare a costanti le forze nell'intervallo di tempo.  $\delta t$  deve inoltre essere compatibile con la scala dei tempi dei moti più veloci osservabili nel sistema, quindi, affinché l'integrazione delle equazioni sia corretta,  $\delta t$  non può di norma essere maggiore di circa un ventesimo del tempo caratteristico di oscillazione di una particella attorno alla sua posizione di equilibrio: l'ordine di grandezza di  $\delta t$  dev'essere di  $10^{-15}$  secondi (femtosecondi). Per questo motivo, un adeguato numero di iterazioni è richiesto per raggiungere la scala dei tempi necessaria ad osservare il fenomeno di interesse. Oggigiorno si raggiungono in tempi ragionevoli da  $10^6$  a  $10^9$  cicli di dinamica, permettendo di esplorare le scale dei tempi del nano-microsecondo.

## Applicazioni della dinamica classica a fini farmaceutici

Il grande vantaggio apportato dalla dinamica molecolare nell'ambito SBDD è la possibilità di tener conto dei gradi di libertà dell'intero sistema nello studio dell'interazione ligando-macromolecola. Nelle parole "intero sistema" rientra anche il ruolo dell'acqua, che ormai è rappresentata prevalentemente in modo esplicito nel corso delle simulazioni di dinamica. Il ruolo assunto dalle molecole del solvente è di cruciale importanza nel determinare la posizione dell'equilibrio di molti processi biochimici, incluso il riconoscimento di un ligando con il suo bersaglio molecolare, ed il loro contributo alla variazione di energia complessiva del processo non può essere tralasciato se si vuole ottenere una stima accurata di qualunque proprietà termodinamica associata a tale processo. È quindi indispensabile che le molecole d'acqua, così come gli eventuali ioni che garantiscono l'elettro-neutralità, siano esplicitamente presenti nel sistema da simulare; requisito non triviale, dal momento in cui il numero di molecole d'acqua da considerare può essere dell'ordine di molte migliaia di unità.

Le simulazioni con solvente esplicito, inoltre, permettono di investigare direttamente il contributo dell'acqua nel legame ligando-macromolecola: varie tecniche consentono, infatti, di individuare molecole di acqua stabili che mediano interazioni tra il ligando e il bersaglio molecolare.

Alcune delle applicazioni della dinamica prevedono un'integrazione con il *docking* molecolare. In particolare, per sopperire al limite della staticità delle strutture cristallografiche, simulazioni di dinamica di macromolecole apo (senza ligando) possono essere sfruttate per generare un insieme di strutture da utilizzare successivamente nel *docking* di ligandi. Inoltre, simulazioni di dinamica possono far emergere tasche criptiche o siti di legame allosterici, come riportato per l'HIV-1 integrasi, che possono essere sfruttate per ottimizzare la complementarità di nuovi farmaci per questi siti.

In ambito "computazionale biologico-farmaceutico" la dinamica molecolare può essere usata per simulare la strutturazione (o *folding*) di peptidi o piccole proteine, analizzare lo spazio conformazionale di particolari domini all'interno di una proteina, studiare l'effetto di una mutazione a livello strutturale-funzionale di una proteina, studiare il processo di



riconoscimento (o *binding*) di un ligando e del suo bersaglio molecolare e valutarne l'energia.

È bene considerare che le dimensioni dei sistemi simulati pongono una questione fondamentale riguardante la validità del metodo: sebbene il numero di particelle sia relativamente grande, esso resta infatti di molti ordini di grandezza inferiore al numero di atomi che compongono i sistemi macroscopici (dell'ordine di  $10^{23}$ ). Non è ovvio *a priori* che le proprietà di un sistema della taglia accessibile alla simulazione siano effettivamente rappresentative del sistema macroscopico che si desidera studiare: spesso quindi l'uso di sistemi relativamente piccoli per lo studio di un problema specifico può essere giustificato solo *a posteriori*.

### Studio di processi di *binding* e *unbinding* grazie alla dinamica molecolare

La dinamica molecolare fu inizialmente introdotta da Alder e Wainwright negli anni Cinquanta per lo studio di sistemi composti da sfere rigide e portò rapidamente ottimi risultati anche nello studio di liquidi semplici. La prima simulazione di dinamica molecolare di un sistema realistico, l'acqua in fase liquida, risale al 1974 (Rahman e Stillinger). La prima simulazione di proteine fu fatta nel 1977 da McCammon e altri: si trattava di una simulazione della Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI), nel vuoto, della durata di 9,2 ps [2].

Nel 1998 Duan e Kollman effettuarono la prima simulazione di una proteina in solvente esplicito della durata di 1  $\mu$ s, osservando il *fold*ing di una porzione di 36 residui di villina da uno stato completamente non strutturato. Questa simulazione era due ordini di grandezza più lunga rispetto ad una simulazione allo stato dell'arte della stessa epoca, e fu resa possibile da supercomputer e da codici parallelizzati; nonostante ciò richiese due mesi di simulazione su *Central Processing Units* (CPU).

D'altra parte, la simulazione di processi lenti, come il *fold*ing o il *binding* (micro-millisecondi), comportano uno sforzo computazionale molto oneroso. Fenomeni di questo tipo richiedono, infatti, il superamento di barriere energetiche elevate, che rallentano la cinetica del processo e che intrappolano il sistema in un minimo di energia potenziale.

Nel tempo sono state sviluppate macchine da calcolo ottimizzate e dedicate alla dinamica molecolare, come il supercomputer Anton, che ha permesso al

gruppo di Shaw di caratterizzare il *fold*ing del dominio FIP35 della proteina WW con una simulazione da 100  $\mu$ s, e di raggiungere il traguardo del millisecondo nelle simulazioni di BPTI ed ubiquitina. Inoltre, lo stesso gruppo è riuscito a simulare l'intero processo di riconoscimento di beta bloccanti ed agonisti al recettore adrenergico  $\beta_2$ , e di inibitori della chinasi Src, attraverso dinamiche *unbiased* [3, 4].

Tuttavia, i supercomputer dedicati sono estremamente costosi ed alla portata di una piccola parte della comunità scientifica. Il più recente sviluppo di codici in grado di sfruttare la velocità di calcolo delle *Graphic Processing Units* (GPU) ha consentito invece di ottenere lunghe simulazioni (ordine del microsecondo) a basso costo.

Accanto a questo, un cambio di paradigma ha iniziato ad evolversi nell'ambito della dinamica molecolare, che prevede la simulazione di molte traiettorie corte in parallelo invece di un'unica lunga traiettoria. Dato che gran parte del calcolo viene sprecato con sistemi intrappolati in un minimo energetico nell'attesa di un evento fortuito, l'idea è di avviare molte simulazioni in parallelo di uno stesso sistema, per poi, non appena una simulazione sfugge dal minimo, interrompere le restanti traiettorie convergendo nel nuovo stato fortunato. Quest'idea è stata sfruttata dal progetto *fold*ing@home, una rete di calcolo globale, che sfrutta i computer messi a disposizione da privati cittadini.

Il nuovo paradigma ha trovato la sua massima espressione nell'uso di modelli markoviani (*Markov State Models*, MSM) e campionamento adattativo. La costruzione di MSM prevede: una discretizzazione della traiettoria in microstati, in cui la stessa viene proiettata, e il calcolo della matrice di probabilità di transizione rispetto ad un tempo chiamato *lagtime*, scelto in modo che la probabilità di transizione sia dipendente solo dallo stato corrente e non dalla sua "storia" (transizioni markoviane). La matrice risultante approssima il comportamento dinamico del sistema, consentendo di estrapolare le scale dei tempi dei processi più lenti e la distribuzione di probabilità all'equilibrio, da cui possono essere calcolate le costanti cinetiche e l'energia libera del processo. Da un punto di vista qualitativo, questo tipo di analisi permette di costruire modelli multi-stadio del processo in esame, individuando stati metastabili del sistema. Una delle prime applicazioni di MSM ai processi di riconoscimento è stato lo studio del percorso di *bin-*

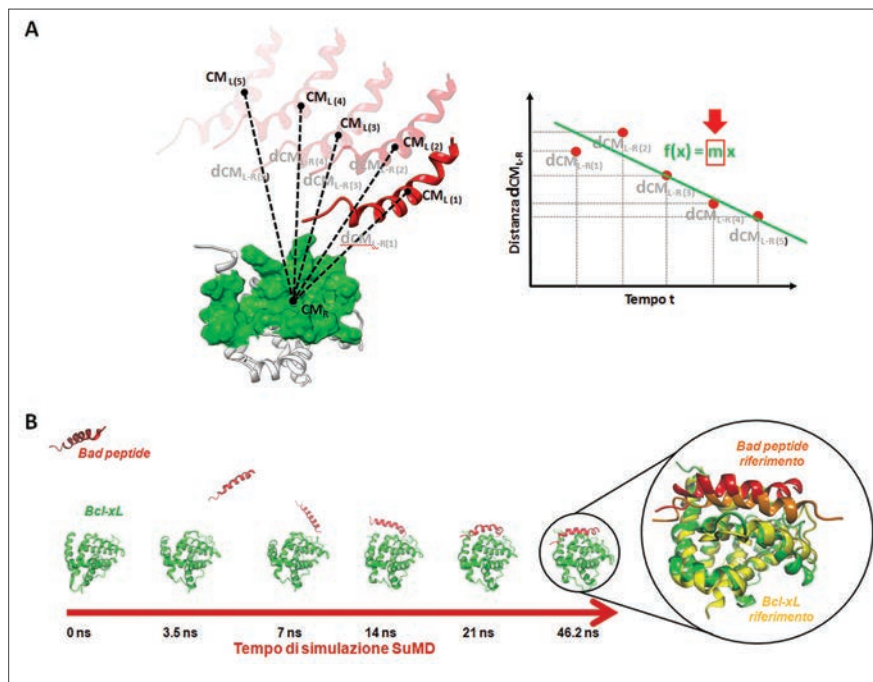


Fig. 2 - a) Schematizzazione di un *SuMD step*, in cui vengono compute le distanze tra i centri di massa di ligando (rosso) e recettore (verde). I valori di distanza vengono interpolati da una funzione lineare, il cui coefficiente angolare determina la simulazione di un nuovo ( $m < 0$ ) o dello stesso ( $m > 0$ ) *SuMD step*; b) rappresentazione del processo di riconoscimento tra il peptide Bad e il target Bcl-xL nel corso di una traiettoria SuMD, in cui l'evento di *binding* viene osservato in soli 46,2 ns. Sulla destra, la sovrapposizione con la struttura sperimentale di riferimento (PDB ID: 1G5J) mostra la capacità della tecnica di riprodurre il dato sperimentale

ding di benzamidina e tripsina ad opera di De Fabritiis *et al.* che ha permesso di individuare tre stati di transizione e di calcolare l'energia libera di legame con 1 kcal/mol di errore rispetto al dato sperimentale [5]. Questa analisi ha richiesto 500 traiettorie da 100 ns, il 37% delle quali produttive. I MSM possono essere usati anche per quantificare la copertura di campionamento dello spazio configurazionale e delle transizioni di un sistema, suggerendo dove focalizzare le successive simulazioni per aumentare l'efficienza della computazione: questo metodo è definito campionamento adattativo.

Tuttavia, il legame di un ligando al suo bersaglio molecolare rimane un evento raro, che richiede diversi microsecondi. Nella Sezione di Modellistica Molecolare (MMS) dell'Università di Padova è stata recentemente sviluppata una tecnica chiamata Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD), che permette di accelerare il processo di legame, consentendone l'esplorazione in decine-centinaia di nanosecondi (Fig. 2A).

Questo metodo non interviene sul profilo energetico del sistema, a cui non aggiunge né sottrae alcuna componente, ma funziona unicamente direzionando

la simulazione verso gli eventi produttivi. Viene definito un intervallo di simulazione, chiamato *SuMD-step*, in cui la distanza dei centri di massa tra ligando e bersaglio molecolare viene supervisionata; le distanze collezionate ad intervalli regolari durante un *SuMD-step* vengono interpolate da una retta, il cui coefficiente angolare determina come procedere (Fig. 2B). Se la pendenza è positiva, significa che il ligando si sta allontanando, perciò il *SuMD-step* corrente viene eliminato e simulato nuovamente riassegnando le velocità; altrimenti, se la pendenza è negativa, significa che il ligando si sta avvicinando, perciò un nuovo *SuMD-step* viene simulato, partendo dalle ultime coordinate e velocità dello step corrente. Applicazioni di SuMD hanno permesso di ottenere una conformazione del ligando molto vicina a quella sperimentale, come nei casi dell'agonista NECA con il recettore

A<sub>2A</sub> dell'adenosina, e del peptide Bad con il suo bersaglio Bcl-xL [6, 7].

La dinamica classica ha il vantaggio di rispettare la distribuzione statistica di Boltzmann degli stati di un sistema, che ha come limite, però, il problema del campionamento: dal momento che non sono permesse fluttuazioni dell'energia totale del sistema, è impedito il superamento di barriere di energia superiori dell'energia totale del sistema. Negli anni sono state proposte evoluzioni della dinamica, chiamate "Enhanced Sampling Methods", che si pongono come obiettivo il campionamento esaustivo dello spazio conformazionale agendo sull'hamiltoniano dell'energia potenziale del sistema, in modo da superare le barriere energetiche presenti sulla superficie di energia potenziale.

Altre evoluzioni della dinamica, chiamate tecniche alchemiche, prevedono la costruzione di trasformazioni irrealistiche, non fisiche (alchemiche), utili per estrapolare l'energia libera di legame di un composto rispetto ad un altro.

In seguito sono riportati, come esempio, le tecniche d'elezione tra gli "Enhanced Sampling Methods" e



tra gli “Alchemical Methods”, rispettivamente la metadinamica e la “Free Energy Perturbation”.

### Campionamento conformazionale attraverso tecniche di metadinamica

La metadinamica è in grado di esplorare con grande efficienza superfici di energia potenziale di elevata complessità ed ha il pregio di avere una comprensibile interpretazione in termini fisici. Allo scopo di far fuggire il sistema eventualmente intrappolato in minimi locali, che appaiono come buche profonde nella superficie di energia potenziale del sistema molecolare, viene aggiunta all’energia potenziale del sistema, e ad intervalli di tempo discreti di tempo, una funzione addizionale di energia potenziale (solitamente descritta da una funzione gaussiana di opportuna ampiezza e larghezza) che aumenta, conseguentemente, l’energia totale posseduta dal sistema in quel particolare istante. L’energia viene aggiunta in funzione di una o più variabili collettive, ossia quel numero ristretto di variabili interne selezionate per l’evoluzione del sistema, in quanto ritenute indispensabili per la sua descrizione [8].

Poiché le gaussiane vengono aggiunte ad intervalli di tempo regolari e solitamente un sistema molecolare tende a stazionare più a lungo in buche di potenziale più profonde, l’effetto è quello di spingere il sistema fuori da questi minimi profondi e permettergli di campionare altre zone del suo spazio conformazionale. Se da una parte la metadinamica è un valido sistema per ottenere un adeguato campionamento dello spazio delle conformazioni, dall’altra l’introduzione di un potenziale esterno dipendente dal tempo modifica la dinamica del sistema che, quindi, non può più essere considerata realistica. Questo è un problema generale: i metodi che consentono una dinamica realistica solitamente non danno un adeguato campionamento, quelli che consentono un buon campionamento (e quindi restituiscono un’accurata termodinamica) alterano la dinamica del sistema.

### Calcolo dell’energia libera di legame attraverso il metodo della “Free Energy Perturbation”

Tra i diversi metodi rigorosi messi a punto in questi ultimi anni il metodo chiamato della “Free Energy Perturbation” (FEP), implementato dal gruppo di ricerca del prof. Jorgensen dell’Università di Yale, rappresenta uno dei metodi basati su simulazioni di dinamica molecolare che trovano un’importante applicazione nell’ambito del processo di ottimizzazione di un nuo-

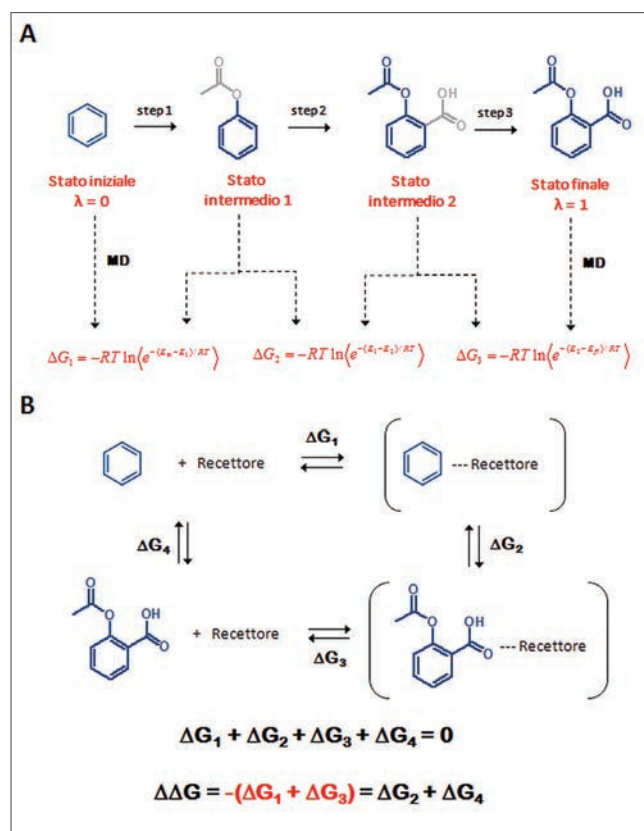


Fig. 3 - a) Schematizzazione di una trasformazione alchemica tipica della FEP; b) schematizzazione del ciclo termodinamico utilizzato per computare l’energia libera di legame grazie alla FEP

vo candidato farmaco [9]. L’idea che sta alla base del metodo FEP è quella di scomporre il problema del calcolo della variazione della  $\Delta G_{\text{binding}}$  relativo alla formazione del complesso ligando-recettore in una serie di stadi intermedi e consecutivi, ognuno dei quali è più facile da descrivere computazionalmente, e quindi anche da risolvere, rispetto al processo nel suo insieme. Questa procedura di scomposizione (semplificazione) del processo di riconoscimento non necessita di essere realistica, così come descritto dall’esempio che segue. Si immagini di simulare il riconoscimento dell’acido acetilsalicilico con un suo possibile bersaglio molecolare: il processo nella sua interezza potrebbe essere semplificato immaginando di partire da una molecola di benzene alla quale progressivamente vengono aggiunti atomi e legami in maniera consequenziale fino ad arrivare alla struttura che caratterizza lo stato finale così come descritto in Fig. 3A.

La transizione dallo stato iniziale allo stato finale è controllata da un parametro definito  $\lambda$  a cui vengono associati valori crescenti nel corso della transizione, partendo da 0 nello stato iniziale fino a 1 nello sta-

to finale. L'approccio di dinamica molecolare implementato nel metodo FEP, utilizzando il calcolo dell'energia potenziale derivante da un campo di forze, è in grado di calcolare la variazione di energia libera relativa al passaggio tra due stati  $\lambda_i$  e  $\lambda_{i+1}$ :

$$\Delta G_i = -RT \ln \langle e^{[-E\lambda_i - E\lambda_{i+1}]/RT} \rangle$$

e di conseguenza è possibile calcolare l'energia libera relativa al riconoscimento del ligando attraverso la somma dei  $\Delta G$  associati ad ogni singolo processo intermedio:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \sum \Delta G_i$$

Va ancora una volta ricordato che questo valore di  $\Delta G_{\text{binding}}$  non deve essere considerato come una stima reale del valore assoluto di variazione di energia libera legato al processo di riconoscimento, ma può essere utilizzato per un confronto relativo tra i valori di  $\Delta G_{\text{binding}}$  attraverso l'utilizzo di cicli termodinamici come quello riportato in Fig. 3B.

Appare evidente da tutto ciò brevemente descritto che sempre di più, oggi e nel futuro prossimo, non ci sarà rappresentazione molecolare che non sia descritta nel tempo, e che non ci sia limite nell'estensione del tempo in cui la stessa rappresentazione non possa essere descritta... aumentando sempre più realismo e accuratezza predittiva delle simulazioni di dinamica molecolare. Prospettivamente due saranno le frontiere in questo ambito. La prima legata al cambio di paradigma nella descrizione atomica: transitando da quella attuale basata sulla meccanica classica a quella basata sulla meccanica quantistica. Il trattamento quantistico dei sistemi molecolari consentirebbe di aumentare sia l'accuratezza nella predizione delle variazioni strutturali del sistema sia in particolare di avere delle anticipazioni più precise relativamente a proprietà termodinamiche e cinetiche del sistema molecolare studiato. Il prezzo da pagare può essere elevato, in termini di tempo di calcolo e di dimensioni di memoria necessarie, in quanto bisogna poter seguire ad ogni passo temporale tutti i gradi di libertà atomici ed eventualmente elettronici del sistema. Per questo l'evoluzione tecnologica informatica, che vede oggi l'utilizzo delle GPUs come motore principale per la produzione di studi di dinamica molecolare classica, potrebbe trovare nei futuri processori quantistici la naturale soluzione per tentare di contenere gli imponen-

ti tempi computazionali intrinsecamente attesi per le simulazioni di dinamica molecolare quantistica.

## Legenda

CADD	Computer-Aided Drug Design
SBDD	Structure Based Drug Design
MD	Molecular Dynamics
CPU	Central Processing Unit
GPU	Graphic Processing Unit
MSM	Markov State Model
SuMD	Supervised Molecular Dynamics
FEP	Free Energy Perturbation
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
MMS	Molecular Modeling Section

## BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Canevari, M. Fasolini, E. Casale, *Chimica e Industria*, 2017, **1**(2), 14.
- [2] J.A. McCammon, B.R. Gelin, M. Karplus, *Nature*, 1977, **267**(5612), 585.
- [3] R.O. Dror, A.C. Pan, D.H. Arlow *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**(32), 13118.
- [4] Y. Shan, E.T. Kim, M.P. Eastwood *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**(24), 9181.
- [5] I. Buch, T. Giorgino, G. De Fabritiis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**(25), 10184.
- [6] A. Cuzzolin, M. Sturlese, G. Deganutti *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.*, 2016, **56**(4), 687.
- [7] V. Salmaso, M. Sturlese, A. Cuzzolin, S. Moro, *Structure*, 2017, **25**(4), 655.
- [8] A. Laio, M. Parrinello, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**(20), 12562.
- [9] W.L. Jorgensen, C. Ravimohan, *J. Chem. Phys.*, 1985, **83**(6), 3050.

### The Influence of Time in Molecular Behaviour: an Introduction to Molecular Dynamics

Molecular Dynamics (MD) simulations can provide not only plentiful dynamical structural information on bio-macromolecules but also a wealth of energetic information about protein and ligand interactions. Such information is very important to understand the structure-function relationship of the target and the essence of protein-ligand interactions and to guide the drug discovery and design process. Thus, MD simulations have been applied widely and successfully in each step of modern drug discovery.

DOVE FINISCE IL SUV,  
COMINCIA STELVIO.



## ALFA ROMEO STELVIO

Consumi ciclo combinato gamma Stelvio: bz/ds da 4,7 a 7,0 (l/100km). Emissioni CO<sub>2</sub> ciclo combinato gamma Stelvio: da 124 a 161 (g/km).

*La meccanica delle emozioni*





ALFONSO POZZAN, STEFANO FONTANA, SIMONE BRAGGIO  
 DRUG DESIGN AND DISCOVERY DEPARTMENT (DD&D)  
 APTUIT, AN EVOTEC COMPANY RESEARCH CENTRE, VERONA  
 ALFONSO.POZZAN@APTUIT.COM

# PREDIZIONE DI PROPRIETÀ ADME/PK NELLA RICERCA DI NUOVI FARMACI

*Le proprietà ADME/PK di un potenziale farmaco devono essere tali da poter garantire una presenza sufficiente (per tempo di residenza e per concentrazione) in corrispondenza del sito d'azione del principio attivo. E questo a fronte di un dosaggio sufficientemente basso da limitare ogni effetto indesiderato. Allo scopo di aumentare la probabilità di ottenere molecole con queste caratteristiche la predizione delle proprietà ADME/PK diventa di fondamentale importanza. Dalle numerose analisi condotte negli ultimi vent'anni risulta che molto si può già fare utilizzando strumenti come l'analisi delle proprietà chimico-fisiche e la costruzione di modelli più complessi e mirati.*

Ogni chimico medicinale che si occupi di drug discovery sa molto bene quanto gli studi *in vitro* di Assorbimento Distribuzione Metabolismo ed Escrezione (ADME) e gli studi *in vivo* di farmacocinetica (PK) siano fondamentali per l'identificazione di molecole candidate alle fasi pre-cliniche e cliniche. Sono, infatti, le proprietà ADME che consento-

no, a chi si occupa di sviluppo farmaceutico, di poter comprendere con studi di efficacia e tossicologia la reale potenzialità per una molecola di diventare un farmaco. Per quanto possibile, è quindi opportuno incorporare fin da subito quelle caratteristiche chimico-fisiche che potranno in futuro garantire un buon profilo ADME/PK. In Fig. 1 abbiamo riportato

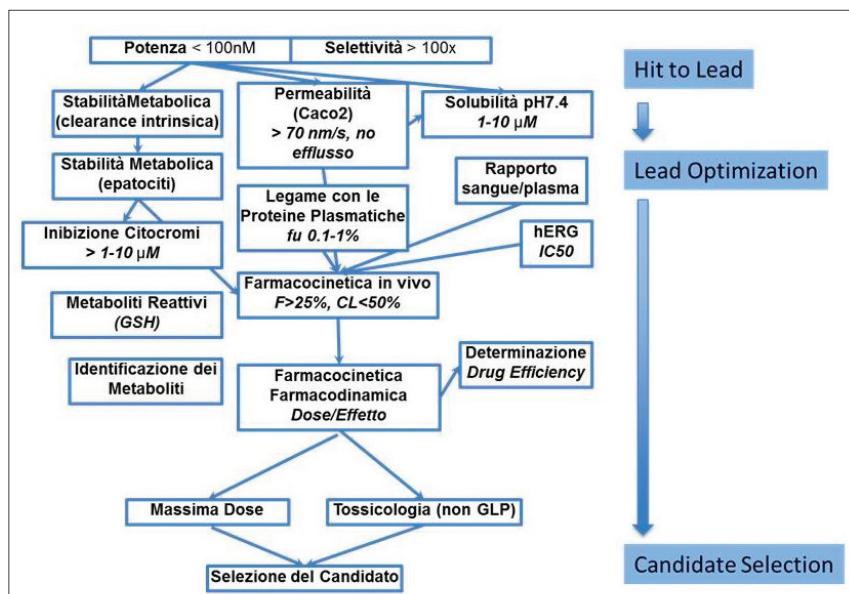


Fig. 1 - Esempio di cascata di screening per un progetto di ricerca per nuovi farmaci. Si notino il numero di saggi relativi a studi di ADME/PK

una possibile cascata di screening per un progetto di drug discovery. Ad ulteriore conferma dell'importanza di questi studi di ADME, notiamo come a valle degli studi di affinità/selettività trovano spazio un notevole numero di screening ADME/PK. Inoltre, è interessante notare come all'incremento delle capacità di screening biologici (HTS) osservato negli ultimi 10/15 anni e la richiesta di accorciare i tempi necessari per identificare un candidato preclinico, sia seguita una crescente domanda di dati ADME/PK. Le analisi dei dati generati e lo sviluppo di metodologie computazionali stanno dando un notevole impulso all'*in-silico* ADME/PK, contribuendo ad un miglioramento sostanziale dei processi di drug discovery.





## L'importanza delle proprietà chimico-fisiche e di semplici modelli ADME/PK

Benché lontano nel tempo (Anni Sessanta/Settanta) il lavoro di Hansch, Iwasae e Fujita [1] al Pomona College e di Chou e Jurs [2] all'Università della Pennsylvania, che portarono allo sviluppo di un algoritmo per il calcolo del  $\log P$  (CLOGP), può certamente annoverarsi tra i primi metodi computazionali che poteva essere utilizzato per creare una relazione tra le proprietà chimico-fisiche e ADME delle molecole. Il ClogP e altre semplici proprietà chimico-fisiche verranno poi utilizzate da Lipinski [3] per formulare la popolare "rule of five". Il lavoro di Lipinski, derivato da un database di candidati clinici in fase II, afferma che un miglior assorbimento e permeabilità sono più probabili quando il ClogP è  $<5$ , il peso molecolare  $<500$  dalton, il numero di donatori di legami idrogeno (OH e NH)  $<5$  e il numero di accettori di legami idrogeno (O e N) è  $<10$ . L'immediatezza e la semplicità di calcolo hanno reso la regola di Lipinski una delle principali misure di "drug-likeness".

Analisi successive mostrarono, in realtà, che lo spazio chimico delle molecole sintetizzate varia a seconda del periodo storico, dell'area terapeutica, della tipologia dei target biologici, ma dipende anche da aspetti insiti nella cultura dei laboratori di ricerca. Tutti questi fattori sono stati ben descritti da Leeson e Springthorpe [4] in una dettagliata analisi del 2007, che mise in guardia la comunità scientifica riguardo il rischio associato alla candidatura di composti con ClogP maggiore di 4,5-5. Per cercare di quantificare quanto osservato venne introdotto il concetto di Liphophilicity Ligand Efficiency (LLE) dove  $LLE = pIC_{50}$  (or  $pKi$ ) - ClogP (o ClogD). Secondo lo studio di Leeson, i candidati clinici dovrebbero avere una  $LLE > 5$ , ovvero per una molecola di potenze pari a 10 nM, il valore massimo di ClogP dovrebbe essere  $< 3$ .

L'importanza della lipofilia in rapporto alle proprietà ADME ottimali è stata in seguito confermata da diversi autori con l'introduzione di altre "rules". Nel 2010 e 2011 Young *et al.* [5, 6] introdussero due parametri: SFI (Solubility Forecast Index) e PFI (Property Forecast Index), dove  $SFI = ClogP + (\text{Numero di anelli aromatici})$  mentre  $PFI = \text{chromLogD}_{pH7.4} + (\text{Numero di anelli aromatici})$ . Anche in questa analisi sorprende la stretta relazione che esiste tra la somma di due parametri chi-

mico-fisici e le proprietà ADME misurate. Nello studio di Young, il 67% dei candidati analizzati ha valori accettabili di solubilità, legame con le proteine plasmatiche (albumina), interazione con i citocromi, clearance intrinseca, affinità per hERG e una bassa promiscuità, se l'indice PFI è inferiore a 5. Solo la permeabilità migliora con valori più alti di PFI. È opportuno notare che nel caso dell'indice PFI si preferisce l'utilizzo di una misura cromatografica del  $\log D$  rispetto a quella determinata attraverso la ripartizione ottanolo/acqua, dato che molecole poco solubili e lipofile non sempre consentono misurazioni precise con i metodi di ripartizione. Young dimostra inoltre come i valori calcolati di  $\text{chromLogD}$  correlino bene con i valori misurati sperimentalmente. Ciò consente di utilizzare il PFI anche in fase di predizione. In letteratura sono riportate altre semplici "rules" simili a quelle già menzionate: ricordiamo quella di Gleeson (rule 4/400: peso molecolare  $< 400$  e  $ClogP < 4$  riduce i rischi ADME) [7], o Veber (buona biodisponibilità se i legami rotabili  $< 10$  e l'area della superficie polare (PSA)  $< 140 \text{ \AA}^2$ ) [8]. Benché semplici regole non possano certo descrivere completamente la complessità dei fattori che contribuiscono alle proprietà ADME di una molecola, è altresì chiaro come semplici strumenti possano già fornire delle utilissime indicazioni sulla loro futura sviluppabilità. Per ovviare ad alcuni inconvenienti impliciti nelle semplici "rules", quale ad esempio la discontinuità generata da valori di cut-off, Birketon *et al.* [9] proposero un modello chiamato Quantitative Estimate of Drug likeness (QED) dove sette diverse proprietà chimico-fisiche (MW, ALogP, HDB, HBA, PSA, ROTB, AROM, ALERTS) [10] e la presenza di gruppi potenzialmente tossici, vengono confrontate con quelle di farmaci in uso corrente al fine di ottenere un singolo parametro "quantitativo" da utilizzare per ordinare le molecole in esame secondo un *continuum* di drug-likeness. Il QED rappresenta un passo avanti nel cercare di armonizzare diversi parametri chimico-fisici, consentendo di non scartare a priori quelle molecole dove una proprietà non proprio ideale può essere tollerata nel caso tutte le altre siano all'interno di valori ottimali.

In aggiunta all'utilizzo di queste regole e modelli, quello che nel nostro lavoro di ricerca è risultato utile è la "mappatura" delle proprietà-chimico fisiche delle molecole in esame, assieme a molecole di riferimen-

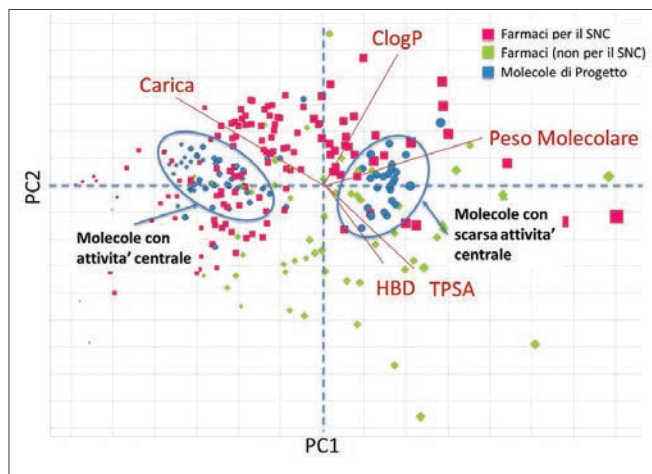


Fig. 2 - Analisi delle componenti principali dello spazio chimico fisico di un set di molecole di progetto confrontato con lo spazio occupato da farmaci sul mercato. I farmaci sul mercato sono stati divisi tra quelli attivi a livello di sistema nervoso centrale (SNC) e quelli non attivi

to, utilizzando l'analisi delle componenti principali. Come descritto in Fig. 2, una serie di molecole sintetizzate all'interno di un progetto, per un target presente sia a livello di sistema nervoso centrale che periferico, sono state mappate assieme a farmaci orali presenti oggi sul mercato. Questo tipo di analisi ha quindi permesso di differenziare, per le molecole sintetizzate, lo spazio occupato da quelle che non raggiungono il sistema nervoso centrale dallo spazio occupato da quelle che invece possono raggiungerlo.

Mappando in seguito i singoli contributi (intensità e direzione) dati dalle principali variabili utilizzate, si possono fare delle interessanti considerazioni, confermando da un lato quanto già riportato in letteratura su ciò che rende le molecole più o meno "CNS like" e, dall'altro, permettendo di modulare in modo più preciso i parametri ADME delle varie classi chimiche, direzionandole verso un'attività più periferica o centrale. Volendo riassumere alcuni semplici concetti, possiamo affermare che il calcolo di proprietà chimico-fisiche, abbinato a modelli relativamente semplici ed intuitivi, possono fornire delle valide indicazioni sulle probabili caratteristiche ADME/PK che una molecola avrà ancor prima che venga sintetizzata. Questo può trovare impiego sia a livello di drug design che come strumento per prioritizzare le molecole da caratterizzare con successivi studi *in vitro* o *in vivo* a vantaggio di una maggiore efficienza all'interno dei programmi di ricerca.

## Elaborazione di modelli predittivi

Durante la progressione di un progetto di drug discovery ci si trova molto spesso a dover dare delle indicazioni più precise sui fattori che regolano le proprietà ADME/PK delle serie chimiche che si stanno ottimizzando. Contestualmente, ci si può trovare nella condizione di aver generato una cospicua quantità di dati sperimentali tali da rendere possibile la costruzione di modelli predittivi specifici. Si parla molto spesso in questo caso di modelli QSPR ovvero Quantitative Structure Property Relationship in analogia ai modelli (Q)SAR che si costruiscono a partire dai dati di attività/potenza. Il nocciolo della questione è molto simile, trovare una relazione tra la struttura chimica delle molecole e la proprietà in questione (ad esempio la permeabilità, il legame con le proteine plasmatiche, la stabilità metabolica...) misurata in un saggio *in vitro* o *in vivo*. È importante ricordare che modelli quantitativi, per definizione, generano dei numeri. Questi numeri a volte possono essere mal interpretati se non considerati all'interno del contesto specifico in cui sono stati generati, senza una solida conoscenza del dato sperimentale e del modello stesso. In una recente review prodotta nell'ambito di un consorzio composto da più industrie farmaceutiche [11] sono elencati i requisiti affinché i modelli ADME/PK abbiano un impatto nel processo di ricerca farmaceutica. Questi requisiti sono: la presenza di esperti ADME/PK con la capacità di sviluppare modelli robusti e affidabili (in genere chimici computazionali o chemoinformatici con un chiaro interesse nella comprensione delle proprietà ADME); la presenza di esperti *in-silico* e *in vitro/vivo* in grado di valutare i modelli monitorando nel tempo la qualità; una infrastruttura chemoinformatica in grado di rendere accessibili e fruibili i modelli; ricercatori e team che vogliono testare i modelli nelle loro fasi iniziali di messa a punto; educatori e promotori in grado di presentare i modelli e diffonderne il loro utilizzo con il supporto da parte del management.

## Un esempio di modello predittivo QSPR: predizione della Drug Efficiency

Nel nostro gruppo di ricerca da diversi anni abbiamo introdotto il concetto di Drug Efficiency (DEff) [12-14]. Come definizione generale si tratta di misurare la concentrazione libera che una molecola raggiunge nel distretto anatomico dove si vuole ottenere l'effetto

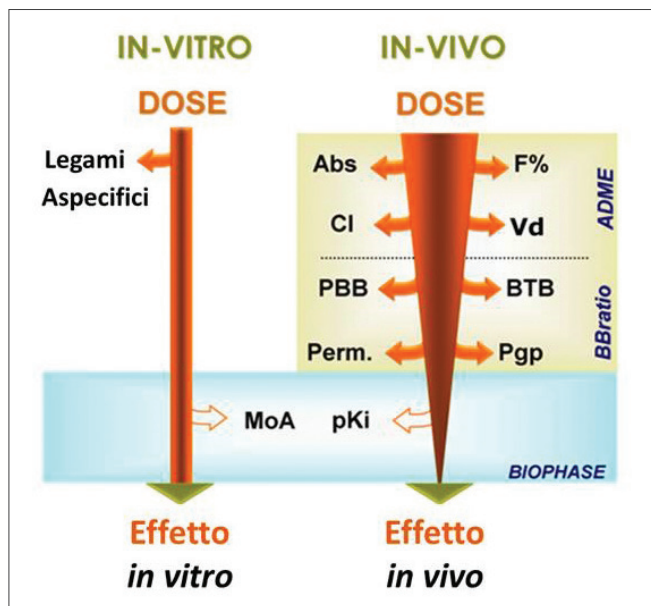


Fig. 3 - A differenza degli studi *in vitro*, dove il "100% della dose" è tutta disponibile per il target, negli studi *in vivo* le varie componenti ADME e (nel caso specifico dell'esempio) i fenomeni che regolano la distribuzione di un farmaco a livello di sistema nervoso centrale, fanno sì che solo una piccola parte della dose iniziale raggiunga il target. Legenda: Abs=assorbimento, F%=biodisponibilità, CI=clearance, Vd=volume di distribuzione, PBB=legame alle proteine del plasma o del cervello, BTB=capacità di legarsi ai tessuti cerebrali, Perm=permeabilità, Pgp=interazione con P-glicoproteine o altri trasportatori, MoA=azione farmacologica, pKi=affinità per il target

farmacologico (sistema nervoso centrale, polmone, fegato...) per poi confrontarla con la dose iniziale (Fig. 3). Questo approccio consente di ottenere una misura a valle di tutti gli effetti ADME/PK nella loro intera complessità (biodisponibilità, stabilità metabolica, fenomeni di trasporto, affinità aspecifica per proteine e tessuti...) rendendolo quindi un parametro ideale, assieme all'affinità per il target, per la selezione di candidati preclinici.

Essendo la DEff una misura *in vitro* e *in vivo*, ci siamo chiesti se fosse possibile costruire un modello QSPR per poterla predire. All'inizio la scelta è ricaduta sulla messa a punto di un modello generale per il sistema nervoso centrale utilizzando un set di circa un centinaio di molecole, tra farmaci sul mercato e candidati sviluppati all'interno di progetti di lead optimization, per le quali abbiamo misurato la CNS DEff. In Fig. 4 abbiamo riportato i parametri chimico-fisici calcolati e utilizzati inizialmente per la costruzione del modello. Tali parametri sono stati organizzati come matrice di correlazione al fine di identificare l'esistenza di sem-

plici relazioni con la DEff (logDE nel grafico), ancor prima della costruzione del modello di predizione. Dalla Fig. 4, all'incrocio della prima riga (logDE) con le colonne ClogP, ClogD e TPSA si osservano delle probabili correlazioni indicate da sfere di colore più intenso. Ci si può quindi aspettare da queste variabili un maggior contributo al modello predittivo. La matrice di correlazione consente anche di valutare in prima approssimazione le reali dimensioni dei dati utilizzati. Dato che variabili molto correlate tra di loro (ad esempio peso molecolare, numero di atomi e rifrattività molare) contengono informazioni per certi versi ridondanti.

Ci sono varie tecniche che consentono di costruire modelli a partire da un set di variabili e un set di dati sperimentali. Nella nostra esperienza quelli che si sono rivelati più utili e semplici da implementare

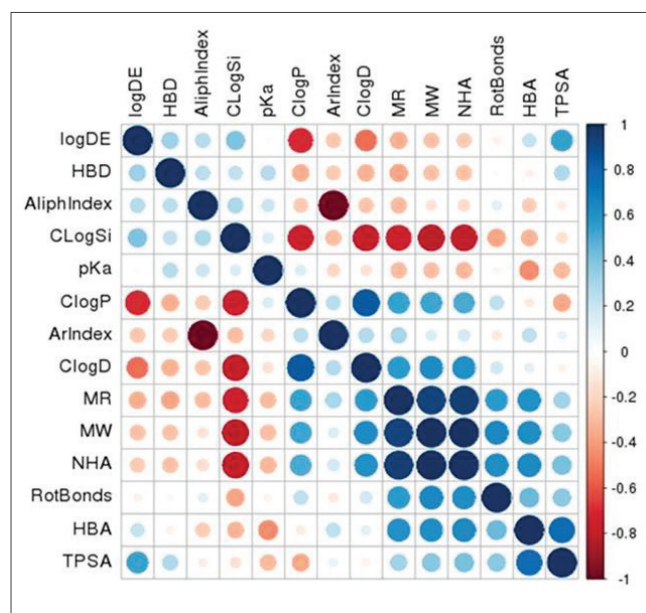


Fig. 4 - Matrice di correlazione per una serie di proprietà chimico-fisiche calcolate [si veda la nota 15 per una loro spiegazione] e il logDEff (logDE). All'incrocio tra riga e colonna viene riportato il coefficiente di correlazione utilizzando il codice colore (da blu a rosso) sulla destra. Valori positivi in blu indicano una correlazione diretta tra le variabili, valori negativi (colore rosso) indicano una correlazione inversa. La diagonale della matrice rappresenta la variabile contro se stessa e quindi la correlazione (positiva) è uguale a 1. Nel nostro caso è possibile osservare come in corrispondenza della prima riga (logDE) due possibili correlazioni sono suggerite dalla sfera rossa di intensità -0,7 per ClogP e quella azzurra di intensità 0,6 per l'area della superficie polare (TPSA). La matrice di correlazione consente di osservare come i parametri chimico-fisici sono correlati tra loro. Alcuni di questi parametri potranno essere in seguito eliminati senza perdere in "contenuto informativo".

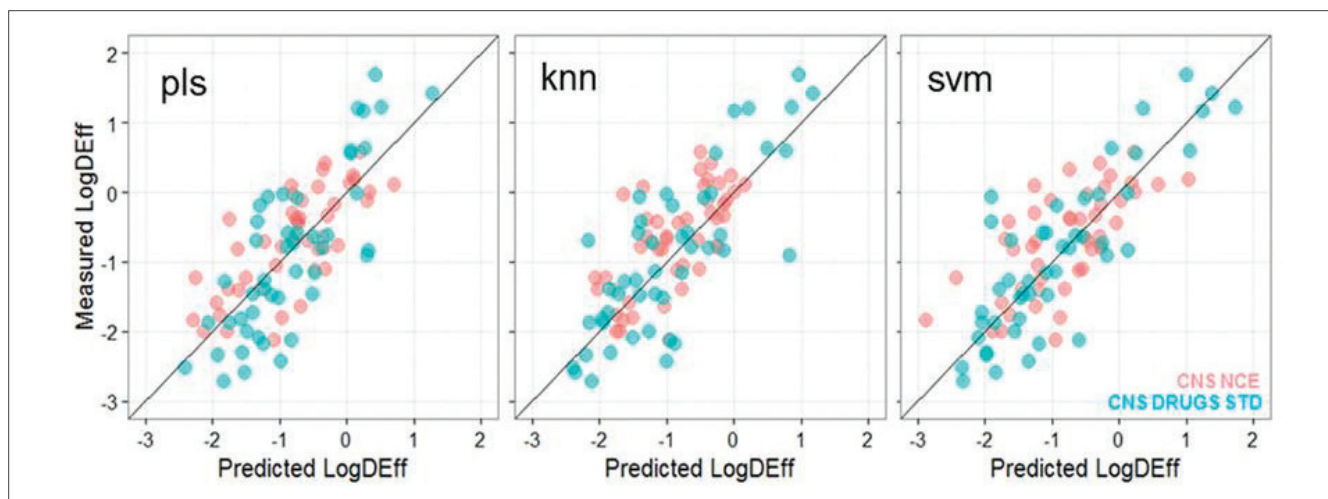


Fig. 5 - Tre modelli di predizione della DEff (logDEff) preparati utilizzando tre diverse metodiche (PLS, KNN e SVM) a partire dallo stesso set di dati ed utilizzando il modello minimo di cross validazione Leave One Out (LOO). Legenda: CNS NCE= candidati per il sistema nervoso centrale. CNS DRUGS STD= farmaci per il sistema nervoso centrale

sono la PLS (Partial Least Square), la kNN (Nearest Neighbours learning machine) e la SVM (Support Vector Machines). Questi metodi consentono di creare sia modelli lineari (PLS) che non lineari (kNN e SVM). Un modello PLS consente di capire in modo chiaro quello che è l'effetto dei singoli parametri. Modelli costruiti con altri metodi, come kNN e SVM, riescono in genere a migliorare le prestazioni predittive a scapito di una maggior difficoltà nell'interpretare il ruolo e il contributo delle singole variabili. Resta fondamentale, per tutti i casi, la verifica delle capacità predittive dei modelli utilizzando, oltre alla validazione interna (i.e. cross validation) anche data-set esterni a quelli utilizzati durante le fasi di messa a punto del metodo. Solo in questo modo si riesce a comprendere il reale campo di applicazione del modello e quanto questo sia

predittivo e/o descrittivo in relazione ai dati utilizzati. In Fig. 5 è possibile osservare tre modelli di predizione della DEff con valori di validazione interna  $Q^2$  variabile da 0,57 a 0,63 a seconda del metodo utilizzato. La domanda che ci si pone ora è: possiamo utilizzare questo modello per la predizione della DEff di molecole completamente diverse per serie chimica e livello di ottimizzazione per il sistema nervoso centrale? Quello che abbiamo osservato, in questo caso, è un peggioramento della predizione rispetto a quelli precedenti. Confrontando i valori predetti di DEff nel caso del set esterno (Fig. 6 grafico al centro) si può osservare un generale slittamento dei punti rispetto a quanto misurato sperimentalmente. Se invece il modello viene ricostruito utilizzando la nuova serie di molecole (Fig. 6, grafico a destra) il modello migliora la loro predizione.

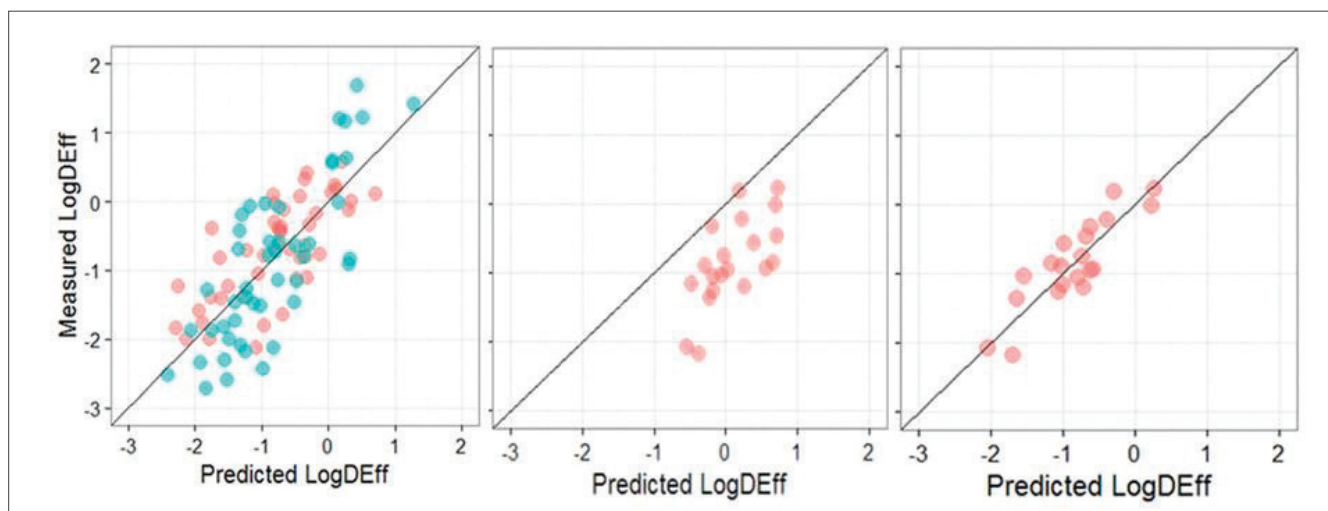


Fig. 6 - Nel grafico a sinistra è visualizzato il modello PLS di predetti contro valori sperimentali di DEff sviluppato a partire da un set di molecole CNS (in colore rosso i farmaci e in azzurro i candidati). Nel grafico al centro il modello di sinistra è applicato ad un set esterno in colore rosso. Nel grafico a destra è visualizzato un modello PLS ricalcolato *ad hoc* sul set esterno sempre di colore rosso



Il problema di fondo risiede nella diversa risoluzione dei modelli. Un modello generale consente di catturare i parametri che determinano grandi variazioni di DEff (ad esempio peso molecolare e lipofilia). Trasferendo la predizione a classi chimiche completamente diverse, con piccole variazioni di proprietà chimico-fisiche, non si riescono ad ottenere le stesse prestazioni. In questo caso è necessario ricorrere a modelli "locali" preparati su serie analoghe e, nel contempo, ricercare nuove combinazioni di descrittori e metodi per migliorare la predizione. Non sempre i modelli si comportano allo stesso modo; è per questo che di volta in volta bisogna valutarne il reale campo di applicazione, adattandoli, se necessario, al contesto preciso del progetto.

#### Alcune considerazioni conclusive

Nell'esempio di predizione della DEff, tutte le proprietà ADME/PK di una molecola sono considerate in modo implicito; tuttavia la costruzione di modelli per singole proprietà ADME è molto importante per cercare di migliorare quegli aspetti che risultano maggiormente critici per la serie di molecole in esame. La metodica generale che si può seguire per costruire questi modelli è simile a quanto descritto. Esistono tuttavia anche altre metodiche che si possono utilizzare. Un esempio è l'utilizzo di descrittori 3D(3D-QSPR) calcolati su una o più conformazioni delle molecole in esame o l'utilizzo di modelli strutturali, come il docking delle molecole nei citocromi o l'utilizzo di calcoli quanto-meccanici per predire la formazione di metaboliti reattivi. La collaborazione tra chimici medicinali, chimici computazionale e ricercatori DMPK e l'utilizzo dell'*in-silico* ADME/PK durante le fasi di discovery può realmente aumentare la probabilità di trovare candidati con un favorevole profilo farmacocinetico e farmacodinamico.

#### Bibliografia

- [1] T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansh, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 5175.
- [2] J. Chou, P.J. Jurs, *Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1979, **19**, 172.
- [3] C.A. Lipinski *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1997, **23**, 3.
- [4] P.D. Leeson, B. Springthorpe, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, **6**, 881.
- [5] A. Hill, R. Young, *Drug discovery today*, 2010, **15**, 648.
- [6] R. Young *et al.*, *Drug discovery today*, 2011, **16**, 822.
- [7] M.P. Gleeson, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 817.
- [8] D.F. Veber *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.
- [9] G.R. Bikerton *et al.*, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 90.
- [10] MW=peso molecolare, ALOGP=LogP calcolato con il metodo basato sul contributo dei singoli atomi, HDB=numero di atomi donatori di legami idrogeno, HBA=numero di atomi accettori di legami idrogeno, PSA=area della superficie polare, ROTB=numero di legami rotabili, AROM=numero di anelli aromatici, ALERTS=numero di gruppi reattivi/tossici.
- [11] F. Lombardo *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 9097.
- [12] S. Braggio *et al.*, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2010, **5**, 1.
- [13] T. Rossi, S. Braggio, *Curr. Op. Pharmacol.*, 2011, **11**, 515.
- [14] K.D. Read, S. Braggio, *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2010, **6**, 337.
- [15] MW=peso molecolare, MR=refrattività molare, ClogP, ClogD, ClogS=solubilità calcolata, pKa, HDB=numero di atomi donatori di legami idrogeno, HBA=numero di atomi accettori di legami idrogeno, NHA=numero di atomi escluso gli idrogeni, TPSA=area della superficie polare, ArIndex, AliphIndex=frazione di atomi alifatici e aromatici, RotBonds=numero di legami rotabili.

#### Prediction of ADME/PK Properties in Drug Discovery

ADME/PK properties of a drug needs to guarantee a minimum concentration of the active principle (residence time and concentration) at the biophase. This needs to be achieved with a dose, low enough to prevent any adverse effect. In order to increase the probability to obtain molecules with such properties the prediction of ADME/PK become fundamentally important. From the studies carried out during the last 20 years it is emerging that we can do many "predictions" already using methods involving the analysis of the physicochemical properties and the elaboration of more complex and focused models.

# L'evento italiano sulla Cogenerazione

## mCTER Cogenerazione

### Applicazioni di Cogenerazione

Dopo l'eccezionale successo del 2017, torna a Milano la mostra convegno sulla cogenerazione industriale e civile. Il target di riferimento è composto da progettisti, ingegneri, impiantisti, responsabili tecnici, manager, utilizzatori di energia e calore dall'industria, dal terziario e dai servizi.

Il programma prevede:

- ✓ quattro sessioni plenarie in contemporanea
- ✓ una parte espositiva con più di cento aziende partecipanti
- ✓ workshop, seminari, corsi di formazione
- ✓ coffee-break e buffet offerti dagli sponsor
- ✓ in esclusiva gratuitamente tutti i contenuti in PDF

## 28 giugno 2018

Crowne Plaza Hotel - San Donato Milanese (MI)

In concomitanza con



Sponsored by



Supported by



Organizzato da



Partner ufficiale



Registrazione gratuita per gli operatori professionali



21

edizioni di successo



1.000

operatori previsti



+100

aziende rappresentate



4

convegni plenari



+20

workshop



[www.mcter.com/cogenerazione\\_milano](http://www.mcter.com/cogenerazione_milano)



SIMONA KOVARICH, MANUELA PAVAN, ARIANNA BASSAN, ELENA FIORAVANZO  
S-IN SOLUZIONI INFORMATICHE SRL, VICENZA  
SIMONA.KOVARICH@S-IN.IT  
WWW.S-IN.IT

# VALUTAZIONE QSAR DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

*La linea guida ICH M7 promuove l'uso delle metodologie (Q)SAR per la valutazione del potenziale genotossico delle impurezze di principi attivi farmaceutici. La valutazione computazionale consente uno screening delle impurezze attuali e potenziali, ottimizzando tempi e costi della sperimentazione.*



I metodi computazionali, come gli approcci (Q)SAR ((Quantitative) Structure-Activity Relationships) e la modellistica molecolare, sono ampiamente utilizzati nel settore farmaceutico nelle diverse fasi dello sviluppo e della progettazione di nuovi farmaci, così come nell'ottimizzazione di farmaci già esistenti. La loro applicazione può essere finalizzata ad analisi conformazionali e dello spazio chimico (*drug design*), a screening di proprietà fisico-chimiche, ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione) e tossicologiche, o, più recentemente, anche per adempiere a requisiti regolatori, come per la valutazione delle impurezze del farmaco.

Le impurezze di prodotti farmaceutici comprendono qualsiasi componente della sostanza attiva o della sua formulazione derivante dalla sintesi o degradazione

del farmaco o da una contaminazione esterna. La caratterizzazione delle impurezze rappresenta una fase fondamentale all'interno del processo di sintesi e produzione di principi attivi farmaceutici, ed è sottoposta a linee guida regolatorie internazionali, come le linee guida definite dall'ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) per la qualificazione ed il controllo delle impurezze (ICH Q3A e Q3B, per le impurezze nelle sostanze attive e prodotti farmaceutici, rispettivamente). Negli ultimi anni le autorità regolatorie hanno posto l'accento soprattutto sul problema delle impurezze potenzialmente genotossiche, introducendo una nuova linea guida (ICH M7) per l'identificazione, la classificazione, la qualificazione e il controllo delle impurezze genotossiche al fine di limitare il potenziale rischio cancerogeno dei farmaci. La linea guida ICH M7 fornisce raccomandazioni e linee guida per l'utilizzo delle metodologie (Q)SAR per la valutazione del potenziale genotossico delle impurezze, favorendo così l'utilizzo di metodi alternativi alla sperimentazione (*in vitro* e/o *in vivo*) nel contesto regolatorio dei farmaci. In particolare, la linea guida prevede che, in assenza di dati sperimentali di mutagenicità e/o carcinogenicità, necessari per la classificazione delle impurezze come mutagene e/o cancerogene (Classi 1, 2 e 5 - Tab. 1), la valutazione del potenziale mutageno possa essere effettuata mediante l'utilizzo di modelli (Q)SAR. In accordo con la linea guida, la valutazione computazionale deve essere effettuata usando due metodologie (Q)SAR com-



Classe	Definizione	Approccio	Azioni di controllo
1	Nota mutagena cancerogena	Valutazione dati sperimentali (database/letteratura)	Controllare/mantenere sotto limiti di accettabilità (specifici per l'impurezza)
2	Nota mutagena, no dati su cancerogenicità	Valutazione dati sperimentali (database/letteratura)	Controllare/mantenere sotto limiti di accettabilità (TTC)
3	No dati mutagenicità, predetto potenziale mutageno	Valutazione computazionale ((Q)SAR)	Controllare/mantenere sotto limiti di accettabilità (TTC) o fare un test di Ames
4	No dati mutagenicità, predetto potenziale mutageno ma alert strutturale condiviso con API o composti correlati all'API (es: intermedi), per i quali vi sono dati sperimentali e risultano non mutageni.	Valutazione computazionale ((Q)SAR)	Considerare come non-mutagena
5	Non-mutagena e/o non-cancerogena, oppure predetta come non-mutagena	Valutazione dati sperimentali e/o valutazione computazionale	Considerare come non-mutagena

Tab. 1 - Classificazione delle impurezze genotossiche e azioni di controllo (Tab. 1 ICH M7)

plementari, ossia un approccio su base statistica ed un sistema esperto. I modelli (Q)SAR impiegati nella valutazione computazionale devono essere conformi ai **principi definiti dall'OECD** (Organisation for Economic Co-operation and Development) per la validità e l'applicabilità di tali modelli per fini regolatori, ossia essere caratterizzati da:

- 1) un endpoint definito;
- 2) un algoritmo definito;
- 3) un definito dominio di applicabilità;
- 4) una validazione interna ed esterna;
- 5) un'interpretazione meccanicistica, se possibile.

Il ruolo dell'esperto è infine fondamentale per la revisione e valutazione dei risultati ottenuti mediante l'utilizzo di modelli (Q)SAR, al fine di supportare qualsiasi predizione positiva (mutageno) o negativa (non-mutageno), così come per fornire un'adeguata giustificazione in caso di risultati conflittuali o incerti [1].

## Metodologie (Q)SAR: modelli statistici e sistemi esperti

Convenzionalmente si possono distinguere due differenti metodologie (Q)SAR: i modelli su base statistica ("*statistical-based methods*") e i sistemi esperti ("*expert rule-based methods*" o "*knowledge-based methods*").

I modelli statistici, propriamente definiti dall'acronimo QSAR, si basano su una relazione quantitativa (statistico-matematica) tra una rappresentazione numerica della struttura chimica (definita tramite descrittori molecolari) ed una specifica proprietà o attività biologica. Ad oggi sono migliaia i descrittori molecolari che sono stati sviluppati sulla base di diverse teorie ed approcci chemiometrici al fine di fornire una descrizione esaustiva della struttura chimica. Tali descrittori codificano proprietà strutturali mono-, bi- o tri-dimensionali delle molecole







(es: contatori di atomi, descrittori topologici, ecc.), proprietà chimico-fisiche (es: LogP) o proprietà elettroniche. Analogamente, molteplici sono gli algoritmi attualmente utilizzati per identificare la relazione quantitativa tra struttura e attività/proprietà, al fine di costruire dei modelli statisticamente robusti e predittivi (es: metodi di regressione multivariata (*Multiple Linear Regression* - MLR; *Partial Least Square Regression* - PLS), reti neurali (*Artificial Neural Networks* - ANN), ecc.). Ne deriva quindi che la maggior parte dei modelli su base statistica sia caratterizzata da robuste tecniche di validazione statistica e alte performance predittive (sebbene con una tendenza a decrescere all'aumentare della complessità della proprietà/attività predetta). I modelli statistici sono inoltre caratterizzati da un dominio di applicabilità ben definito (esistono ormai diversi metodi per la definizione del dominio di applicabilità e di stima del livello di estrapolazione di una predizione) e dalla possibilità di fornire delle predizioni anche quando il meccanismo d'azione non è noto a priori. Tuttavia, non è sempre possibile dare una chiara interpretazione delle predizioni generate da un modello QSAR, specialmente quando il modello utilizzato si basa su algoritmi e descrittori complessi, risultando così poco "trasparenti" all'utente finale.

I sistemi esperti si basano su un sistema di "regole" derivanti dalla conoscenza tossicologica esistente, caratterizzata da forti basi meccanicistiche (i.e., conoscenza del meccanismo d'azione), che viene utilizzata per predire un determinato effetto avverso. Nella maggior parte dei sistemi esperti, le regole (ossia i frammenti strutturali correlati ad un determinato effetto) vengono identificate da esperti tossicologi sulla base dell'analisi approfondita di serie di molecole "attive" per un determinato effetto che condividono uno stesso frammento ("*structural alert*" - SA). Più recentemente, si sono sviluppati algoritmi in grado di identificare automaticamente alert strutturali correlati ad un effetto/attività. I sistemi esperti possono essere basati su semplici regole (es: presenza/assenza di un alert) o su alberi decisionali più complessi. Il punto di forza dei sistemi esperti consiste nella possibilità di fornire agevolmente un'interpretazione meccanicistica della predizione (che viene spesso supportata da riferimenti bibliografici e una valutazione dell>alert identificato). Per tale motivo le

predizioni risultano spesso all'utente finale più trasparenti e facilmente interpretabili. Come i modelli statistici, anche i sistemi esperti presentano alcuni svantaggi, in quanto sono ad oggi limitate le misure per definirne un dominio di applicabilità [2], elemento essenziale per determinare l'attendibilità di una predizione, così come spesso non è possibile discriminare molecole attive e inattive che possiedono uno stesso alert strutturale, rendendo così i sistemi esperti dei metodi predittivi conservativi. Per quanto riguarda le performance predittive, l'accuratezza dei sistemi esperti è spesso paragonabile a quella dei modelli statistici, anche se i sistemi esperti tendono ad essere caratterizzati da una più bassa specificità (ossia comportano una più alta frequenza di falsi positivi) [3].

È importante ricordare che qualsiasi modello predittivo (inclusi i modelli (Q)SAR) è, per definizione, una simulazione della realtà, e, pertanto, non è mai accurato al 100%. Come discusso sopra, ciascun approccio computazionale, sia esso un modello statistico o sistema esperto, presenta dei punti di forza e dei limiti. Allo stesso modo, ciascun modello (Q)SAR è caratterizzato da specifiche capacità predittive (es., sensibilità VS specificità) ed un definito dominio di applicabilità (nessun modello può essere applicato all'intero universo chimico), fornendo così diverse "viste" parziali sulle proprietà/attività predette per una data molecola. Pertanto, l'approccio raccomandato per raccogliere al meglio le informazioni fornite da ciascun modello e ottenere predizioni più accurate consiste nel combinare le predizioni ottenute da diversi modelli e approcci computazionali (statistico ed esperto). Tale combinazione può essere fatta dall'esperto o mediante l'utilizzo di appropriati algoritmi [4]. È infatti dimostrato che l'uso complementare di approcci statistici ed esperti, supportati da una valutazione da parte dell'esperto, determina un incremento dell'accuratezza nelle predizioni [5, 6].

Per agevolare e incentivare l'utilizzo dei modelli (Q)SAR (in ambito regolatorio o per fini di ricerca e sviluppo), nel corso degli anni istituti di ricerca, università e aziende private si sono focalizzati sull'implementazione di tali modelli (spesso disponibili unicamente nella letteratura scientifica) in soluzioni software, rendendo così i modelli facilmente acces-

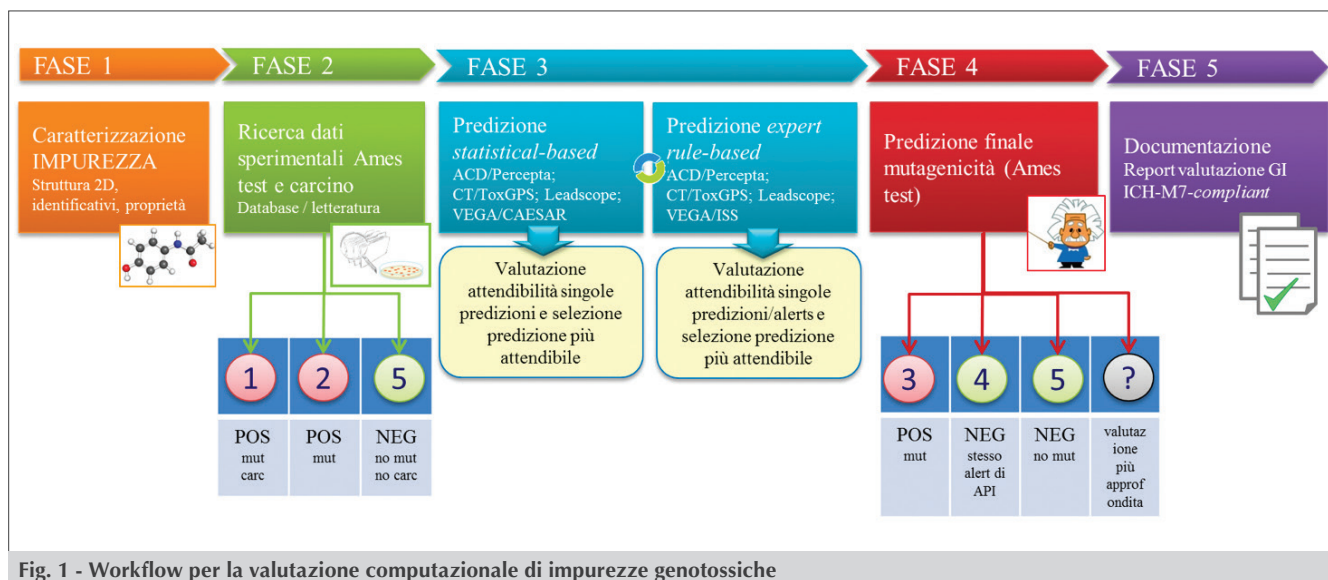


Fig. 1 - Workflow per la valutazione computazionale di impurezze genotossiche

sibili anche a utenti non esperti. Per quanto riguarda i modelli (Q)SAR per la predizione della mutagenicità, sono ad oggi disponibili numerosi software, sia commerciali che di pubblico dominio (per un maggiore approfondimento fare riferimento alle seguenti reviews [7-11]).

## Workflow per la valutazione computazionale di impurezze genotossiche

Come descritto inizialmente, la linea guida ICH M7 fornisce delle indicazioni precise su come effettuare la valutazione e la classificazione delle impurezze genotossiche. Sulla base dell'esperienza acquisita nell'ambito dei numerosi servizi di consulenza per industrie farmaceutiche o produttori di principi attivi, descriviamo qui di seguito la procedura da noi utilizzata per la valutazione del potenziale mutageno delle impurezze in conformità con la linea guida ICH M7 [12]. La stessa procedura è illustrata in Fig. 1.

### Fase 1

Caratterizzazione dell'impurezza target in termini di struttura chimica, identificativi (nome comune, nome IUPAC, CAS...), descrittori strutturali (SMILES, InChI), peso molecolare e formula molecolare.

### Fase 2

Ricerca di eventuali dati sperimentali di mutagenicità (Ames test) e cancerogenicità pubblicamente

disponibili per l'impurezza (database riconosciuti o letteratura scientifica) mediante l'utilizzo di appositi software (commerciali - **ChemTunes**, e gratuiti - **OECD QSAR Toolbox**).

### Fase 3

In assenza di dati sperimentali validi che consentano la classificazione dell'impurezza nelle classi 1, 2 o 5 (Tab. 1), viene effettuata la valutazione computazionale della potenziale mutagenicità (Ames test), che prevede l'utilizzo di un approccio predittivo sia su base statistica sia mediante sistemi esperti.

### 3a

Predizione *statistical-based*, che prevede l'utilizzo di una batteria di modelli QSAR, la valutazione dell'attendibilità delle singole predizioni e la successiva selezione della predizione più robusta per la specifica impurezza target. Tra i numerosi predittori disponibili, noi utilizziamo attualmente tre software commerciali (**ACD/Percepta**, **Leadscope** e **ChemTunes/ToxGPS**) e il modello CAESAR implementato nella piattaforma gratuita **VEGA**. Questi predittori sono tutti applicabili in ambito regolatorio in quanto conformi ai principi OECD, basati su dataset molto ampi, eterogenei e validati, caratterizzati da alte performance predittive e ampi domini di applicabilità. La valutazione dell'attendibilità delle predizioni viene effettuata prendendo in considerazione diversi aspetti, tra cui:



- i) se la molecola rientra nel dominio di applicabilità del modello;
  - ii) se e quanto la molecola è rappresentata nel training set, analizzando gli analoghi strutturali inclusi nel training set;
  - iii) la consistenza dei dati sperimentali degli analoghi, tra loro e rispetto alla predizione dell'impurezza;
  - iv) l'accuratezza in predizione degli analoghi.
- Infine, viene valutata la consistenza tra le predizioni ottenute dai diversi modelli QSAR utilizzati e selezionata la predizione ritenuta più attendibile e robusta per l'impurezza target.

### 3b

Predizione *expert rule-based*, che prevede l'utilizzo di più sistemi esperti, la valutazione dell'attendibilità delle singole predizioni (basate sull'identificazione o meno di alert strutturali), e la successiva selezione della predizione più robusta per la specifica impurezza target. Tra i diversi sistemi esperti disponibili per predire la mutagenicità, noi utilizziamo i tre software commerciali indicati sopra (**ACD/Percepta**, **Leadscope** e **ChemTunes/ToxGPS**), che includono entrambi gli approcci, e l'albero decisionale dell'Istituto Superiore di Sanità (che implementa le **regole di Benigni-Bossa** per la mutagenicità) incluso nella piattaforma gratuita di **VEGA**. I sistemi esperti selezionati sono stati sviluppati analizzando datasets molto ampi, si basano su numerosi alert strutturali validati e documentati nella letteratura scientifica, e forniscono informazioni utili per valutare la significatività degli alert identificati e, di conseguenza, l'attendibilità delle predizioni ottenute. Sebbene per i sistemi esperti non sia possibile definire un dominio di applicabilità definito, è comunque possibile valutare l'attendibilità delle predizioni da essi generati tenendo in considerazione i vari aspetti, tra cui:

- i) se l'impurezza target è rappresentata nel training set (o "alert reference set"), sia in termini di similarità strutturale, gruppi funzionali o altri frammenti strutturali;
- ii) rilevanza e/o significatività statistica degli alert identificati nell'impurezza (ossia, se l>alert ha una frequenza statisticamente significativa maggiore nei composti genotossici del training rispetto a quelli non-genotossici);

- iii) precisione dell>alert identificato nell'impurezza (es., basso tasso di falsi positivi);
- iv) consistenza tra i dati sperimentali degli analoghi che possiedono lo stesso alert dell'impurezza e la predizione dell'impurezza.

Particolare attenzione viene posta alle predizioni negative basate sull'assenza di alert strutturali. Infatti, l'assenza di un alert strutturale non è un'evidenza sufficiente per dimostrare l'assenza di un effetto mutageno, e resta la possibilità che l'impurezza possa agire mediante meccanismi d'azione non noti, per i quali non sono ancora stati sviluppati specifici alerts. Per tale motivo, diventa fondamentale un'analisi dettagliata degli analoghi strutturali che non possiedono alerts e l'accuratezza del sistema esperto nei confronti delle molecole non-mutagene che non possiedono alerts (sensibilità). Infine, viene valutata la consistenza tra le predizioni ottenute dai diversi sistemi esperti impiegati e selezionata la predizione ritenuta più attendibile e robusta per l'impurezza target.

### Fase 4

Confronto delle predizioni ottenute dal modello statistico e dal sistema esperto e derivazione di una predizione finale di mutagenicità (i.e., positivo/negativo per Ames test) per l'impurezza target, con relativo livello di attendibilità. Questa rappresenta la fase più critica dell'intero processo, nella quale l'esperto ha un ruolo fondamentale nella valutazione dell'impurezza e la relativa classificazione. In base alle predizioni ottenute dai due approcci, e alle specifiche considerazioni che ne hanno determinato il livello di attendibilità, si possono aprire diversi scenari, tra cui:

- i) predizione negativa: l'impurezza viene predetta come negativa dall'approccio statistico con una buona attendibilità e non vengono identificati alert strutturali per la mutagenicità. L'impurezza può essere classificata in Classe 5 e considerata come non-mutagena;
- ii) predizione positiva: l'impurezza viene predetta come positiva dall'approccio statistico con una buona attendibilità e vengono identificati uno o più alert strutturali rilevanti per la mutagenicità. L'impurezza può essere classificata in Classe 3, considerata come mutagena e controllata di conseguenza (Tab. 1);

- iii) predizione positiva dovuta solamente ad un alert strutturale che è condiviso con l'API (o con un composto analogo correlato all'API, es: intermedio di processo) che è stato testato e risulta non-mutageno: in questo caso l'impurezza viene classificata in Classe 4 e può essere considerata come non-mutageno, previa dimostrazione che l'impurezza sia sufficientemente simile all'analogo non-mutageno, possieda lo stesso alert strutturale con lo stesso contorno chimico e che non ci siano ulteriori fattori (strutturali e non) che potrebbero indurre una potenziale mutagenicità per l'impurezza;
- iv) predizione incerta/non conclusiva: i diversi modelli e approcci utilizzati portano a conclusioni tra loro discordanti o poco attendibili, che preven- gono una chiara classificazione dell'impurezza come mutageno o non mutageno. In questo caso è necessario un ulteriore approfondimento da parte dell'esperto (es: mediante approfondimento in letteratura, analisi del meccanismo d'azione e confronto con strutture analoghe) per valutare se ci sono sufficienti evidenze che consentano di classificare l'impurezza come non-mutageno; in caso contrario è opportuno valutare la convenienza di effettuare un Ames test o classificare l'impurezza come mutageno (e controllarla come tale).

## Fase 5

Documentazione dei risultati, che prevede la stesura di un report in cui vengono illustrati e discussi i metodi e strumenti impiegati nella valutazione computazionale, i risultati ottenuti dall'approccio statistico ed esperto, l'eventuale giustificazione aggiuntiva per una classificazione in Classe 4 e/o qualsiasi ulteriore approfondimento ad opera dell'esperto, e infine le conclusioni ottenute.

A prescindere dalle procedure messe in atto per adempiere alla linea guida ICH M7, appare evidente che tale linea guida apre importanti scenari per l'impiego delle metodologie (Q)SAR in ambito regolatorio per tutti quei settori in cui ad oggi ancora non è possibile prescindere dai test sperimentali (es: farmaci, pesticidi). La valutazione computazionale della potenziale genotossicità delle impurezze di

principi attivi farmaceutici (o ad esempio dei metaboliti di pesticidi) offre infatti notevoli vantaggi in termini di ottimizzazione dei tempi e costi rispetto alla sperimentazione in laboratorio, nonché rappresenta l'unica alternativa per poter valutare strutture anche solo potenzialmente presenti e non ancora sintetizzate.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M.W. Powley, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2014, **71**, 295.
- [2] C.M. Ellison *et al.*, *Chem. Inf. Model.*, 2011, **51**, 975.
- [3] A. Hillebrecht *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, 2011, **24**, 843.
- [4] C.M. Ellison *et al.*, *Mol. Inf.*, 2010, **26**, 97.
- [5] A. Sutter *et al.*, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2013, **67**, 39.
- [6] M. Nendza *et al.*, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2013, **66**, 301.
- [7] R. Serafimova *et al.*, JRC Scientific and Technical Reports, **EUR 24427 EN**, 2010.
- [8] A.P. Worth *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 2013, **930**, 125.
- [9] A. Roncaglioni *et al.*, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2013, **13**, 802.
- [10] E. Fioravanzo *et al.*, *SAR QSAR Environ. Res.*, 2012, **23**, 257.
- [11] A. Cassano *et al.*, *Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 2014, **32**, 273.
- [12] M. Pavan *et al.*, *Methods in Molecular Biology* (Chapter 21), Emilio Benfenati (Ed.), Springer Science+Business Media, New York, 2016, **1425**, 511.

### QSAR Methods for Genotoxic Impurities

The ICH M7 guideline promotes the use of (Q)SAR methods for the evaluation of the mutagenic potential of the drug impurities. The computational assessment allows the screening of actual and potential impurities, optimizing time and costs of experimental testing.



# sps ipc drives

ITALIA

8<sup>a</sup> edizione

Automazione e Digitale per l'Industria

Parma, 22-24 maggio 2018



## A SPS IPC DRIVES ITALIA IL PERCORSO DELLA DIGITAL TRANSFORMATION PER L'INDUSTRIA INTERCONNESSA

SPS Italia 2018 si presenta con tante novità nei **6 padiglioni** dedicati all'Automazione e al Digitale per l'industria.

Soluzioni, componenti e sistemi per l'automazione e nuove tecnologie disruptive.

Un **ricco programma convegnistico** con riconoscimento di crediti formativi professionali.

Registrati su [www.spsitalia.it](http://www.spsitalia.it) per l'ingresso gratuito in fiera

visitatori@spsitalia.it  
espositori@spsitalia.it



 messe frankfurt



FRANCESCO FIORENTINI  
ACCELERIA SRL, NERVIANO MEDICAL SCIENCES  
FRANCESCO.FIORENTINI@ACCELERIA.ORG

# RELAZIONI PK/PD NELLA PREDIZIONE DELLE DOSI PER FASE CLINICA

*Lo studio modellistico traslazionale delle correlazioni PK/PD consente di incrementare la probabilità di successo nella ricerca di nuovi farmaci, particolarmente nel passaggio alla sperimentazione clinica. Esempi specifici sono presentati per la predizione della dose di farmaco clinicamente attiva.*

I modelli di farmacocinetica/farmacodinamica (PKPD) giocano un ruolo molto importante nello sviluppo dei farmaci. Nei modelli PKPD sono utilizzati approcci matematici, mutuati principalmente dalla teoria dei sistemi e dalla statistica, con il fondamentale scopo di predire l'efficacia di un farmaco al variare del dosaggio e dello schema di trattamento, ottenendo, come risultato, l'ottimizzazione della posologia. In particolare, essi giocano un ruolo importante, nella fase di transizione, tra gli studi preclinici e la fase clinica I, laddove cioè è necessario individuare dosi potenzialmente attive e uno schema di trattamento del farmaco che permetta di massimizzarne l'efficacia minimizzandone gli effetti tossici.

I modelli PKPD sono derivati dalle osservazioni sperimentali (dati) cercando di separare la parte sistematica dell'informazione (modello strutturale) dall'elemento di errore non attribuibile a una causa o non spiegato dal modello (rumore). Negli ultimi decenni è stata introdotta nella modellizzazione farmacocinetica/farmacodinamica la variabilità inter-individuale della popolazione. In un generico modello è presente un elemento strutturale (Eq. a) che descrive il comportamento medio nella popolazione, a cui si può aggiungere l'effetto di covariate (es. peso, età, genere, marcatori di efficacia o tossicità) e una componente statistica (varianza del parametro) che descrive la variabilità nella popolazione (Eq. b).

Un semplice ma potente esempio di quest'approccio

è l'analisi farmacocinetica compartimentale, di cui un esempio paradigmatico è riportato qui sotto [1]:

$$C(t) = \frac{D}{V} \cdot e^{-\frac{CL}{V}t + \varepsilon} \quad (\text{Eq. a})$$

$$\left[ \frac{CL}{V} \right] \approx \left( \frac{\theta_1 + \theta_2 \cdot \text{Age}}{\mu^{\theta_3}} \cdot \left[ \omega_{CL}^2 \frac{\partial_{CL,V}}{\partial V^2} \right] \right) \quad (\text{Eq. b})$$

Il primo termine del modello (a) è la parte strutturale in cui sono identificabili due input, la dose e il tempo, e un output, la concentrazione del farmaco. I termini V (Volume di distribuzione) e CL (Clearance) sono i parametri del modello che devono essere stimati dai dati sperimentali (C(t), D). Il secondo termine dell'equazione (ε) è la componente di errore. Modelli più complessi seguono in genere la stessa struttura logica. Un aspetto importante che è racchiuso in questa equazione è che CL e V possono essere predicibili nell'uomo con un certo grado di accuratezza (o forse è meglio dire d'incertezza) partendo da dati raccolti nell'animale. Lo stesso approccio di "scalare" dall'animale all'uomo può essere tentato per i parametri di farmacodinamica.

Esiste una vastissima letteratura e metodologia per predire i parametri farmacocinetici, come la clearance (CL) e il volume di distribuzione (V), nell'uomo usando dati ottenuti dagli esperimenti con gli animali. Le equazioni allometriche si basano sull'assunto che molti processi biologici sono funzione del peso corporeo (e.g., battito cardiaco, flussi di sangue



etc.) e quindi è possibile identificare un'equazione di potenza, tra valore del parametro farmacocinetico e il peso nelle diverse specie. Queste funzioni di potenza stimano parametri empirici  $a$  e  $b$ , dove  $b$  è spesso uguale a 0,75 e 1 per CL e V. Queste equazioni sono molto semplici da usare e di estrema utilità [2]. Equazioni allometriche sono state modificate per considerare i farmaci che sono escreti principalmente nella bile e nel rene e corrette per MLS (maximum life span) oppure per il peso del cervello nelle specie quando il parametro  $b$  della CL presentava valori superiori a 0,75.

L'uso di equazioni di potenza, i cui termini sono dose e peso, sono consigliate dalle autorità regolatrici del farmaco, come FDA ed EMA, per il calcolo della dose umana equivalente (HED) partendo dalle NOAL negli animali.

Infatti, l'equazione:

$$HED = \text{dose nell'animale (mg/kg)} \times [\text{peso dell'animale (kg)/peso dell'uomo (kg)}]^{(1-0,67)}$$

è derivata da una equazione di potenza in cui:

$$\text{Dose (mg)} = A \times (\text{WT})^b \text{ con } b = 0,67 \text{ [3] Appendice C.}$$

Negli ultimi anni i modelli di BPPK sono risultati di estremo interesse per le predizioni allometriche [4]. La disponibilità di calcolatori sempre più potenti ha

permesso la soluzione di sistemi di equazioni differenziali in tempi ragionevoli. Nei modelli BPPK il corpo umano o animale è descritto come una serie di compartimenti interconnessi secondo uno schema anatomico semplificato (Fig. 1). Ogni organo/tessuto è descritto come un compartimento in cui valgono equazioni di bilancio di massa. Due principali processi sono considerati all'interno del compartimento: la partizione e l'eliminazione del farmaco. L'eliminazione avviene frequentemente nel fegato e/o rene anche se altri organi possono cooperare. Dati fisiologici come i flussi di sangue entranti e uscenti dagli organi e i volumi degli organi sono conosciuti nei differenti animali da laboratorio (topo, ratto, scimmia e cane) e ovviamente anche nell'uomo. Una volta stabilito il modello nelle specie animali è possibile predire la farmacocinetica nell'uomo. Questi modelli sono molto utili per il profilo farmacocinetico del farmaco sotto investigazione, sia nelle predizioni allometriche sia nelle simulazioni dell'effetto *in vivo* di un inibitore o di un induttore. Trattando il corpo umano come una serie di compartimenti è possibile avere stime delle concentrazioni di farmaco in vari distretti (cervello, cuore, polmone, tumore etc.).

Esempi di uso di modelli farmacocinetici-farmacodinamici (PKPD) si trovano in molti campi di ricerca farmacologica (antivirali, CNS, oncologia). In oncologia esiste un requisito la cui importanza è spesso trascurata: la disponibilità del modello sperimentale predittivo, per l'azione del chemioterapico, corredato dai relativi dati sperimentali, rappresentati dalla crescita dei tumori indotti da linee cellulari neoplastiche di origine umana impiantate sottocute in topi resi immunodeficienti (modelli xenograft).

Modelli di crescita tumorale sono stati proposti nella letteratura scientifica e possono essere divisi in due gruppi maggiori: i modelli empirici, o semi-empirici, descrivono il fenomeno della crescita dei tumori attraverso equazioni matematiche semplici (funzioni sigmoidali o logistiche generalizzate), ma sono privi di una descrizione profonda dei fenomeni fisiologici sottostanti la crescita dei tumori; i modelli fisiologici, che cercano, al contrario,

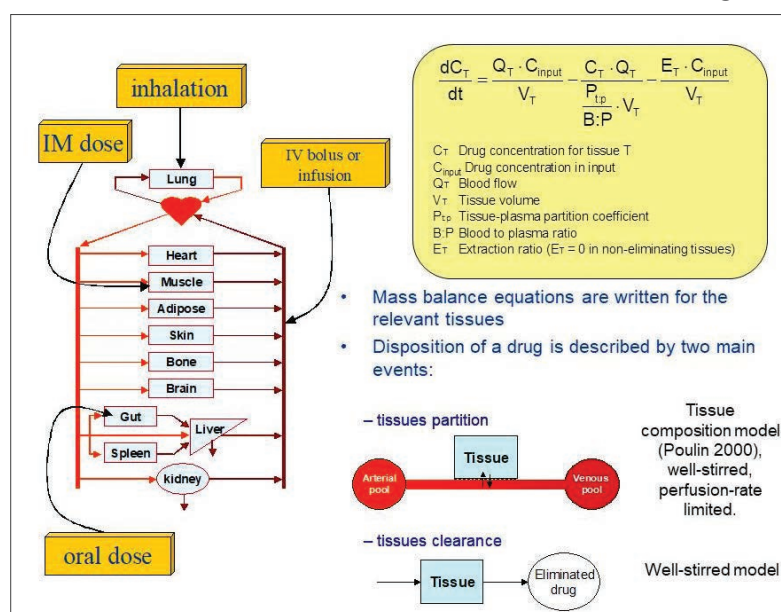


Fig. 1 - Principi ed equazioni del BPPK

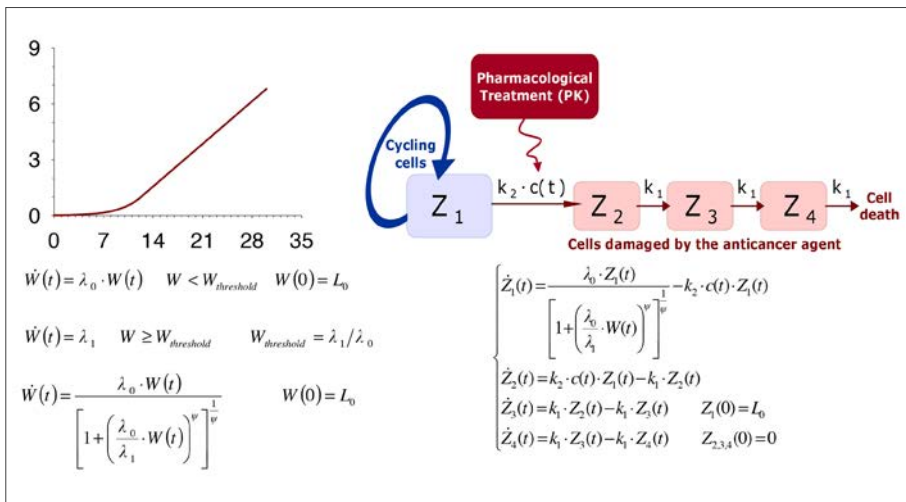


Fig. 2 - Schema delle equazioni del modello PKPD per l'inibizione tumorale nel topo

di descrivere matematicamente i processi biologici della crescita tumorale, partendo da differenti scale di modellizzazione (livello subcellulare, cellulare, tessutale). Questo approccio integra nel modello, ad esempio, l'interazione del tumore con i tessuti circostanti, angiogenesi e crescita vascolare e distacco di metastasi etc.

Questi modelli utilizzano pesantemente sistemi d'equazioni alle derivate parziali in quanto devono fornire una descrizione spaziale e temporale del processo di crescita tumorale e sono, in generale, di notevole difficoltà implementativa, che ne limita fortemente l'applicabilità nel mondo della ricerca sia preclinica che clinica. Il loro sviluppo, inoltre, necessita di molti dati sperimentali per rendere identificabili i parametri del modello. Nel resto della trattazione i modelli sopra citati non saranno più trattati e ci si focalizzerà su quelli semi-empirici, di più facile traduzione algoritmica, e molto utili per lo sviluppo di un nuovo chemioterapico. Un esempio di modello se-

mi-empirico per la crescita tumorale [6] sviluppato nel centro di ricerca di Nerviano è riportato in Fig. 2.

La crescita del tumore, in animali non trattati, è descritta da una fase esponenziale ( $\lambda_0$ ) a cui segue la fase lineare ( $\lambda_1$ ). Nel modello è identificata una soglia temporale per la transizione tra le due fasi. L'attività terapeutica dei farmaci antitumorali può essere esercitata sia riducendo il tasso di crescita delle cellule (azione citostatica) che aumentandone quello di mortalità (azione citotossica). Indipendentemente dalla natura del farmaco, l'effetto osservabile, causato dal suo meccanismo d'azione, è la riduzione del tasso netto di crescita. Nel presente modello si assume che l'intervento chemioterapico agisca incrementando la mortalità delle cellule tumorali in maniera proporzionale alla concentrazione del farmaco nel

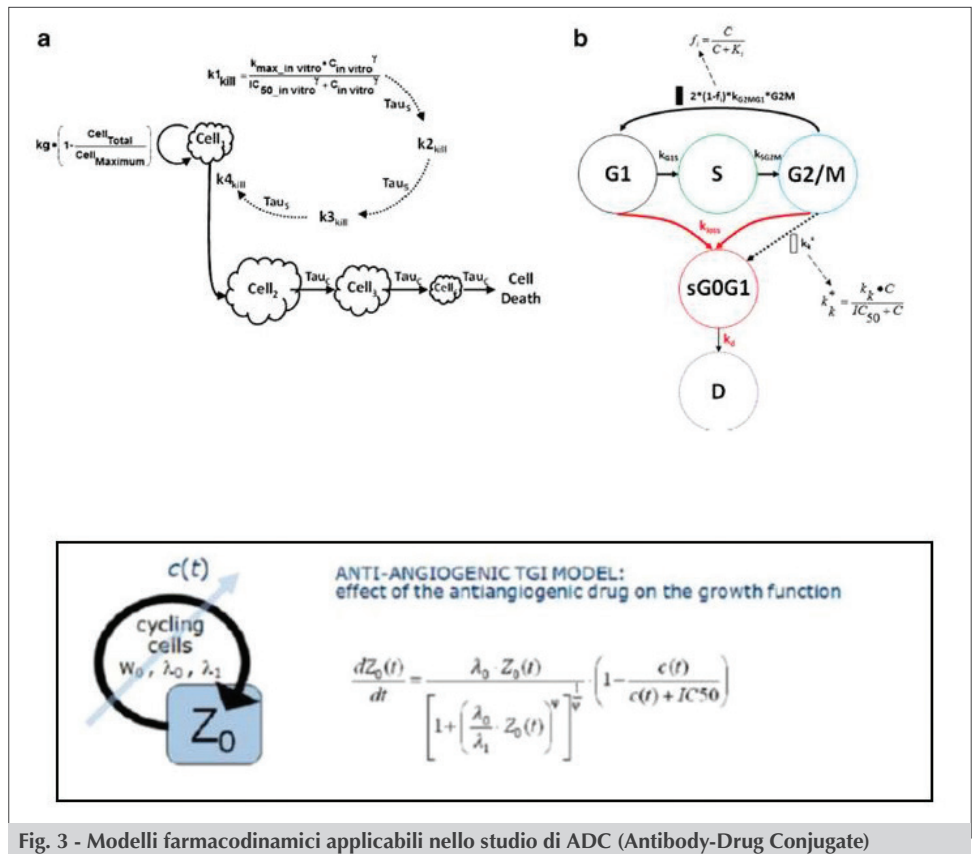


Fig. 3 - Modelli farmacodinamici applicabili nello studio di ADC (Antibody-Drug Conjugate)



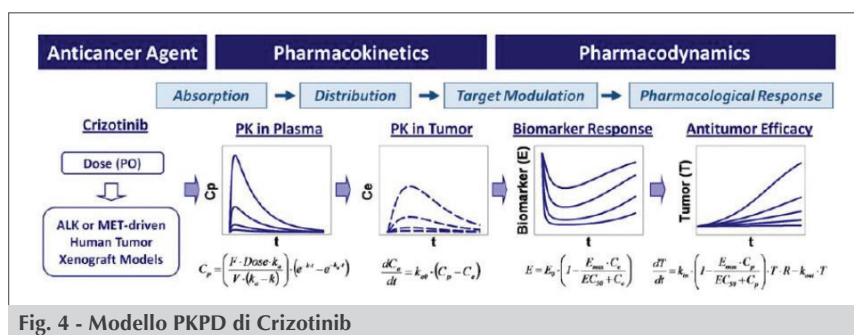


Fig. 4 - Modello PKPD di Crizotinib

suo sito d'azione. Inoltre, tutte le cellule, ciclianti e danneggiate, contribuiscono al peso complessivo del tumore, quelle danneggiate entrano nella "catena di mortalità" andando irreversibilmente verso la morte (escono dal sistema e quindi non contribuiscono più al peso del tumore). In animali trattati la crescita del tumore è decrementata in maniera proporzionale alla concentrazione di farmaco, attraverso un parametro che ne identifica la potenza *in vivo* ( $K_2$ ). La catena di mortalità è modellizzata da tre compartimenti di transito; il passaggio attraverso questi compartimenti è descritto dal parametro  $K_1$  che rappresenta il ritardo tra l'aggressione del farmaco e la successiva morte cellulare.

In letteratura sono stati proposti modelli alternativi in cui si utilizzano differenti equazioni per descrivere l'interazione tra crescita tumorale e concentrazione di farmaco [7], come indicato in Fig. 3 (a,b). Altri modelli presuppongono un'azione anti angiogenica del farmaco (Bevacizumab, c) sulle cellule tumorali e quindi sulla velocità di crescita del tumore [8], (Fig. 3c).

L'azione anti angiogenica è implementata nel modello PKPD con un effetto inibitorio diretto sui parametri della curva di crescita tumorale [8].

In alcuni modelli la curva di crescita dei tumori negli animali non trattati è di tipo Gompertziano o logistico. In questi modelli si assume che ci sia una fase il cui tasso di crescita va via via decrescendo, raggiungendo un valore asintotico, mimando il comportamento visto nelle neoplasie di grosse dimensioni.

Un aspetto molto interessante

presentato in alcuni modelli è l'integrazione tra l'effetto dei chemioterapici sui biomarcatori e l'inibizione della crescita tumorale [9]. Un esempio di questo approccio è riportato in Fig. 4, per Crizotinib, in cui sono descritte le varie fasi in cui si articola il modello (PK nel plasma → PK nel tumore → effetto del farmaco sui biomarcatori → effetto dei biomarcatori sulla curva di crescita tumorale). Questo approccio è stato scelto per il noto effetto antitumorale di Crizotinib, mediato attraverso la fosforilazione di proteine oncogeniche tipo ALK e MET.

Il ritardo, tra la risposta inibitoria sui biomarcatori e i livelli del farmaco nel plasma (isteresi dell'effetto inibitorio) viene spiegato con l'introduzione di un compartimento effetto. La distribuzione del farmaco nel tumore ne è la causa principale.

La relazione tra inibizione dei biomarcatori e l'attività antitumorale ha permesso di identificare i livelli di inibizione dei biomarker necessari per inibire la crescita tumorale da parte di Crizotinib. I risultati dello studio suggerivano che un'inibizione >90% di MET e >50% per ALK era richiesta per avere una TGI >50%. Questo ha permesso di raccomandare una dose clinica di Crizotinib di 250 mg bid (500 mg/day) che appariva nelle simulazioni effettuate con il modello in grado di inibire MET e ALK >75% nell'uomo rispetto ad un valore basale.

Un secondo esempio di come un modello PKPD è utilizzato nella predizione della dose attiva è ripor-

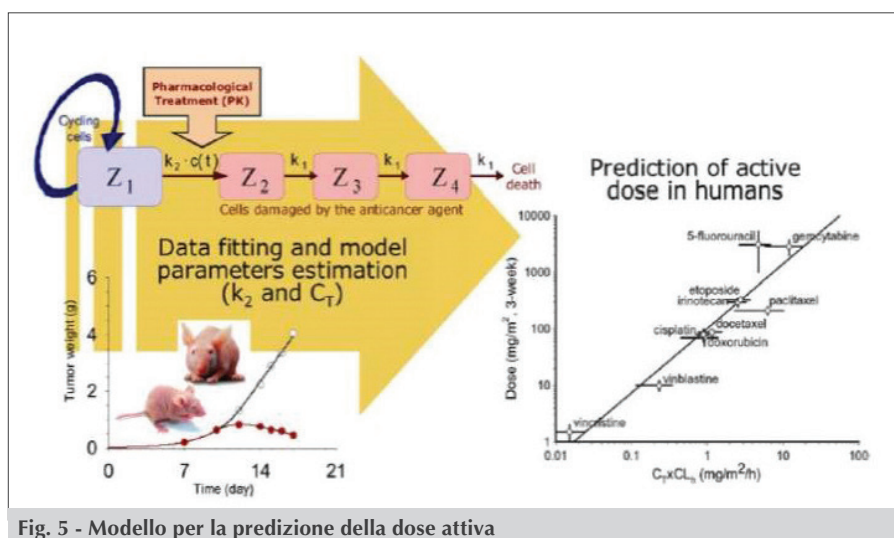


Fig. 5 - Modello per la predizione della dose attiva

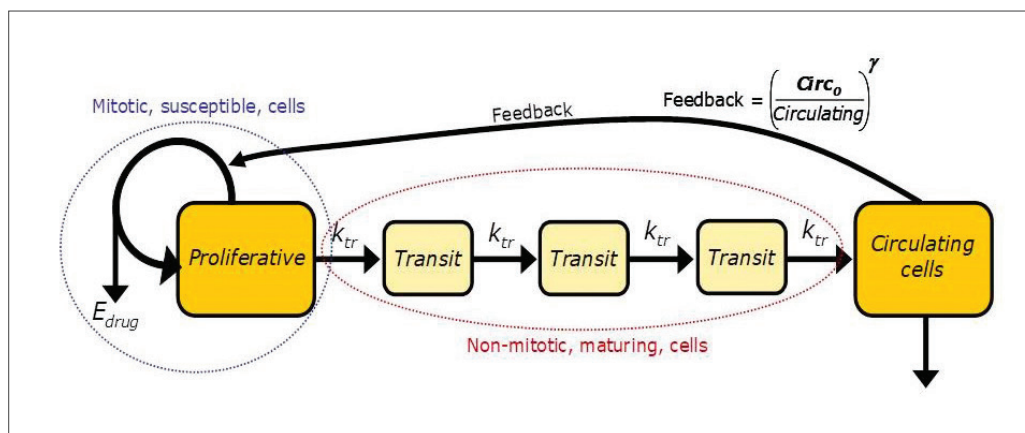


Fig. 6 - Modello PKPD per la mielotossicità di farmaci antitumorali

tato in [10] e descritto nella Fig. 5. Questo modello sfrutta la buona regressione che appare esserci tra il parametro di potenza ( $K_2$ ) e le dosi clinicamente attive dei chemioterapici.

È possibile costruire una regressione analoga tra i livelli plasmatici di farmaco in grado di fare regredire il tumore (CT) moltiplicato per la clearance plasmatica del farmaco e le dosi attive. CT è derivato come:  $\lambda_0/K_2$ . I parametri della regressione (intercetta=2,01, pendenza: 1,14) possono essere sfruttati per ottenere una stima della dose attiva in clinica di una nuova molecola antitumorale.

Oltre alla predizione della dose, è possibile ottimizzare il regime di trattamento nell'uomo utilizzando il modello in combinazione con la dinamica delle concentrazioni del farmaco nel tempo. Tali concentrazioni sono predette nell'uomo utilizzando il Dredrick plot o con modelli PBPK. Simulazioni vengono effettuate allo scopo di individuare regimi di dosaggio in grado di mantenere concentrazioni di farmaco che determinano l'eradicazione del tumore.

Mentre per la farmacocinetica esiste una vastissima letteratura e la disponibilità di programmi commerciali (SYMCYP, Gastroplus etc.) che permettono, attraverso modelli di BPPK, di simulare la farmacocinetica nell'uomo partendo da dati negli animali, poco è noto per la traslazione dei parametri farmacodinamici. Nel lavoro riportato da Lindauer [12], gli autori hanno stimato la crescita del melanoma nell'uomo e i parametri sono stati usati nel modello PKPD per le simulazioni dell'effetto del farmaco. Le simulazioni effettuate con il modello PKPD hanno permesso d'individuare 2,0 mg/kg, ogni tre settimane, come la dose minima efficace. L'analisi dimostra

gere degli effetti collaterali del farmaco.

Nella terapia antitumorale, la neutropenia e la trombocitopenia sono comuni effetti tossici che ne limitano l'utilizzo. Modelli PKPD sono stati proposti per l'ottimizzazione del dosaggio e il trattamento nelle fasi cliniche avanzate, con l'uso di dati raccolti nelle fasi cliniche precedenti, e per predire l'effetto tossico di nuove molecole nell'uomo. I dati sono stati ottenuti, in particolare, da esperimenti effettuati sulle scimmie. Un classico modello PKPD per la neutropenia o piastrinopenia è riportato in [13] e descritto nella Fig. 6. Il modello descrive i processi fisiologici della proliferazione di neutrofili e piastrine. In particolare, è identificato un compartimento di cellule progenitrici proliferanti, seguito da tre compartimenti che mimano le fasi di maturazione delle cellule (compartimenti di transito) e, infine, l'eliminazione dei neutrofili (o piastrine) dal compartimento sangue tramite la costante  $K_{cir}$ . Un importante elemento del modello è rappresentato dal sistema di feedback che mantiene l'omeostasi del sistema. L'azione del farmaco ( $E_{drug}$ ) agisce sulle cellule progenitrici attraverso l'equazione:

$$K_{prol} \times (1 - E_{drug})$$

dove  $E_{drug}$  ha la forma  $E_{drug} = \text{slope} \times C(t)$

oppure

$$E_{drug} = E_{max} \times C(t) / (EC_{50} + C(t))$$

dove  $C(t)$  è la concentrazione del farmaco. In alcuni casi nel modello è stato introdotto il feedback anche sul parametro ( $K_{tr}$ ) che regola la transizione tra i com-

che le dosi 2 e 10 mg/kg sono clinicamente equivalenti per la riduzione del tumore. Un successivo trial clinico ha confermato questa dose come la più bassa per l'efficacia antitumorale. È molto importante identificare la minima dose efficace perché spesso all'incremento della dose si accompagna all'insor-



partimenti di maturazione, per spiegare il transitorio incremento delle cellule alla fine del trattamento (rebound).

Per la predizione dell'effetto neutropenico/piastrinopenico, i parametri fisiologici, come ad esempio il tempo di maturazione delle cellule oppure i valori basali, sono specie specifici, mentre la potenza del farmaco viene mantenuta invariata tra scimmia e uomo. Con l'uso di modelli BPPK è possibile simulare scenari con popolazioni di pazienti con differenti valori dei parametri farmacocinetici; d'altronde, con l'uso di bassi valori di CL è possibile adottare un approccio più conservativo nelle simulazioni dell'effetto tossico del farmaco. Infine, l'utilizzo del modello permette di identificare le dosi e gli schemi di trattamento che minimizzano l'effetto tossico, come esemplificato in Fig. 7 dalla probabilità del trattamento di determinare trombocitopenia di grado 4 (G4 PLT) in funzione delle dosi e schemi trattamento. Si avverte un crescente interesse da parte delle compagnie farmaceutiche e della comunità scientifica dell'importanza dei modelli PKPD per la predizione di efficacia e tossicità di un nuovo farmaco, con particolare attenzione ai modelli in cui i dati di attività sono integrati con la tossicità. È stata recentemente realizzata una libreria, patrocinata dal consorzio "Drug Disease Model Resources (DDMoRe)", che raccoglie i modelli di PKPD per l'oncologia. Lo scopo di questo consorzio, formato da ditte farmaceutiche e università, è di fornire una piattaforma di modelli e conoscenze per aumentare la qualità e l'efficienza nello sviluppo di nuovi farmaci.

Per quanto riguarda lo sviluppo di nuovi modelli PKPD da dati preclinici, particolare rilievo è, attualmente, dato a quelli per l'immunoterapia oncologica [14] e per la combinazione di farmaci. Relativamente ai modelli di attività questi integrano, accanto ai dati di crescita tumorale, dati biologici e farmacologici tra i quali i biomarcatori predittivi dell'efficacia e in grado di identificare quali pazienti siano maggiormente responsivi e a più alto rischio di recidiva [15]. I modelli di crescita tumorale non sono confinati alla fase preclinica. Negli ultimi anni sono stati sviluppati modelli per la crescita tumorale nell'uomo con dati

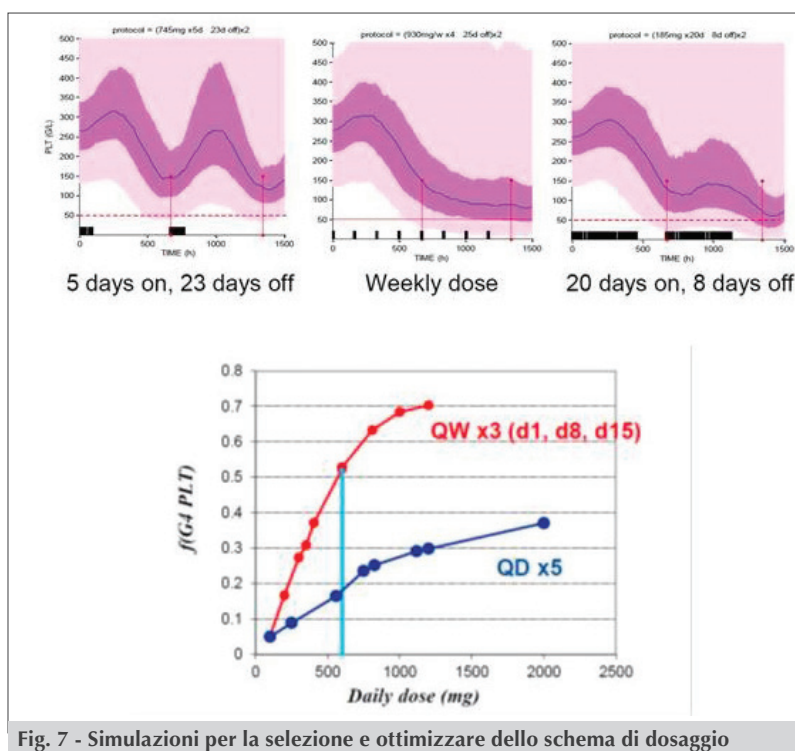


Fig. 7 - Simulazioni per la selezione e ottimizzare dello schema di dosaggio

ottenuti con la tomografia computerizzata o con la risonanza magnetica [16]. Essendo generalmente disponibili pochi dati per paziente, l'analisi della crescita tumorale è stata eseguita con metodi matematici-statistici denominati di Nonlinear Mixed-Effects, già utilizzati nei primi studi su topi xenograft per capire le fonti di variabilità della crescita tumorale. Lo sviluppo di questi modelli potrebbe essere di strategica importanza per ottimizzare il trattamento nell'uomo e meglio capire le relazioni allometriche nella crescita tumorale tra le specie e, in ultima analisi, per lo sviluppo di farmaci antitumorali in grado di sconfiggere la patologia.

### Legenda

ALK	Anaplastic lymphoma kinase
BPPK	Physiologically based pharmacokinetic modelling
CL	Clearance
EMA	European Medicines Agency
FDA	US Food and Drug Administration
HED	Dose Umana Equivalente
MLS	Maximum Life Span
MET	Mesenchymal-epithelial Transition Factor
NOAL	No Observed Adverse Effect Levels
WT	Peso
V	Volume di distribuzione

## Bibliografia

- [1] P.L. Bonate, Pharmacokinetic-pharmacodynamic Modelling and Simulation, Chapter 1: The art of modelling, 2<sup>nd</sup> Ed., Springer.
- [2] I. Poggesi, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2003, **7**(1), 100.
- [3] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, July 2005, *Pharmacology and Toxicology*, 2012.
- [4] S.A. Peters, Physiologically-Based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation, John Wiley & Sons, Inc.
- [5] L. Preziosi, *Bollettino dell'Unione Matematica Italiana*, 2005, **8B**, 100.
- [6] M. Simeoni *et al.*, *Cancer Research*, 2004, **64**, 1094.
- [7] A.P. Singh *et al.*, *Pharm Res.*, 2015, **32**, 3508.
- [8] M. Rocchetti *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 2013, **71**, 1147.
- [9] S. Yamazaki, *AAPS Journal*, 2013, **15**, 354.
- [10] M. Rocchetti *et al.*, *Eur. J. Cancer.*, 2007, **43**, 1862.
- [11] M. Bouillon-Pichault, Population PK/PD modeling of tumor growth inhibition in tumor bearing mice : a translational strategy to predict clinical efficacy?, Abstract PAGE Alicante-Spain, 2014.
- [12] A. Lindauer, *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.*, 2017, **6**, 11.
- [13] L.E. Friberg, *J. Clin. Oncol.*, 2002, **20**, 4713.
- [14] Z.P. Parra-Guillen *et al.*, *AAPS J.*, 2013, **15**, 797.
- [15] J.L. Steimer *et al.*, *European Journal of Cancer*, 2010, **46**, 21.
- [16] N. Buil-Bruna *et al.*, *Oncologist*, 2016, **21**, 220.

### PK/PD Relationship in the Predictions of Clinical Phase Doses

In this review we present ways in which translational PK/PD modeling can allow enhancing the probability of success in drug discovery mainly in the transition phase between non clinical studies and first dose in man. Case studies are presented for predicting the expected active doses in humans.

## Istruzioni per gli Autori

La *Chimica e l'Industria* è una rivista di scienza e tecnologia e di informazione per i chimici.

Nella rubrica "Attualità" ospita articoli o comunicati brevi su argomenti di interesse rilevante per tutti coloro che operano nella chimica, richiesti dalla redazione o ricevuti come lettere al direttore.

Nella sezione "Science and Technology" pubblica in inglese monografie scientifiche di chimica, ingegneria chimica e tecnologie farmaceutiche, concordate o richieste dal comitato scientifico o dalla redazione.

Nella sezione "Chimica e..." ospita articoli in italiano o in inglese di carattere applicativo, tecnologico e informativo per tutti i settori rilevanti della chimica.

Tutti gli articoli saranno sottoposti al giudizio di almeno un referee.

## Testi

I testi possono essere trasmessi via e-mail, completi di tabelle e figure, con chiara indicazione dei nomi degli autori, scrivendo per esteso anche il nome di battesimo, gli Istituti o Enti presso i quali svolgono la loro attività e relativo indirizzo. Va allegato inoltre un breve riassunto del testo sia in italiano sia in inglese (max 300 battute).

I testi dovranno essere contenuti in non più di 30.000 battute per quanto riguarda la sezione "Science and Technology", e non più di 20.000 battute per quanto riguarda la sezione "Chimica e...". Il numero complessivo di tabelle e figure non dovrebbe essere superiore a 10 per la sezione "Science..." e a 5 per la sezione "Chimica e...". Tutti gli articoli dovranno essere corredati di un'immagine esplicativa dell'argomento da poter utilizzare come foto di apertura.

Il titolo non dovrà essere lungo più di 30 battute.

Immagini, schemi, figure vanno inviate in formato jpg, tiff o gif in file separati. Si raccomanda di uniformare la lingua delle immagini a quella del testo;

I richiami bibliografici (non più di 30-35), da citare all'interno del testo, devono essere numerati progressivamente, con numeri arabi tra parentesi quadre. La bibliografia va riportata in fondo al testo secondo gli esempi:

- [1] D.W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves*, J. Wiley, New York, 1974, 320.
- [2] R.D. Shannon, *Acta Crystallogr.*, 1976, **32**, 751.
- [3] U.S. Pat. 4.410.501, 1983.
- [4] Chemical Marketing Reporter, Schnell Publ. Co. Inc. (Ed.), June 15, 1992.
- [5] G. Perego *et al.*, *Proceedings of 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Zeolites*, Tokyo, 1986, Tonk Kodansha, Elsevier, Amsterdam, 129.

La redazione invita inoltre gli Autori ad inviare in allegato (fuori testo) con gli articoli anche fotografie o illustrazioni relative al contenuto, sia di tipo simbolico sia descrittivo, per migliorare l'aspetto redazionale e comunicativo (la direzione se ne riserva comunque la pubblicazione).

Tutto il materiale deve essere inviato per e-mail a:  
dott. Anna Simonini, [anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)



# POWERING YOUR COMPANY



## GIORNATE DI CHIMICA ANALITICA IN MEMORIA DEL PROF. FRANCESCO DONDI. RECENTI SVILUPPI IN SCIENZA DELLE SEPARAZIONI E IN BIOANALITICA

*Le giornate di Chimica Analitica dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi si sono svolte lo scorso luglio 2017 presso l'Università degli Studi di Ferrara. L'evento, organizzato dal Gruppo Interdivisionale di Scienza delle Separazioni in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara e il Gruppo Divisionale di Bioanalitica della Società Chimica Italiana (SCI) è stato pensato con il desiderio di onorare - a poco meno di due anni dalla scomparsa (avvenuta il 30 ottobre 2015) - la figura di Francesco Dondi, ordinario di Chimica Analitica presso l'Università di Ferrara dal 1986 al 2014.*

### Giornate di Chimica Analitica in memoria del Prof. Francesco Dondi

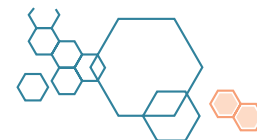
*Recenti sviluppi in Scienze delle Separazioni e in Bioanalitica*



**FERRARA, 10-11 Luglio 2017**

Polo Chimico BioMedico - Via Luigi Borsari 46, Ferrara

**F**rancesco Dondi è stato uno dei fondatori della moderna Scienza delle Separazioni in Italia. Scienziato di fama internazionale, in particolare egli ha contribuito allo sviluppo della teoria della cromatografia mediante l'utilizzo di modelli microscopico-probabilistici per la descrizione del processo separativo e all'avanzamento della comprensione e dell'interpretazione di miscele complesse multicomponente di diversa origine. Nell'ultima fase della sua carriera, Francesco si è dedicato con passione e metodo scientifico allo studio di tematiche di etica e scienza per uno sviluppo sostenibile della società, ruolo in cui è stato anche delegato del Rettore dell'Università di Ferrara. Soprattutto in questa fase, Francesco



Aldo Laganà e Aldo Roda

ha avuto modo di collaborare intensamente con le istituzioni locali al servizio della cittadinanza. La figura del prof. Dondi è stata ricordata con affetto durante la cerimonia di apertura dal Rettore dell'Università di Firenze, chiarissimo prof. Luigi Dei, e da quello dell'Università di Ferrara, prof. Giorgio Zauli. I professori Ferruccio Trifirò (Università di Bologna) e Francesco Gasparrini (Università di Roma "La Sapienza"), cui Francesco era legato da profonda amicizia, hanno ricordato all'apertura dei lavori il ruolo e il contributo scientifico di Francesco.

Alle Giornate di Scienza delle Separazioni a Ferrara hanno preso parte 133 ricercatori provenienti dal mondo accademico e della ricerca italiano a dimostrazione dell'interesse e della motivazione che continuano a caratterizzare la comunità scientifica nazionale, malgrado le ben note difficoltà in cui versa il sistema della ricerca pubblico sottofinanziato ormai da troppi anni.

Una menzione e un ringraziamento speciale vanno agli sponsor delle Giornate (<http://www.scienzadelleseparazioni.it/index.php/presentazione>) e all'Università di Ferrara che, grazie ai loro generosi contributi, hanno consentito di offrire iscrizione gratuita (inclusi gli eventi sociali) a tutti i soci SCI appartenenti

al Gruppo Interdivisionale di Scienza delle Separazioni e al Gruppo Divisionale di Bioanalitica. Di grande impatto è stato anche il ruolo della Divisione SCI di Chimica Analitica che, con l'istituzione di 12 borse di studio, ha premiato giovani non strutturati di età inferiore a 35 anni.

Durante l'evento sono stati presentati 86 contributi scientifici, tra cui 36 relazioni orali tenute da dottorandi e personale universitario non strutturato. Gli argomenti trattati dai relatori hanno toccato diversi ambiti ed aspetti nel campo delle Scienze delle Separazioni e della Bioanalitica, fra i quali i fondamenti e teoria dei processi separativi, le separazioni multidimensionali, le applicazioni separative e bioanalitiche in campo clinico, farmaceutico, alimentare, ambientale, etc., la sensoristica, la caratterizzazione di materiali e nanomateriali per applicazioni bioanalitiche, alimentari ed ambientali.

Durante le Giornate, sono stati consegnati alcuni premi a scienziati che si sono distinti per la loro attività di ricerca nel campo delle Scienze delle Separazioni e della Bioanalitica. Alla prof.ssa Rosangela Marchelli (Università di Parma) e alla prof.ssa Paola Dugo (Università di Messina) è stata consegnata la medaglia "Giovanni Dugo", per la loro attività di ricerca nel campo della Scienza delle Separazioni con applicazioni nel campo della Chimica degli Alimenti. Al prof. Aldo Roda (Università di Bologna) è stata conferita la medaglia "Alessandro Mangia" per l'innovativa attività di ricerca svolta in campo bioanalitico. La dr.ssa Anna Laura Capriotti e la dr.ssa Susy Piovesana, entrambe dell'Università di Roma "La Sapienza", sono state le vincitrici del Premio Giovane Ricercatore nel campo delle Scienze delle Separazioni e della Bioanalitica, rispettivamente. Il prof. Aldo Laganà, Presidente della Divisione SCI della Chimica Analitica, è stato nominato membro dell'Academia Scientiarum Instituti Bononiensis.

In questo numero e nel prossimo de *La Chimica e l'Industria*, abbiamo voluto dare ulteriormente spazio e visibilità a questi ricercatori proponendo loro di riportare in modo sintetico gli aspetti più rilevanti della loro ricerca.





MARTINA CATANI<sup>A</sup>, OMAR H. ISMAIL<sup>B</sup>, SIMONA FELLETTI<sup>A</sup>,  
FRANCESCO GASPARRINI<sup>B</sup>, ALBERTO CAVAZZINI<sup>A</sup>

<sup>A</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA

<sup>B</sup>DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE DEL FARMACO, UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"  
CTNMTN@UNIFE.IT

# NUOVE FASI STAZIONARIE CHIRALI PER SEPARAZIONI ULTRAFASST: ASPETTI CINETICI

*In questo studio sono state confrontate le performance cinetiche di colonne impaccate con particelle totalmente porose e core-shell funzionalizzate con lo stesso selettore chirale, combinando misure sperimentali per la determinazione dei coefficienti di diffusione a modelli di diffusione in un mezzo poroso. I risultati hanno dimostrato che la colonna core-shell è la meno efficiente per la separazione del secondo enantiomero, a causa di un importante contributo all'allargamento di banda dato dalla diffusione eddy e dalla cinetica di adsorbimento-desorbimento.*

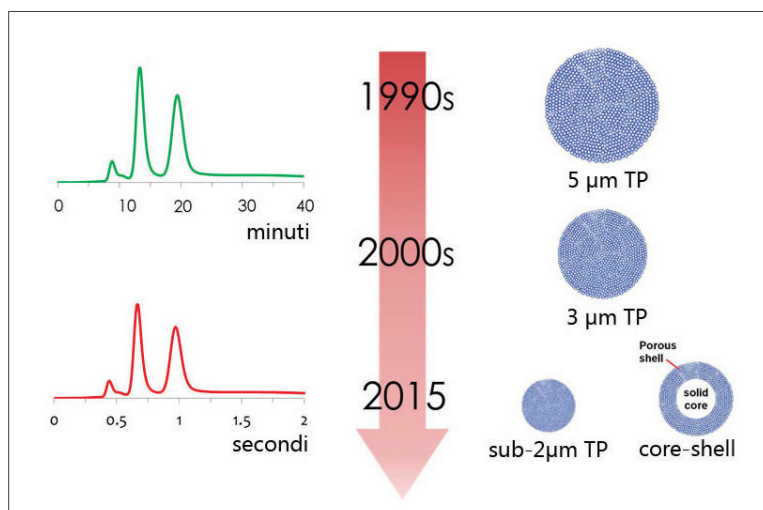


Fig. 1 - Evoluzione delle particelle utilizzate in cromatografia liquida chirale e tempi necessari per eluire una coppia di enantiomeri (TP = totalmente porose)

**D**urante l'ultimo decennio sono state sviluppate numerose fasi stazionarie per separazioni ultrafast, in particolare per cromatografia liquida (LC) a fase inversa. Queste fasi sono composte generalmente da particelle di silice totalmente porose di piccole dimensioni, fino a sub-2µm, in quanto l'efficienza di una separazione cromatografica è inversamente proporzionale al diametro delle particelle che compongono il letto impaccato. Tuttavia, l'utilizzo di colonne sub-2µm è

molto spesso limitato dalle alte contropressioni generate da letti impaccati con particelle di così piccole dimensioni, che richiedono quindi l'utilizzo di strumenti in grado di raggiungere 1200-1500 bar (questa tecnica prende il nome di Ultra High Performance Liquid Chromatography). Alternativamente alle particelle sub-2µm, vengono ampiamente utilizzate le cosiddette particelle *core-shell*, composte da un "core" solido circondato da uno "shell" poroso. È stato dimostrato che la presenza del core solido riduce tutti i contributi all'allargamento di banda in cromatografia liquida a fase inversa (diffusione longitudinale, resistenza al trasferimento di massa solido-liquido e diffusione eddy), favorendo quindi separazioni efficienti in tempi brevi.

Tuttavia, questo sviluppo ha interessato solo in parte il campo della cromatografia chirale, per la quale fino a pochi anni fa venivano impiegate solamente colonne impaccate con particelle totalmente porose da 3 o 5 µm e i tempi di analisi potevano essere addirittura al di sopra dei 30 minuti. L'introduzione di particelle *core-shell* o sub-2µm totalmente porose è stata limitata essenzialmente per due ragioni: da un lato, la difficoltà di adattamento di metodi di funzionalizzazione

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.





pre-esistenti (pensati per particelle 3 o 5  $\mu\text{m}$ ) a particelle di piccole dimensioni e, dall'altro, la mancanza di una totale comprensione dei complessi fenomeni di trasferimento di massa in cromatografia chirale. Negli ultimi anni, però, grazie alla crescente richiesta da parte dell'industria farmaceutica di sviluppo di metodi di separazione chirali veloci ed efficienti, sono state introdotte le prime colonne impaccate con particelle core-shell o sub- $2\mu\text{m}$  totalmente porose funzionalizzate con selettori chirali. Utilizzando colonne di lunghezza 1 o 2 cm e alte velocità di flusso sono stati recentemente ottenuti straordinari risultati in termini di efficienza e separazioni ultrafast (con tempi di analisi al di sotto dei secondi), rappresentando una vera e propria rivoluzione nel campo della cromatografia chirale (Fig. 1) [1-4].

Tuttavia, l'utilizzo delle particelle core-shell in cromatografia chirale potrebbe non portare agli stessi vantaggi cinetici come nel caso delle separazioni achirali in cromatografia a fase inversa. In particolare, occorre tener conto che in cromatografia chirale uno dei principali fattori che contribuisce all'allargamento di banda è la cinetica di adsorbimento-desadsorbimento sulla fase stazionaria, che può essere lenta specialmente per il secondo enantiomero.

A questo scopo, in questo lavoro sono state confrontate le performance cinetiche di colonne aventi geometria simile ed impaccate con particelle totalmente porose (1,8 e 2,5  $\mu\text{m}$ ) e core-shell (2,6  $\mu\text{m}$ ) funzionalizzate con lo stesso selettore chirale (Whelk-O1) appartenente alla classe dei selettori di tipo Pirkle, per la separazione degli enantiomeri del *trans*-stilbene ossido (TSO) in fase normale [1].

Le performance cinetiche sono state valutate mediante la costruzione delle curve di van Deemter. I vari contributi al trasferimento di massa sono stati calcolati indipendentemente mediante un approccio che prevede l'interpretazione di una serie di misure sperimentali di tipo stop-flow per il calcolo dei coefficienti di diffusione nella fase mobile e nel letto impaccato (la tecnica cromatografica utilizzata prende il nome di "peak parking") attraverso un modello di diffusione all'interno di un mezzo poroso.

I risultati ottenuti hanno mostrato che la colonna impaccata con particelle core-shell mostra un chiaro vantaggio in termini di diffusione longitudinale e

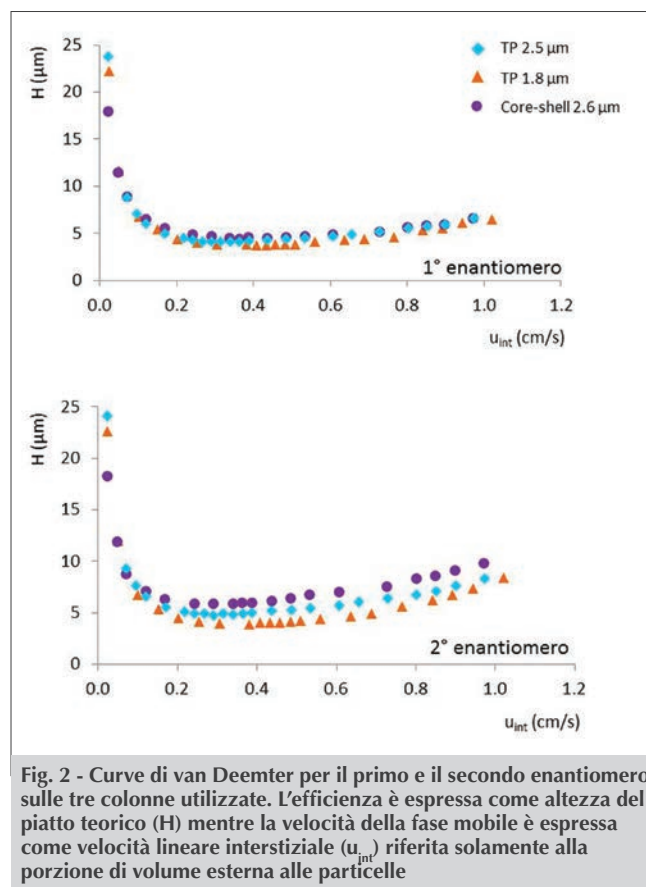


Fig. 2 - Curve di van Deemter per il primo e il secondo enantiomero sulle tre colonne utilizzate. L'efficienza è espressa come altezza del piatto teorico ( $H$ ) mentre la velocità della fase mobile è espressa come velocità lineare interstiziale ( $u_{\text{int}}$ ) riferita solamente alla porzione di volume esterna alle particelle

trasferimento di massa solido-liquido rispetto alle colonne totalmente porose. Tuttavia, come si può notare dalla Fig. 2, specialmente per il secondo enantiomero, la colonna core-shell risulta essere meno efficiente rispetto alle altre due.

Questo è dovuto essenzialmente ad una combinazione di due contributi importanti al trasferimento di massa: da un lato la diffusione eddy e dall'altro la cinetica di adsorbimento-desadsorbimento del secondo enantiomero (molto più lenta sulle core-shell che sulle totalmente porose). Il primo aspetto può essere legato ad alcune difficoltà sperimentali incontrate durante la fase di preparazione dello slurry e di impaccamento della colonna, in quanto il termine di diffusione eddy è legato alla "qualità" e all'omogeneità del letto impaccato. Ciò suggerirebbe che l'impaccamento di particelle core-shell polari (come sono in questo caso le particelle funzionalizzate con il selettore Whelk-O1) può essere molto più difficile rispetto a quello di particelle core-shell apolari (come le C18

comunemente ed ampiamente utilizzate per cromatografia a fase inversa). Per questo motivo sarebbero necessari ulteriori studi riguardo la rugosità della superficie delle particelle.

Il secondo aspetto, invece, riguardante la cinetica di adsorbimento-desadsorbimento del secondo enantiomero, può essere correlabile con la maggior "quantità" di selettore chirale (in termini di  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) presente sulle particelle core-shell, a parità di condizioni sperimentali di funzionalizzazione. Ciò suggerirebbe, da un lato, una maggiore accessibilità dei layers esterni del guscio poroso delle particelle core-shell e, dall'altro, una possibile dipendenza fra cinetica di adsorbimento-desadsorbimento e selettore chirale presente sulla fase stazionaria. Per generalizzare questo concetto sono, comunque, necessari studi più approfonditi su fasi costituite dallo stesso tipo di silice ma con diversa quantità di selettore chirale. Questo tipo di informazioni è necessario non solo per la progettazione di fasi chirali sempre più efficienti ma anche per stabilire quali sono i fattori che possono porre un possibile limite cinetico per le separazioni ultrafast.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] O.H. Ismail *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1466**, 96.
- [2] O.H. Ismail *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2017, **1520**, 91.
- [3] M. Catani *et al.*, *Analyst*, 2017, **142**, 555.
- [4] D.C. Patel *et al.*, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 8821.

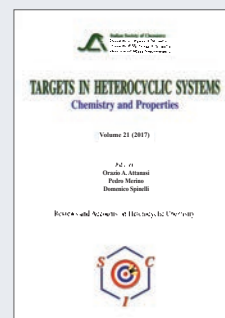
### New Chiral Stationary Phases for Ultrafast Separations: Kinetic Aspects

Kinetic performance of columns packed with both core-shell and sub- $2\mu\text{m}$  fully porous particles functionalized with the same chiral selectors has been evaluated by means of an approach that combines experimental measurements for the determination of diffusion coefficients to theoretical models of diffusion in a porous medium. The results of this work have demonstrated that the core-shell column is the less efficient for the separation of the second eluted enantiomer due to a combined effect of both eddy diffusion and adsorption-desorption kinetics.

## LIBRI E RIVISTE SCI

### Targets in Heterocyclic Systems Vol. 21

È disponibile il 21° volume della serie "Targets in Heterocyclic Systems", a cura di Orazio A. Attanasi, Pedro Merino e Domenico Spinelli  
[http://www.soc.chim.it/it/libri\\_collane/th/s/vol\\_21\\_2017](http://www.soc.chim.it/it/libri_collane/th/s/vol_21_2017)



Sono disponibili anche i volumi 1-20 della serie.

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

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

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

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

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



SIMONA FELLETTI<sup>A</sup>, MARTINA CATANI<sup>A</sup>, OMAR H. ISMAIL<sup>B</sup>,  
FRANCESCO GASPARRINI<sup>B</sup>, ALBERTO CAVAZZINI<sup>A</sup>

<sup>A</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA

<sup>B</sup>DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE DEL FARMACO, UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"  
FLLSMN1@UNIFE.IT

# NUOVE FASI STAZIONARIE CHIRALI PER SEPARAZIONI ULTRAFASST: ASPETTI TERMODINAMICI

*In questo lavoro sono state studiate tre colonne impaccate con particelle fully porous e core-shell funzionalizzate con un selettore chirale Whelk-O1. È stata effettuata la caratterizzazione di queste fasi attraverso la costruzione di isoterme di adsorbimento assolute e di eccesso, al fine di completare le informazioni ottenute attraverso misure cinetiche di trasferimento di massa.*

Lo studio degli aspetti termodinamici che influenzano la ritenzione in cromatografia chirale è molto importante per vari aspetti. Attraverso la valutazione delle isoterme di adsorbimento è possibile, infatti, ricavare informazioni riguardo l'eterogeneità della fase (come l'eventuale presenza di più siti chirali selettivi in cui gli enantiomeri possono adsorbirsi) ed anche valutare la capacità di saturazione, che in prima approssimazione dipende dalla quantità di selettore chirale che viene legato alla fase stazionaria durante il processo di funzionalizzazione.

In questo lavoro sono state studiate tre colonne impaccate con particelle di diversa geometria (FPP = fully porous particles; SPP = superficially porous particles), funzionalizzate con un selettore chirale di tipo Pirkle (Whelk-O1) [1] (Fig. 1):

- 100 × 4,6 mm (L × I.D.) 1,8 μm (I.D.) FPP
- 150 × 4,6 mm (L × I.D.) 2,5 μm (I.D.) FPP
- 150 × 4,6 mm (L × I.D.) 2,6 μm (I.D.) SPP

I risultati derivanti da misure cinetiche hanno dimostrato il carattere localizzato dell'adsorbimento di enantiomeri di *trans*-stilbene ossido (TSO), dovuto all'assenza di diffusione sulle fasi stazionarie, e cinetiche di adsorbimento-desadsorbimento più lente sulla colonna SPP rispetto alle colonne FPP.

Per riuscire a fornire una spiegazione più completa

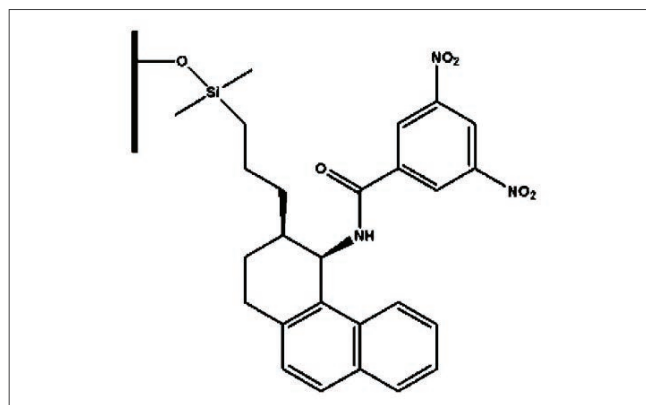


Fig. 1 - Struttura chimica del selettore chirale Whelk-O1

di questi risultati e per comprendere meglio i meccanismi di adsorbimento e l'eterogeneità delle fasi stazionarie in oggetto, sono state effettuate misure di tipo termodinamico attraverso la cromatografia non lineare.

Sono pertanto state costruite le isoterme di adsorbimento assoluto e di eccesso, rispettivamente mediante metodo inverso e perturbazioni sul plateau. Il metodo inverso consiste nel risolvere l'equazione di bilancio di massa (Eq. 1) [2] in modo iterativo:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

dove:

$C_i$  = concentrazione del componente  $i$  in fase mobile

$q_i$  = concentrazione di  $i$  in fase stazionaria  
 $F(=V_s/V_m)$  = rapporto tra le fasi  
 $u$  = velocità lineare della fase mobile  
 $D_a$  = coefficiente di dispersione assiale in fase mobile.

Per prima cosa è necessario selezionare un modello di isoterma e imporre un set iniziale di parametri. In seguito viene risolta l'equazione differenziale del bilancio di massa e i parametri vengono modificati iterativamente, mediante strategie di ottimizzazione numerica, al fine di minimizzare le differenze fra i picchi calcolati e quelli sperimentali [3]. La procedura è stata ripetuta con modelli differenti di isoterme (Langmuir, Tóth e bi-Langmuir) per determinare la migliore isoterma di adsorbimento assoluto per enantiomeri di TSO sulle tre colonne.

L'adsorbimento preferenziale dei componenti dell'eluente (esano ed etanolo) sulla fase stazionaria è stato invece determinato attraverso il metodo di perturbazione sul plateau. Questo metodo è basato sulla perturbazione degli equilibri di adsorbimento della fase mobile attraverso piccole iniezioni di un eccesso di uno dei due componenti. Partendo dall'Eq. 1 è possibile ricavare l'equazione che permette di calcolare l'isoterma di eccesso,  $\Gamma_c$ , per ciascuno dei solventi utilizzati (Eq. 2) [4]:

$$\Gamma_c = \frac{1}{F} \int_0^c \frac{V_R(c) - V_0}{V_0} dc \quad (\text{Eq. 2})$$

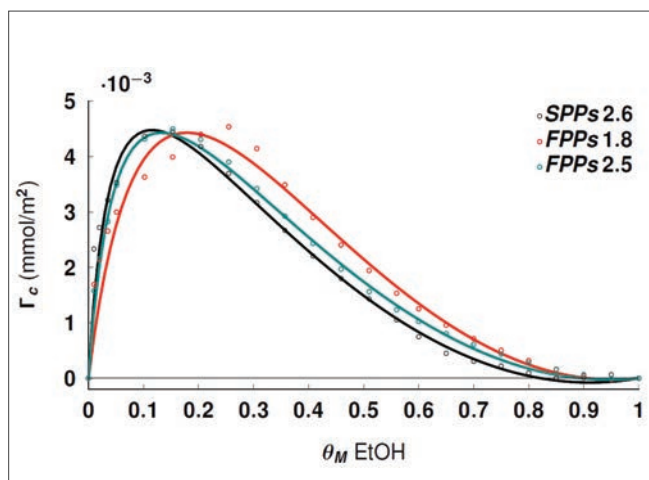


Fig. 2 - Isoterma di eccesso misurata per etanolo normalizzata per i m<sup>2</sup> di silice per le tre colonne, con MP = esano/etanolo, flusso = 0,2 mL/min, volume di iniezione = 1 µL

Attraverso le misure di isoterme di eccesso (Fig. 2), è stato trovato che queste fasi stazionarie chirali Whelk-O1 presentano una tendenza ad assorbire preferenzialmente etanolo dalla fase mobile in una percentuale di circa il 70%. L'assenza di diffusione molecolare superficiale su queste fasi (tipicamente riscontrata in condizioni di eluizioni in fase normale) è supportata da questo risultato, poiché l'etanolo presenta una maggiore viscosità rispetto all'esano (maggiore di circa il 30%).

I risultati derivanti dal metodo inverso (Fig. 3) hanno mostrato che le tre colonne presentano un'isoterma di adsorbimento assoluto di tipo bi-Langmuir (Eq. 3) per gli enantiomeri di TSO:

$$q_i = \frac{q_S^{sat} b_{i,S} C_i}{1 + b_{1,S} C_1 + b_{2,S} C_2} + \frac{q_{NS}^{sat} b_{i,NS} C_i}{1 + b_{1,S} C_1 + b_{2,S} C_2} \quad (\text{Eq. 3})$$

dove:

$q_S^{sat}$  = capacità di saturazione del sito selettivo

$q_{NS}^{sat}$  = capacità di saturazione del sito non selettivo

$b$  = costante di binding per i due enantiomeri,  $i = 1$  e  $2$ , nei due siti.

Questo modello di isoterma descrive una fase stazionaria eterogenea formata da siti enantioselettivi ( $S$ ), responsabili quindi del riconoscimento chirale, e da siti non selettivi ( $NS$ ) in cui i due enantiomeri interagiscono allo stesso modo con la fase stazionaria.

I risultati presentati nelle Tab. 1 e 2 mostrano che le due colonne FPP sono comparabili.

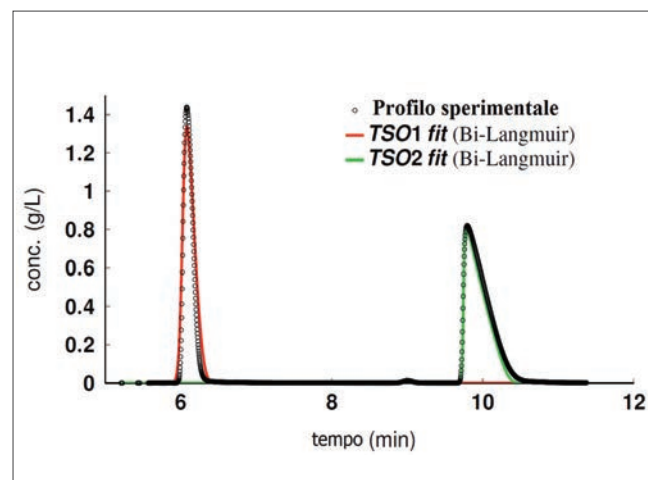


Fig. 3 - Esempio di fitting di una separazione cromatografica di enantiomeri di TSO (range di concentrazione = 5-50 g/L, volume di iniezione = 5 µL, flusso = 0,5 mL/min, MP = 90/10% esano/etanolo)



COLONNA non selettivo	Sito selettivo			Sito non selettivo	
	$q_s^{\text{sat}}$	$b_{1,S}$	$b_{2,S}$	$q_{NS}^{\text{sat}}$	$b_{NS}$
FPP 1,8 $\mu\text{m}$	69	0,015	0,05	78	0,004
FPP 2,5 $\mu\text{m}$	73	0,019	0,05	79	0,004
SPP 2,6 $\mu\text{m}$	22	0,017	0,09	29	0,03

Tab. 1 - Parametri relativi a un'isoterma di tipo bi-Lanmguir ottenuti per le tre colonne chirali, dove  $q_s^{\text{sat}}$  e  $q_{NS}^{\text{sat}}$  sono le capacità di saturazione rispettivamente del sito selettivo e del sito non selettivo e  $b$  è la costante di binding per i due enantiomeri (1 e 2) nei due siti

COLONNA	$\alpha_{\text{app}}$	$\alpha_{\text{app}}$	$\alpha_{\text{real}}$	densità superficiale $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
	Lineare	Non lineare	Sito selettivo	
FPP 1,8 $\mu\text{m}$	2,5	2,6	3,1	1,22
FPP 2,5 $\mu\text{m}$	2,5	2,3	2,6	1,21
SPP 2,6 $\mu\text{m}$	2,5	2,3	5,3	1,46

Tab. 2 - Enantioselettività,  $\alpha$ , e densità superficiale per le tre colonne.  $\alpha_{\text{app}}$  - lineare deriva da misure cinetiche;  $\alpha_{\text{app}}$  - non lineare deriva da misure termodinamiche con i contributi di entrambi i siti selettivo e non selettivo;  $\alpha_{\text{real}}$  - sito selettivo indica il contributo dei soli siti selettivi

Al contrario, per quanto riguarda la colonna SPP, il contributo dovuto ai siti non selettivi rispetto a quello registrato sulle FPP è molto maggiore ( $b_{NS,SPP} \gg b_{NS,FPP}$ ). Da ciò consegue che per la colonna SPP, la selettività reale ( $\alpha_{\text{real}}$ ), che si riferisce solamente ai siti chirali selettivi sulla fase stazionaria, risulta essere molto maggiore rispetto alla selettività apparente ( $\alpha_{\text{app}}$ ), la quale si riferisce a tutti i siti (anche non selettivi) sui quali gli enantiomeri possono adsorbirsi. La differenza osservata fra SPP e FPP potrebbe essere dovuta ad esempio alla formazione di aggregati molecolari non selettivi (ma fortemente ritentivi) durante il processo di funzionalizzazione delle particelle. Questa ipotesi potrebbe spiegare non solo l'elevata densità superficiale di selettore chirale sulle SPP (Tab. 2), ma anche gli alti valori di  $b_{NS}$  trovati per questa colonna. Inoltre, gli alti valori della costante di binding giustificerebbero il risultato trovato in cromatografia lineare secondo il quale la cinetica di adsorbimento-desorbimento sarebbe più lenta sulle particelle SPP rispetto alle FPP.

Sono necessari, però, ulteriori studi su queste fasi chirali per poter ottimizzare il processo di funzionalizzazione delle particelle con selettori chirali e comprenderne i meccanismi di ritenzione, di adsorbimento e di trasferimento di massa.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] O.H. Ismail, L. Pasti, A. Ciogli *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1466**, 96.
- [2] G. Guiochon, A. Felinger, A. Katti, D. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, Boston, MA, 2006.
- [3] N. Marchetti, A. Cavazzini, L. Pasti, F. Dondi, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 727.
- [4] Y. Kazakevich, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Science*, 1995, **33**, 321.

### New Chiral Stationary Phases for Ultrafast Separations: Thermodynamic Aspects

In this work, three different columns packed with both fully porous and core-shell particles functionalized with a Whelk-O1 chiral selector have been studied. The characterisation of these stationary phases has been performed through the construction of excess and absolute adsorption isotherms, in order to integrate the information obtained with kinetic measurements of mass transfer phenomena.



STEFANO CINTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"  
STEFANO.CINTI@UNIROMA2.IT

## ELETTRODI STAMPATI E SOSTENIBILITÀ

*L'elettroanalisi e gli elettrodi stampati offrono dei metodi analitici alla portata di tutti senza necessitare di strumentazioni sofisticate. L'esempio più evidente è rappresentato dalle "striscette" che i diabetici utilizzano quotidianamente per monitorare la glicemia. Tuttavia, l'utilizzo della carta per produrre queste striscette consente di renderli più semplice da utilizzare, consentendo di ridurre l'impatto economico ed ambientale.*

L'elettroanalisi è una branca della chimica analitica in grado di rilevare la presenza di una specie in seguito allo scambio di elettroni dovuto ad una reazione chimica che coinvolge la specie stessa [1]. Sebbene i dispositivi elettroanalitici possano apparire distanti dalla nostra vita, in realtà alcuni sono utilizzati quotidianamente. Le "striscette" che i pazienti diabetici utilizzano per il controllo del livello di glicemia sono, infatti, sensori elettrochimici stampati e, in particolare, biosensori in cui l'enzima glucosio ossidasi viene immobilizzato sull'elettrodo di lavoro [2]. Tale biosensore permette di determinare in maniera specifica il glucosio in una matrice complessa come il sangue, con un notevole miglioramento della qualità di vita del paziente diabetico.

Facciamo un passo indietro, tenendo ben presente cosa implichi l'utilizzo di un dispositivo elettroanalitico. Si è parlato di uno "scambio di elettroni dovuto ad una reazione chimica". Queste reazioni possono essere di ossidazione e di riduzione, rispettivamente delle reazioni in cui si cedono elettroni e si accettano. Ammesso che la specie di interesse debba cedere o acquistare degli elettroni, in gergo, ossidarsi o ridursi, non è chiaro chi sia il destinatario o il mittente. Questo prende il nome di elettrodo. Questo componente va pensato come il collegamento tra quello che c'è da analizzare ed il segnale di uscita (il display di un apparecchio elettronico). L'elettrodo è collegato attraverso dei cavi elettrici ad uno strumento,

detto potenziostato, che è in grado di fornire l'energia necessaria all'elettrodo (sotto forma di elettricità o differenza di potenziale) e, successivamente, quantificare l'entità dello scambio di elettroni che avviene tra la specie da analizzare e l'elettrodo. Per ritornare alle striscette che utilizzano i pazienti diabetici, altro non sono che elettrodi stampati. Il dispositivo in cui vengono inserite è un potenziostato miniaturizzato. Da diversi decenni, la tecnologia conosciuta come stampa serigrafica occupa una posizione di rilievo nel mondo della sensoristica [3]. Fili elettrici ed elettrodi (oro, carbone vetroso, argento, ecc.) possono essere sostituiti da vernici che al loro interno contengono quantità variabili di materiali con specifiche proprietà conduttive. Mediante l'utilizzo di telai intagliati (maschere) è possibile stampare, tipicamente su materiale plastico, elettrodi di qualsiasi forma e dimensione (di solito non si scende sotto al millimetro). Con questa tecnologia è possibile realizzare delle striscette usa e

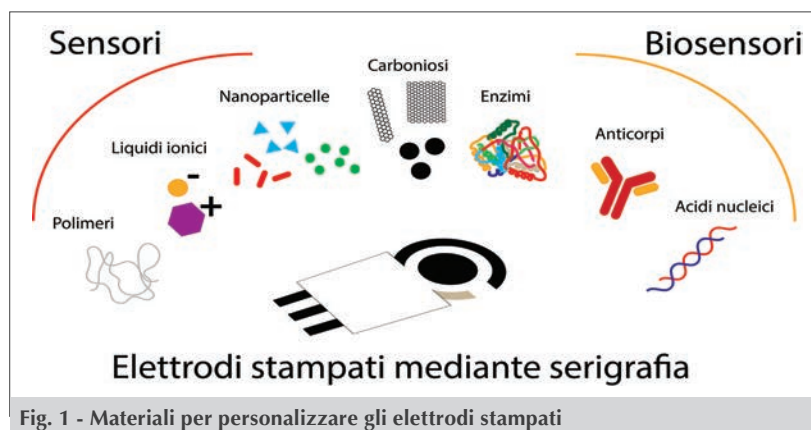
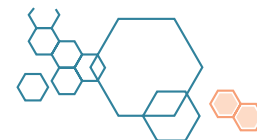


Fig. 1 - Materiali per personalizzare gli elettrodi stampati

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.



getta con applicazioni che si riflettono in tutti i maggiori campi di applicazione: clinico, ambientale ed alimentare. A seconda delle necessità analitiche, è possibile personalizzare gli elettrodi stampati con nanoparticelle metalliche, nanomateriali del carbonio, polimeri, enzimi, anticorpi, acidi nucleici, ecc. (Fig. 1). Le possibilità per ottenere sensori e biosensori con prestazioni migliori sono sempre più grandi [4]. Analisi di metalli pesanti nelle acque potabili, determinazione dei livelli di colesterolo nel sangue, controllo della freschezza di prodotti alimentari... sono solo alcuni degli esempi che vedono in prima linea l'utilizzo di elettrodi stampati. Rispetto alle metodologie tradizionali, che richiedono l'utilizzo di strumentazioni costose, laboratori ben equipaggiati e personale specializzato, il vantaggio e l'obiettivo

legato ai sensori elettrochimici stampati è indirizzato all'utilizzatore finale, non specializzato, proprio come accade con il monitoraggio della glicemia: questi sensori sono semplici da utilizzare e non necessitano di laboratori. Lo sviluppo di sensori stampati elettrochimici continua ad evolversi in favore di metodologie che siano sempre più semplici. Spesso, per sviluppare un metodo di analisi è necessario procedere seguendo un protocollo ben preciso, che poi è quello che accade nei laboratori di analisi. Non occorre focalizzarsi esclusivamente sulla striscetta utile ai diabetici. Quando si sceglie di analizzare una matrice complessa che può essere il sangue, un terreno o anche l'acqua del rubinetto, è necessario trattare il campione. Ad esempio, un metodo per analizzare tracce di metalli può richiedere l'acidificazione del campione affinché il saggio analitico funzioni in modo corretto. Se in laboratorio questa pratica è relativamente semplice, potrebbe non esserlo quando l'utilizzatore finale del metodo non si trova in un laboratorio di analisi e non possiede i reagenti necessari per condurre il saggio analitico. Sarebbe utile qualcosa di più immediato, che non richieda conoscenze tecniche da parte di chi lo utilizza.

La tecnologia degli elettrodi stampati può essere ulteriormente migliorata. La carta rappresenta l'innovazione in questo campo, sia dal punto di vista dei

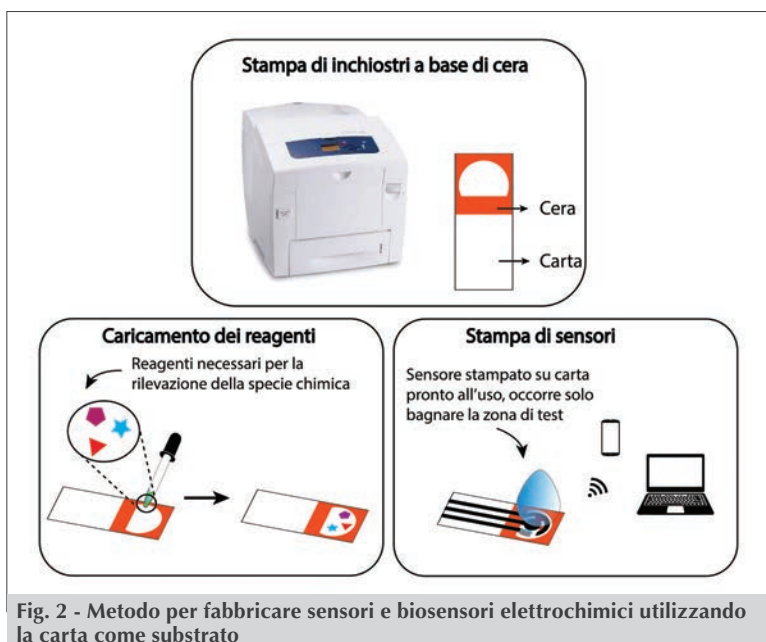


Fig. 2 - Metodo per fabbricare sensori e biosensori elettrochimici utilizzando la carta come substrato

requisiti di produzione che di quelli operativi. Ci troviamo nell'era della sostenibilità, e la riduzione dell'impatto ambientale ed economico associato ai processi di produzione su larga scala riguarda un argomento fondamentale.

Riguardo allo sviluppo di nuove metodologie analitiche, la riduzione dell'inquinamento, un monitoraggio puntuale e la facilità di utilizzo rappresentano le caratteristiche principali in cima alla lista delle richieste. Metodi analitici sostenibili dovrebbero minimizzare la produzione di prodotti di scarto tossici e dovrebbero essere caratterizzati dall'utilizzo di materiali riciclabili. Inoltre, le misurazioni dovrebbero essere economiche. La carta può prendere il posto delle striscette plastiche, offrendo tre vantaggi importanti [5]:

- 1) la carta rispetto alla plastica può essere incenerita, riducendo di fatto l'accumulo del materiale di scarto;
- 2) la carta è economica, un foglio A4 di carta da ufficio (80 g/m<sup>2</sup>) costa circa il 50% in meno rispetto allo stesso foglio in poliestere;
- 3) la carta, in particolar modo quella da filtro, è porosa e può contenere tutti i reagenti necessari per condurre un saggio analitico.

Quest'ultima è la potenzialità che maggiormente si offre di facilitare le misurazioni senza la necessità di maneggiare reagenti da parte dell'operatore. La carta da filtro, con le sue proprietà assorbenti, consente di

deporre su di essa tutti i reagenti necessari per la misura (Fig. 2). Utilizzando una semplice stampante ad inchiostri a base di cera si possono creare delle vere e proprie barriere nella carta dove poter confinare i reagenti. Sensori stampati, carta e contorni consentono di analizzare qualsiasi matrice senza che ci sia la necessità di trattare la matrice stessa. Sarà necessario solo bagnare l'area di test dove sono contenuti tutti i reagenti e dove sono stampati gli elettrodi per la rilevazione della specie di interesse. Su questa area di test possono essere depositati bio-elementi come enzimi, anticorpi, acidi nucleici, ed inoltre possono trovare spazio tutti quei reagenti che servono per acidificare il campione o mantenere il suo pH compreso in un certo intervallo (soluzione tampone), e così via. Tutto questo all'interno di un pezzetto di carta, che rappresenta un laboratorio in una mano. E ancora, l'utilizzo della carta offre un ulteriore grande vantaggio: la natura cellulosica della carta, con le sue ramificazioni, è ottima per filtrare le impurezze grossolane naturalmente presenti nelle matrici reali (es. particolato, terra, cellule) che potrebbero influire negativamente sulla misura elettrochimica finale. Solo la carta da filtro trova applicazione nello sviluppo di piattaforme elettroanalitiche? No. Si possono utilizzare anche la carta da ufficio, la carta per imballaggi, carta da forno, di giornale, ecc. A seconda della necessità si può ricorrere all'utilizzo di una carta rispetto ad un'altra. La carta da filtro, coadiuvata dalle tecnologie di stampa di elettrodi e stampa di inchiostri solidi a base di cera, rappresenta un notevole passo in avanti per la realizzazione di semplici dispositivi che consentano a chiunque, e ovunque, di condurre la quantificazione di una qualsiasi molecola bersaglio. La cura della salute personale è uno dei campi di applicazione che più di tutti può giovare di questa implementazione. In particolare, per misurare la concentrazione di ioni cloruro nel sudore (con possibili applicazioni per la diagnosi della fibrosi cistica) sono stati stampati degli elettrodi a base di argento su carta da filtro [6]. In un altro caso, la carta da ufficio è servita come punto di partenza per lo sviluppo di un sensore elettrochimico per il monitoraggio di zinco perso nel sudore durante l'attività fisica [7]. Infine, carta da filtro modificata con nanoparticelle d'oro e filamenti di DNA offre il punto di partenza per la diagnosi precoce del tumo-

re al seno mediante l'individuazione di filamenti di DNA mutati circolanti nel sangue delle donne affette da tale patologia pazienti (Pink is Good - Fondazione Umberto Veronesi) [8, 9].

Questi sono solo alcuni degli esempi che riguardano l'utilizzo di tecniche elettrochimiche in combinazione con materiali "attivi" (ad es. la carta da filtro, in grado di contenere i reagenti e filtrare la matrice reale). L'obiettivo principale è quello di realizzare tante piattaforme che consentano a chiunque di contribuire al miglioramento della qualità dell'ambiente e della nostra salute.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, J. Wiley & Sons, New Jersey, 2006.
- [2] A.P. Turner, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 3184.
- [3] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani, *Microchim. Acta*, 2014, **181**, 865.
- [4] S. Cinti, F. Arduini, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **89**, 107.
- [5] A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, *Lab Chip*, 2013, **13**, 2210.
- [6] S. Cinti, L. Fiore, R. Massoud *et al.*, *Talanta*, 2018, **179**, 186.
- [7] S. Cinti, B. De Lellis, D. Moscone, F. Arduini, *Sens. Actuators, B*, 2017, **253**, 1199.
- [8] <https://www.fondazioneveronesi.it/ricerca/ipro-nostri-ricercatori/stefano-cinti>
- [9] [http://www.huffingtonpost.it/2017/10/10/il-mio-dispositivo-consentira-a-chiunque-di-diagnosticare-un-tumore-al-seno-con-una-sola-goccia-di-sangue\\_a\\_23237609/](http://www.huffingtonpost.it/2017/10/10/il-mio-dispositivo-consentira-a-chiunque-di-diagnosticare-un-tumore-al-seno-con-una-sola-goccia-di-sangue_a_23237609/)

### Printed Electrodes and Sustainability

Electroanalysis and screen-printed electrodes offer easy-to-use analytical methods, that can be utilized without the need of sophisticated equipment. The most common example is provided by the glucose "strips" that the diabetic patients use to daily monitor their glycemia. However, the use of paper as a novel substrate for manufacturing these strips is capable to provide reagent-free devices, reducing both the economic and the environmental impact.







BENEDETTA PASQUINI, SERENA ORLANDINI, SANDRA FURLANETTO  
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA "UGO SCHIFF"  
 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE  
 BENEDETTA.PASQUINI@UNIFI.IT

## QUALITY BY DESIGN IN ANALISI FARMACEUTICA

*L'approccio Quality by Design è stato applicato allo sviluppo di un metodo CZE con aggiunta di ciclodestrina per la determinazione della purezza enantiomerica e delle impurezze del farmaco calcimimetico cinacalcet. L'uso combinato di varie tecniche analitiche ha consentito di studiare i meccanismi di separazione e di comprendere le interazioni intermolecolari coinvolte.*

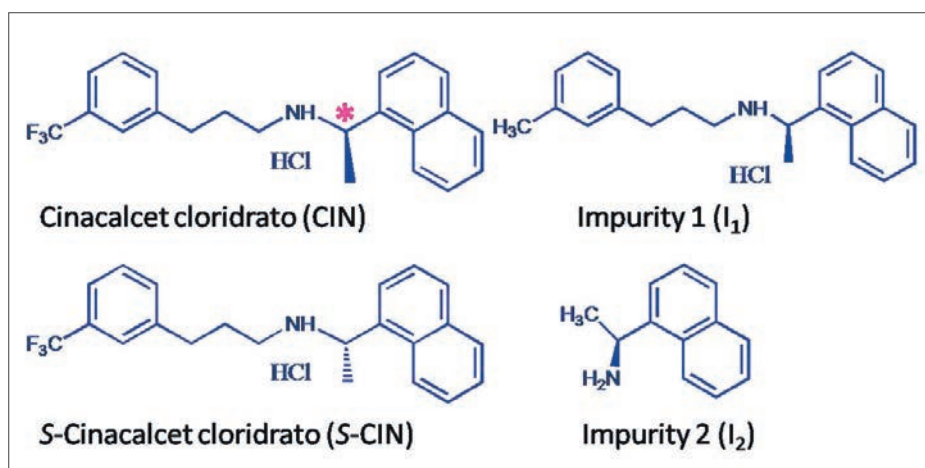


Fig. 1 - Formule di struttura del cinacalcet (CIN) e delle sue impurezze (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, S-CIN)

Il recente sviluppo di composti calcimimetici, capaci di diminuire la secrezione dell'ormone paratiroideo attivando i recettori del calcio, ha fornito una nuova classe di farmaci utile nel trattamento nell'insufficienza renale cronica, dove l'iperparatiroidismo è una complicazione comune. Il cinacalcet cloridrato (CIN), un calcimimetico di tipo II, è il primo agente di questa nuova classe, approvato nel 2004 dalla FDA americana e dall'EMA, e commercializzato in Europa nello stesso anno. CIN presenta un centro chirale e viene commercializzato come singolo enantiomero (*R*), in quanto presenta un'attività farmacologica 75 volte superiore al suo distomero. In questo articolo è illustrato lo sviluppo di un metodo di elettroforesi capillare

(CE) per la determinazione di CIN e delle sue tre potenziali impurezze, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> e l'impurezza enantiomerica S-CIN (Fig. 1), ai fini del controllo di qualità della specialità medicinale. In CE la separazione degli analiti avviene all'interno di un capillare di silice fusa riempito di un tampone, alle cui estremità viene applicato un campo elettrico. Questa tecnica presenta ottime prestazioni ai fini dell'analisi farmaceutica; in particolare, nel campo delle analisi chirali, la CE mostra una maggiore efficienza di separazione, minori consumi di campione e di reagenti e una più vasta varietà di selettori chirali a disposizione rispetto alla cromatografia, dimostrandosi molto più versatile, più eco-compatibile e meno costosa. I selettori chirali più comunemente usati sono le ciclodestrine, oligosaccaridi ciclici di struttura troncoconica, che possono essere utilizzate per separare enantiomeri attraverso la formazione di complessi di inclusione con gli analiti. La modalità operativa CE scelta per l'analisi è stata la CZE (Capillary Zone Electrophoresis) con aggiunta di (2-idrossipropil)- $\gamma$ -ciclodestrina (HP $\gamma$ CyD) come selettore chirale e di metanolo come additivo organico. Lo studio è stato comple-

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

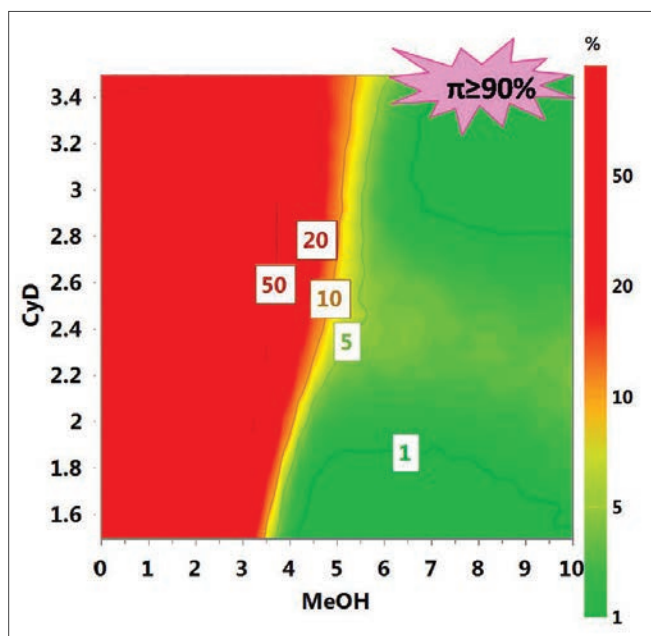


Fig. 2 - Mappa del rischio di fallimento ottenuta a pH 2,70 e differenza di potenziale 27 kV. Il Design Space, in verde, corrisponde ad un rischio di fallimento  $\leq 10\%$ . CyD, concentrazione di ciclodestrina; MeOH, concentrazione di metanolo

tato dall'utilizzo combinato di altre tecniche analitiche, come Molecular Modeling e spettroscopia NMR, per approfondire la conoscenza dei meccanismi di separazione e delle interazioni intermolecolari implicate nella formazione dei complessi di inclusione.

### Quality by Design nello sviluppo del metodo analitico

Il Quality by Design (QbD) è un modello di qualità recentemente introdotto in campo farmaceutico, fortemente raccomandato dalla International Conference on Harmonization (ICH) [1]. L'obiettivo del QbD è una migliore comprensione dei processi e dei prodotti con conseguente miglioramento degli stessi e una maggiore flessibilità dal punto di vista regolatorio. Questa strategia si articola in fasi prestabilite che prevedono l'utilizzo integrato di strumenti, come valutazione dei rischi e strategie chemiometriche, e porta alla definizione del Design Space (DS), uno spazio in cui ogni combinazione dei valori delle variabili assicura la qualità dei processi e dei prodotti. Anche le procedure analitiche possono essere considerate dei processi, per

cui il QbD dovrebbe essere applicato anche nello sviluppo di metodi analitici, che sono componenti fondamentali nel processo globale per l'ottenimento di un prodotto farmaceutico di qualità [2]. Il metodo CZE è stato sviluppato applicando i principi del QbD, permettendo di ottenere importanti vantaggi quali l'esplorazione approfondita del modo in cui i diversi fattori elettroforetici influenzano le prestazioni analitiche e delle interazioni esistenti tra di essi. I parametri critici del metodo (CMP) erano rappresentati da differenza di potenziale applicata, pH del tampone, concentrazione della ciclodestrina e concentrazione di metanolo. Tutti i CMP potevano influenzare la risoluzione tra gli enantiomeri e il tempo di analisi, scelti come risposte per valutare la qualità dell'elettroferogramma. L'effetto dei CMP è stato quindi studiato attraverso la metodologia della superficie di risposta, calcolando un modello matematico che consentisse la predizione della risposta anche in punti all'interno del dominio sperimentale non esplorati. I modelli calcolati, insieme alle simulazioni Monte-Carlo, hanno permesso di giungere alla definizione del DS. Questo è rappresentato in Fig. 2 come la zona colorata in verde, ovvero la regione inclusa nella linea che definisce un rischio

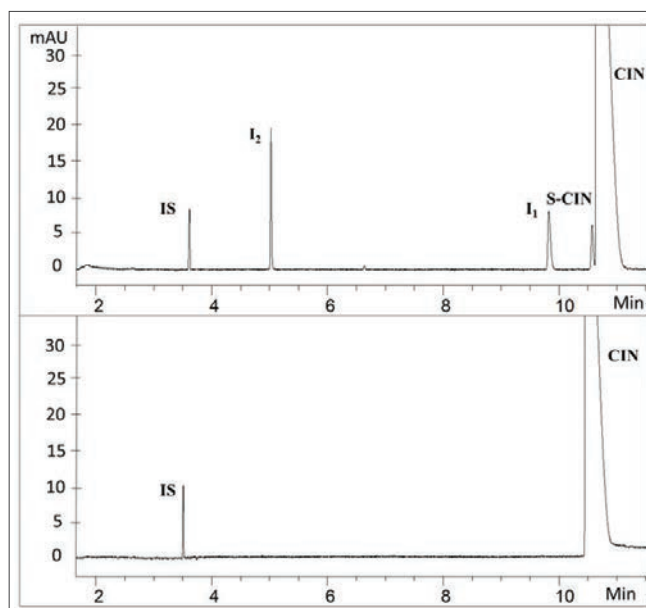


Fig. 3 - Elettroferogramma della soluzione standard e del campione reale nelle condizioni ottimizzate

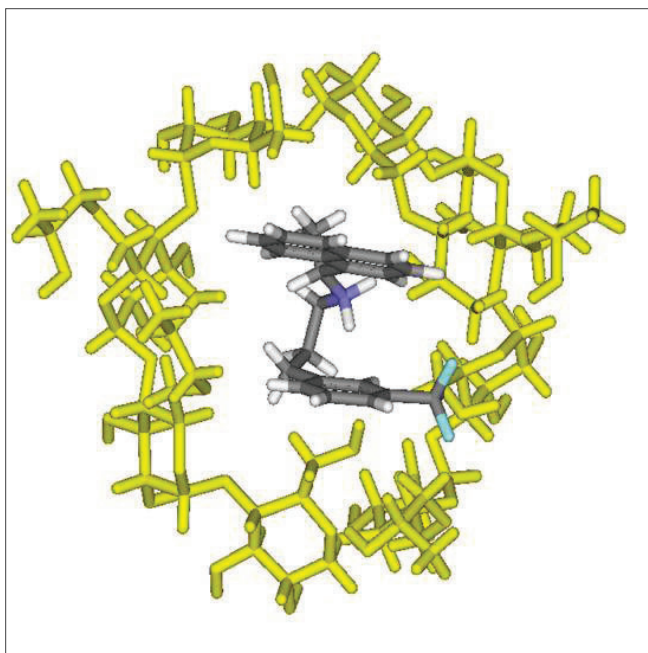


Fig. 4 - Struttura più probabile del complesso di inclusione tra CIN (in grigio) e HPyCyD (in giallo)

di fallimento pari al 10%. All'interno del DS si ha la garanzia di ottenere una risoluzione alla linea di base tra gli enantiomeri CIN e S-CIN (risoluzione  $\geq 0,5$ ) ed un tempo di analisi ridotto ( $\leq 11$  min, Fig. 3) ad un livello di probabilità selezionato pari al 90%. Con l'applicazione di questo approccio innovativo, il metodo analitico non è più definito da un singolo punto nello spazio dei suoi parametri, ma viene identificato da un intervallo di condizioni di lavoro; all'interno del DS tutte le combinazioni dei valori dei parametri critici del metodo possono essere scelte come condizioni operative. In questo caso gli intervalli erano i seguenti: differenza di potenziale 25-29 kV, tampone fosfato pH 2,54-2,86, concentrazione di HPyCyD 3,1-3,5 mM, concentrazione di metanolo 0,00-3,28 v/v%.

### Tecniche combinate nello studio dei meccanismi di separazione

Il sistema CZE sviluppato comporta complessi meccanismi di separazione basati sulla diversa mobilità elettroforetica degli analiti e sulla formazione di complessi di inclusione. Con lo scopo di ottenere una migliore comprensione di tali meccanismi e delle interazioni molecolari coinvolte, sono stati

condotti studi di Molecular Modeling e di spettroscopia NMR. Il comportamento degli analiti è stato valutato mediante simulazioni di dinamica molecolare (DM), che hanno riguardato la stabilità dei complessi di inclusione tra CIN e diverse ciclodestrine. La stechiometria del complesso di CIN è stata calcolata sulla base delle variazioni negli spettri  $^1\text{H}$  NMR del farmaco in complessi con diversi rapporti molari con ciclodestrina, usando il metodo di variazione continua (Job Plot). Sia le simulazioni di DM che gli studi NMR hanno messo in evidenza la tendenza di CIN ad essere incluso all'interno della cavità di HPyCyD con stechiometria 1:1, formando complessi altamente stabili. Sono state quindi calcolate l'energia di docking, l'energia potenziale e il momento dipolare dei complessi coinvolti nella separazione, mettendo in evidenza le differenti affinità tra molecole *host* (CIN e S-CIN) e *guest* (ciclodestrina). Infine, sono stati effettuati una serie di esperimenti NOESY, che hanno permesso di confermare la struttura più probabile dei complessi stessi, ipotizzata come in Fig. 4. L'uso integrato delle diverse tecniche ha quindi permesso di giustificare il comportamento degli analiti ed il pattern elettroforetico osservato sperimentalmente in CZE.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8(R2) (2009) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- [2] S. Orlandini *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 443.

### Quality by Design in Pharmaceutical Analysis

Quality by Design approach has been applied to the development of a cyclodextrin-modified CZE method for the determination of the enantiomeric purity and of the impurities of the calcimimetic drug cinacalcet. The combined use of various analytical techniques has made it possible to investigate the mechanisms of separation and to understand the involved intermolecular interactions.



FRANCESCO MANARINI, MARA RUSSO, MARCO VISENTIN, MARIA CHIARA PIETROGRANDE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE  
UNIVERSITÀ DI FERRARA  
MNRFNC@UNIFE.IT

# DERIVATIZZAZIONE ASSISTITA DA ULTRASUONI PER L'ANALISI GC-MS DI COMPOSTI ORGANICI POLARI NEL PARTICOLATO ATMOSFERICO

*Si è sviluppato un metodo analitico che utilizza gli ultrasuoni per promuovere la reazione di derivatizzazione per l'analisi GC-MS delle molecole organiche polari presenti nel PM. Ottimizzando i parametri operativi con disegno sperimentale si è ottenuta una procedura adatta all'analisi ambientale che utilizza condizioni più blande ed ecocompatibili rispetto al metodo tradizionale.*

Il presente lavoro descrive lo sviluppo di un metodo analitico che sfrutta il grande potenziale degli ultrasuoni per promuovere una reazione di derivatizzazione per l'analisi GC-MS. Questa ricerca è in linea con la tendenza sempre più presente nella chimica analitica di spostarsi verso processi "green" che consentano di ridurre l'impatto ambientale delle procedure diminuendo il consumo di energia e di reagenti chimici e la produzione di rifiuti senza ridurre l'efficienza delle procedure.

Nello specifico, è stato sviluppato un metodo per l'analisi GC-MS delle specie organiche polari presenti nel particolato atmosferico (PM). Il metodo permette l'analisi simultanea di 30 specie organiche maggiormente presenti nel PM: 13 acidi carbossilici, 7 fenoli e 10 zuccheri. Si tratta di importanti marker molecolari che forniscono informazioni precise sulle sorgenti di emissione sia naturali che antropiche (es. attività industriale, traffico, combustione delle biomasse) e sui processi di fotossidazione che avvengono in atmosfera.

Data la polarità di questi analiti, la loro analisi mediante GC-MS richiede una preventiva derivatizzazione per diminuirne la polarità e per aumentarne la volatilità e la stabilità termica. In questo lavoro si è

messa a punto una procedura assistita da ultrasuoni, in quanto tali sistemi costituiscono un'efficace forma di energia alternativa per promuovere la conversione dei reagenti in prodotti migliorando la resa di reazione [1, 2].

La procedura è stata ottimizzata individuando le condizioni operative più opportune per massimizzare la resa di reazione utilizzando condizioni di reazione più blande, in termini di tempi e temperatura di reazione e quantità di reattivi impiegati. Tale ottimizzazione è stata eseguita applicando la tecnica del disegno sperimentale ed utilizzando il metodo della Response Surface Methodology (RSM) per studiare gli effetti combinati dei parametri di derivatizzazione.

## Metodo

Si è utilizzato il metodo di analisi precedentemente ottimizzato per l'analisi di composti organici del PM [3]. Brevemente, si è utilizzato un gascromatografo Focus GC (Thermo-Fisher Scientifics, Milano, Italia) accoppiato con uno spettrofotometro di massa a trappola ionica PolarisQ (Thermo-Fisher Scientifics, Milano, Italia). La colonna utilizzata è una DB-5MS (L = 30 m, I.D. = 0,25 mm, df = 0,25 mm film thickness; J&W Scientific, Rancho Cordova, CA, USA). Come carrier

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

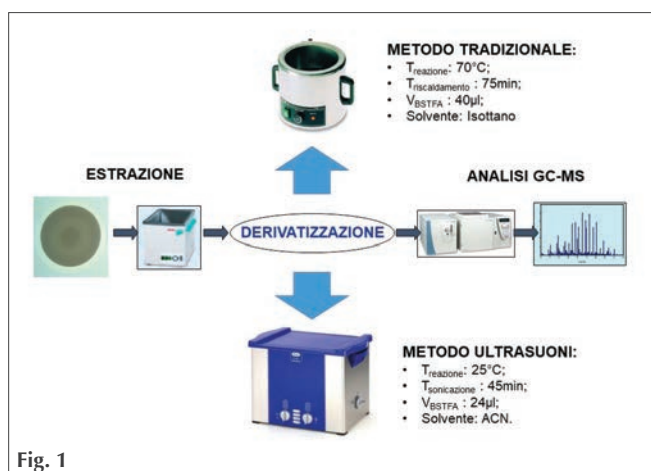


Fig. 1

viene utilizzato elio ad una velocità di 1,5 ml min<sup>-1</sup>. L'analisi cromatografica viene svolta in condizioni di temperatura programmata da 70 a 300 °C. La rivelazione è stata condotta in modalità SIM (Selective Ion Monitoring) mediante acquisizione in full scan. La reazione di derivatizzazione è stata eseguita utilizzando come reagenti *N,O*-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamide (BSTFA) contenente 1% di trimetilclorosilano e piridina. Alla miscela è stato aggiunto dodecano deutero ( $C_{12}D_{26}$ , in isottano) come standard interno. È stato utilizzato un sonicatore Elmasonic 100H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany) con una frequenza ultrasonica di 37 KHz e una potenza effettiva di 150 W.

## Risultati

Partendo dalle condizioni sperimentali della procedura di derivatizzazione che utilizza un sistema di riscaldamento tradizionale con bagno d'acqua (riscaldamento ad una temperatura di 75 °C per 70 minuti con l'utilizzo di 40 µL di reattivo) [4] si è studiato l'effetto sulla resa di reazione dei diversi parametri operativi della derivatizzazione assistita da ultrasuoni, quali la temperatura e la durata della reazione, la polarità del solvente e la quantità di BSTFA. Per quanto riguarda la temperatura, studi preliminari svolti a valori compresi tra 5 e 60 °C hanno mostrato che la resa di reazione non viene particolarmente influenzata da questo parametro. Pertanto si è deciso di lavorare a temperatura ambiente, nell'ottica di sviluppare un metodo più in linea con la chimica verde, ovvero con ridotti consumi di energia.

Per studiare in modo sistematico l'effetto degli altri parametri si è utilizzata una procedura di disegno sperimentale adoperando il modello Central Composite Design (CCD). Le condizioni di contorno sono state scelte sulla base dei valori utilizzati del metodo tradizionale in modo renderle più blande. Per la quantità di BSTFA si è studiato l'intervallo di volumi compresi tra 5 e 40 µl, mentre per il tempo di reazione l'intervallo tra 5 e 70 min. La polarità del solvente è stata descritta mediante l'indice di Snyder,  $P'$ , e si è studiato l'effetto di diversi solventi con polarità adeguata per solubilizzare analiti e reagenti, ovvero: acetonitrile (ACN,  $P'=5,8$ ), acetone ( $P'=5,1$ ), acetato di etile ( $P'=4,4$ ), diclorometano ( $P'=3,1$ ) e isottano ( $P' \approx 0,0$ ).

I dati ottenuti dagli esperimenti individuati dal disegno sperimentale sono stati analizzati mediante un fitting polinomiale quadratico di secondo ordine per determinare gli effetti di interazione delle variabili considerate. La superficie di risposta ottenuta (Fig. 1) mostra che la resa di reazione è massimizzata utilizzando 24 µl di BSTFA e lavorando per 45 min in solvente ACN.

Confrontando questi valori con quelli del metodo tradizionale si nota che si tratta di condizioni più blande, cioè si è diminuita sensibilmente la quantità di BSTFA utilizzato (24 µl vs. 40 µl) e si sono ridotti i tempi di derivatizzazione (45 min vs 70 min), nonché la temperatura (ambiente vs. 75 °C), come riportato nello schema di Fig. 2.

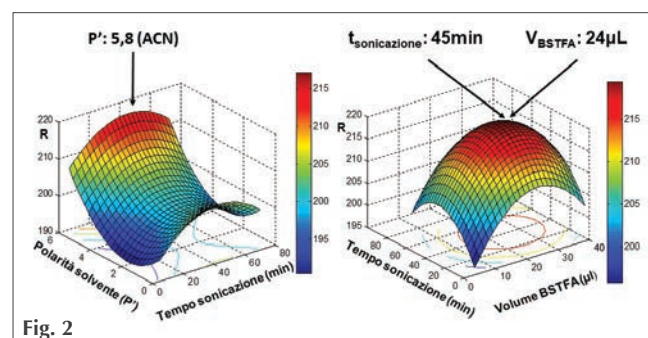


Fig. 2

Lo studio ha quindi portato ad ottenere un metodo notevolmente più green rispetto a quello convenzionale, riducendone l'impatto dal punto di vista energetico, diminuendo la temperatura, i tempi di analisi e la quantità di reagente impiegata.

La procedura ottimizzata è stata validata valutandone i parametri analitici, quali ripetibilità, linearità, limiti di rilevabilità e stabilità dei prodotti derivatizzati, e confrontando i risultati ottenuti con quelli del metodo tradizionale. Lo studio ha mostrato una precisione analitica comparabile tra i due metodi (RDS% intra day, 4÷6%) e un'elevata sensibilità idonea per le analisi sul PM, come dimostrato dai limiti di rilevabilità ( $X_{LOD}$ , 0,34÷5,50  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ ). Inoltre il metodo ottimizzato mostra una sensibilità nettamente superiore per gli zuccheri (in particolare mono e di saccaridi) rispetto al metodo tradizionale ( $X_{LOD}$  ~ 1,1  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$  e ~ 2,1  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ ). I composti derivatizzati con il metodo ottimizzato mostrano una stabilità nel tempo superiore a quella dei prodotti ottenuti con il metodo tradizionale, come dimostrato da una variazione minore delle aree dei picchi GC-MS dopo due giorni dalla derivatizzazione (-5% vs -9%).

Infine il metodo ottimizzato è stato applicato con successo nell'analisi di tre filtri di  $\text{PM}_{2,5}$  campionati nella zona urbana di Bologna in differenti stagioni dell'anno.

## BIBLIOGRAFIA

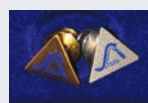
- [1] M.C. Pietrogrande *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**(17), 4279.
- [2] F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, *Analytical Applications of Ultrasound*, Elsevier, 2007, Vol. 26.
- [3] M.C. Pietrogrande *et al.*, *Atmospheric environment*, 2013, **75**, 279.
- [4] M.C. Pietrogrande *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **689**(2), 257.

### Ultrasound-Assisted Derivatization for GC/MS Analysis of Polar Organic Species in the Particulate Matter

A GC-MS method was developed based on ultrasound-assisted derivatization for the analysis of polar organic compounds in ambient particulate matter. Operative parameters were optimized by experimental design. The developed protocol uses meddler derivatization conditions compared to the traditional method, still maintaining the analytical characteristics required by the environmental analysis.

## VETRINA SCI

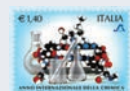
**Polo SCI** - Polo a manica corta, a tre bottoni, bianca ad effetto perlato, colletto da un lato in tinta, dall'altro lato a contrasto con colori bandiera (visibili solo se alzato), bordo manica dx con fine inserto colore bandiera in contrasto, bordo manica a costine, spacchetti laterali con colore bandiera, cuciture del collo coperte con nastro in jersey colori bandiera, nastro di rinforzo laterale. Logo SCI sul petto. Composizione: piquet 100% cotone; peso: 210 g/mq; misure: S-M-L-XL-XXL; modello: uomo/donna. Costo 25 € comprese spese di spedizione.



**Distintivo SCI** - Le spille in oro ed in argento con il logo della SCI sono ben note a tutti e sono spesso indossate in occasioni ufficiali ma sono molti i Soci che abitualmente portano con orgoglio questo distintivo.

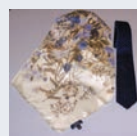
La spilla in oro è disponibile, tramite il nostro distributore autorizzato, a € 40,00.

La spilla in argento, riservata esclusivamente ai Soci, è disponibile con un contributo spese di € 10,00.



**Francobollo IYC 2011** - In occasione dell'Anno Internazionale della Chimica 2011 la SCI ha promosso l'emissione di un francobollo celebrativo emesso il giorno 11 settembre 2011 in occasione dell'apertura dei lavori del XXIV Congresso Nazionale della SCI di Lecce. Il Bollettino Informativo di Poste Italiane relativo a questa emissione è visibile al sito: [www.soc.chim.it/sites/default/files/users/gadmin/vetrina/bollettino\\_illustrativo.pdf](http://www.soc.chim.it/sites/default/files/users/gadmin/vetrina/bollettino_illustrativo.pdf)

Un kit completo, comprendente il francobollo, il bollettino informativo, una busta affrancata con annullo del primo giorno d'emissione, una cartolina dell'Anno Internazionale della Chimica affrancata con annullo speciale ed altro materiale filatelico ancora, è disponibile, esclusivamente per i Soci, con un contributo spese di 20 euro.



**Foulard e Cravatta** - Solo per i Soci SCI sono stati creati dal setificio Mantero di Como ([www.mantero.com](http://www.mantero.com)) due oggetti esclusivi in seta di grande qualità ed eleganza: un foulard (87x87cm) ed una cravatta. In oltre 100 anni di attività, Mantero seta ha scalato le vette dell'alta moda, producendo foulard e cravatte di altissima qualità, tanto che molte grandi case di moda italiana e straniera affidano a Mantero le proprie realizzazioni in seta.

Sia sulla cravatta che sul foulard è presente un'etichetta che riporta "Mantero Seta per Società Chimica Italiana" a conferma dell'originalità ed esclusività dell'articolo. Foulard e cravatta sono disponibili al prezzo di 50 euro e 30 euro, rispettivamente, tramite il nostro distributore autorizzato.

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



CATERINA BERGANTIN, ANNALISA MAIETTI, ALBERTO CAVAZZINI, PAOLA TEDESCHI, NICOLA MARCHETTI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA  
CATERINA.BERGANTIN@UNIFE.IT

# VALUTAZIONE DELLA BIOACCESSIBILITÀ DEI POLIFENOLI NEL RADICCHIO ROSSO (*CHICORIUM INTYBUS*)

*Il presente lavoro presenta due diversi scopi: 1) la caratterizzazione mediante analisi HPLC-MS/MS del contenuto in polifenoli di due differenti tipologie di radicchio rosso coltivate nel sud del Delta del Po (Massenzatica, FE); 2) la quantificazione nella matrice originaria di alcuni composti target selezionati con successiva valutazione della bioaccessibilità durante una simulazione del processo digestivo (fase salivare, gastrica e duodenale).*

I polifenoli sono prodotti secondari del metabolismo delle piante e sono generalmente coinvolti in meccanismi di difesa nei confronti delle radiazioni ultraviolette e contro l'aggressione di patogeni. Questi composti, già caratterizzati per quanto riguarda la struttura chimica e le proprietà, sono presenti negli alimenti e contribuiscono al colore, all'aroma e all'odore. Complessivamente in natura sono stati identificati più di 8.000 composti, che presentano una struttura simile, caratterizzata dalla presenza di uno o più anelli aromatici sostituiti con funzioni ossidriliche. Il profilo in polifenoli è caratteristico di ogni singola specie vegetale e si rivela quindi utile sia all'identificazione della pianta considerata, sia alla valutazione delle sue proprietà nutraceutiche.

La determinazione quali-quantitativa dei composti bioattivi presenti all'interno degli alimenti, in particolare frutta e verdura, è estremamente utile per monitorare variazioni dovute a fattori ambientali e/o a fattori genetici. Studi di questo tipo si rivelano di fondamentale importanza nell'ottica dell'assegnazione di marchi di denominazione/indicazione protetta per prodotti agroalimentari tipici, al fine di certificarne e garantirne l'autenticità.

I polifenoli sono molecole in grado di contrastare i radicali liberi agendo da antiossidanti contro la perossidazione lipidica e l'infiammazione cronica,

con meccanismo di azione diretto o indiretto [1]. Negli ultimi dieci anni sono aumentate le ricerche epidemiologiche che associano una dieta a lungo termine ricca di polifenoli ad effetti benefici sulla salute umana, nello specifico riguardo la prevenzione di malattie cardiovascolari, tumori, malattie neurodegenerative e dell'apparato digerente, diabete ed osteoporosi [2].

Gli studi scientifici sono sempre più spesso accompagnati da ricerche relative al processo digestivo, all'assorbimento intestinale ed al metabolismo dei polifenoli. Il potenziale effetto benefico può infatti essere limitato dalla scarsa e/o variabile biodisponibilità della molecola considerata, in relazione a meccanismi chimici, fisici e fisiologici. La biodisponibilità viene definita come la frazione di una molecola ingerita e disponibile al sito di azione nelle normali condizioni fisiologiche e presuppone due concetti estremamente importanti: la bioaccessibilità e la bioattività. La bioaccessibilità si identifica con la porzione rilasciata dalla matrice durante il processo digestivo e disponibile quindi per l'assorbimento; la bioattività considera invece l'assorbimento e la via metabolica seguita dal composto per raggiungere il tessuto target, l'interazione con le biomolecole e la generazione di marker e risposte fisiologiche indotte.

Il radicchio rosso (*Chicorium intybus*) è un vegetale ampiamente coltivato e consumato, soprattutto nel

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

periodo invernale, in Europa, in Asia Occidentale e nel Nord America. Nello specifico, in Italia la coltivazione di questo ortaggio è concentrata nelle regioni settentrionali, dove esistono molti prodotti certificati con marchio europeo (radicchio rosso di Treviso IGP tardivo e precoce, radicchio di Verona IGP, radicchio tondo di Chioggia IGP, radicchio variegato di Castelfranco IGP). Studi già pubblicati hanno sottolineato come il radicchio rosso sia un'ottima fonte di polifenoli, alcuni dei quali sono stati caratterizzati nelle varietà di pregio presenti sul mercato.

Lo studio qui presentato prevede una prima valutazione del contenuto totale in polifenoli e della capacità antiossidante della frazione solubile, seguita da una caratterizzazione del maggior numero di polifenoli contenuti in due tipologie di radicchio rosso, lungo e tondo, coltivate nel sud del Delta del Po, nel territorio di Massenzatica (FE).

Il contenuto totale di polifenoli è stato determinato mediante l'utilizzo del reattivo di Folin-Ciocalteu ed è stata misurata la capacità antiossidante nei confronti del radicale DPPH. Sono stati utilizzati estratti idroalcolici per entrambe le tipologie considerate ed i dati ottenuti per il radicchio tondo sono maggiori rispetto al radicchio lungo sia per il contenuto totale in polifenoli ( $2398 \pm 251$  vs  $1797 \pm 168$   $\mu\text{g}$  catechina/g di campione  $\pm$ ds), sia per la capacità antiossidante ( $7,27 \pm 0,91$  vs  $5,70 \pm 0,62$   $\mu\text{mol}$  di Trolox/g di campione  $\pm$ ds).

Lo studio del profilo in polifenoli è stato eseguito mediante l'utilizzo di una strumentazione HPLC-MS/MS, in modalità di determinazione ESI positiva e negativa, portando all'identificazione di 36 composti tra i più abbondanti e comuni [3]. In accordo con dati presenti in letteratura, ad eccezione degli acidi fenolici più semplici (acido malico, caffeico, chinico e caftarico), tutti gli altri composti sono presenti in forma glicosilata o esterea, con maggior frequenza dei derivati acetile e malonile [4].

Le proprietà chimiche di una molecola e la complessità biochimica, sommate a effetti associativi e/o competitivi, possono influenzare il processo di assorbimento, limitandone quindi la disponibilità nel sangue e conseguentemente nelle cellule. Per questo motivo, è importante effettuare la quantificazione esatta del composto considerato nella matrice iniziale e monitorarne poi la concentrazione durante i diversi step digestivi.

Nello specifico sono stati selezionati sette differenti composti target (tra i 36 totali), le cui concentrazioni sono state determinate, per entrambi i tipi di radicchio rosso analizzati, in seguito ad un processo di estrazione chimico-enzimatico esaustivo. L'associazione tra questi due metodi estrattivi si rivela particolarmente utile per matrici in cui la percentuale di fibra è elevata. I polifenoli possono infatti presentarsi in forma legata ed in tal caso solo l'utilizzo di opportuni enzimi risulta efficace per poterli estrarre e quantificare nella matrice considerata. I composti monitorati sono: cianidina-3-O-glucoside (C3OG), acido dicaffeiltartrico (DTCA), acido 5-caffeilchinico (5CQA), apigenina-7-O-glucoside (A7OG), kaempferolo-7-O-glucoside (K7OG), quercetina-3-O-malonil-glucoside (Q3OMG) e acido 3-caffeilchinico (3CQA).

Gli studi di bioaccessibilità sono stati eseguiti seguendo il modello statico *in vitro* di riferimento, analizzando rispettivamente gli step salivare, gastrico e duodenale [5]. La Fig. 1, riporta i risultati espressi come bioaccessibilità % per i composti target selezionati, in riferimento alle quantità determinate nella matrice iniziale e riportate in Tab. 1.

Durante la fase salivare, tutti i composti mostrano valori simili di bioaccessibilità: C3OG e Q3OMG tra

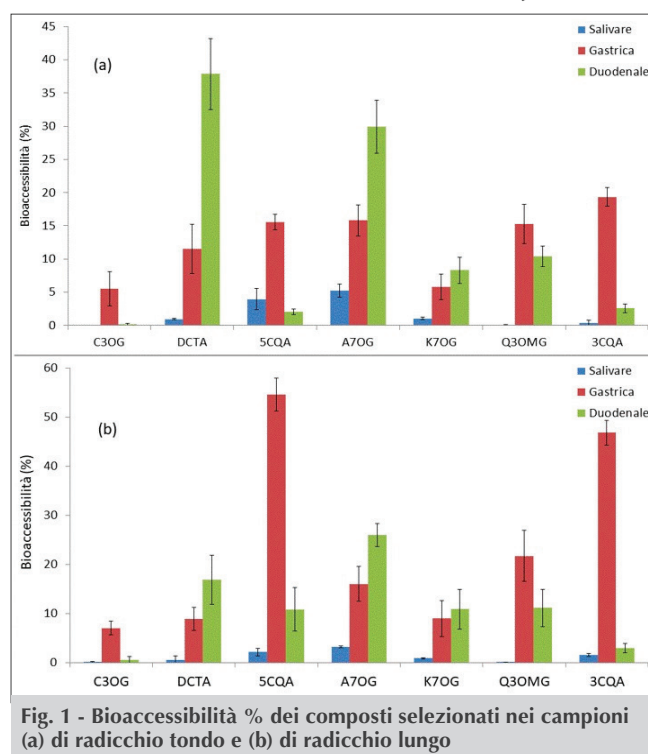


Fig. 1 - Bioaccessibilità % dei composti selezionati nei campioni (a) di radicchio tondo e (b) di radicchio lungo





Composto	Radicchio tondo ( $\mu\text{g/g}$ )	Radicchio lungo ( $\mu\text{g/g}$ )	% step enzimatico
C3OG	61,0 $\pm$ 5,9	14,6 $\pm$ 1,2	-
DTCA	804 $\pm$ 78	548 $\pm$ 42	10,4
5CQA	3,920 $\pm$ 0,053	1,060 $\pm$ 0,082	9,1
A7OG	0,340 $\pm$ 0,031	0,410 $\pm$ 0,044	-
K7OG	6,55 $\pm$ 0,61	7,00 $\pm$ 0,63	-
Q3OMG	521 $\pm$ 38	280 $\pm$ 21	2,4
3CQA	638 $\pm$ 18	206 $\pm$ 14	3,1

**Tab. 1 - Quantificazione totale dei 7 composti target selezionati nelle due differenti varietà considerate. La deviazione standard riportata è relativa a cinque diversi estratti chimici ed enzimatici**

0,01% e 0,1%; DTCA, K7OG e 3CQA tra 0,35% e 1%; 5CQA e A7OG tra 2% e 5%. Nella fase gastrica i valori di bioaccessibilità sono simili per entrambe le tipologie in riferimento ai composti C3OG, DTCA, A7OG, K7OG e Q3OMG, mentre per gli acidi 5CQA e 3CQA si registrano valori più elevati nel radicchio lungo rispetto al radicchio tondo (54,6% vs 15,2% e 46,8% vs 19,3%). Nella fase duodenale si osservano invece le maggiori differenze: il composto DTCA presenta una maggiore bioaccessibilità nel radicchio tondo (37,9%) rispetto al lungo (16,9%) mentre l'acido 5CQA registra valori più elevati nel radicchio lungo (10,8%) rispetto al tondo (2,0%). Differenze minime (inferiori al 4%) si registrano per A7OG e K7OG, mentre per gli altri composti i valori di bioaccessibilità sono confrontabili (considerando la variabilità della matrice).

Si possono quindi individuare tre diversi comportamenti che coincidono per le due tipologie di radicchio studiate. In primo luogo, si evidenzia un aumento progressivo e lineare della bioaccessibilità, dalla fase salivare a quella duodenale, per i composti DTCA, A7OG e K7OG (tipo-1). Per i composti C3OG, 3CQA e 5CQA la bioaccessibilità a livello gastrico è particolarmente elevata e subisce una notevole diminuzione nella fase duodenale (tipo-2). Infine, il composto Q3OMG presenta una bioaccessibilità gastrica elevata con un decremento nella fase duodenale meno rilevante rispetto al caso precedente (tipo-3).

Soffermandosi sui tre diversi andamenti elencati, si può individuare una correlazione tra la struttura chimica della molecola e la relativa bioaccessibilità. L'O-glicosilazione al carbonio 7 fornisce ad apigenina e kaempferolo, molecole dalla struttura chimica simile ad eccezione del gruppo -OH al carbonio 3, l'andamento di tipo-1. L'O-glicosilazione al carbonio 3, potrebbe conferire una bioaccessibilità maggiore durante la fase ga-

strica. I due acidi caffeilchinici (3CQA e 5CQA) mostrano, inoltre, un andamento del tutto simile (tipo-2). Per individuare se esista effettivamente una correlazione tra la bioaccessibilità e la posizione della glicosilazione sull'aglicone, sono tuttavia necessari studi aggiuntivi,

che coinvolgano un maggior numero di composti.

I possibili effetti benefici dei composti bioattivi presenti all'interno degli alimenti sono determinati dalla loro biodisponibilità, che è influenzata da diversi fattori, che comprendono la natura della molecola considerata, la forma in cui si presenta, l'associazione con la matrice vegetale, la digestione da parte degli enzimi presenti nel tratto gastro-intestinale e l'assorbimento.

La valutazione della bioaccessibilità di una serie di polifenoli target e l'interpretazione dei risultati in relazione alla struttura chimica dei composti presentata in questo lavoro, si rivela quindi interessante e può stimolare studi futuri.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] W.A. Peer, A.S. Murphy, *The Science of Flavonoids*, E. Grotewold (Ed.), Springer, 2006, 239.
- [2] I.C.W. Arts, P.C.H. Hollman, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, **81**(Suppl. 1), 317S.
- [3] C. Bergantin *et al.*, *Journal of Functional Foods*, 2017, **33**, 94.
- [4] C. Carazzone *et al.*, *Food Chemistry*, 2013, **138**, 1062.
- [5] M. Minekus *et al.*, *Food and Function.*, 2014, **5**, 1113.

### Evaluation of Bioaccessibility of Polyphenols in Red Chicory (*Chicorium intybus*)

The present work had a twofold objective: 1) the characterization in terms of polyphenols content by HPLC-MS/MS of two different varieties of red chicory from southern Po Delta area (Massenzatica, FE); 2) the concentration assessment of several target compounds throughout a simulated gastro-intestinal digestion after a precise quantification in the vegetable matrix.

GIOVANNI VENTURA<sup>A</sup>, COSIMA DAMIANA CALVANO<sup>A,B</sup>, FRANCESCO PALMISANO<sup>A,B</sup>, TOMMASO RICCARDO INNOCENZO CATALDI<sup>A,B</sup><sup>A</sup>DIPARTIMENTO DI CHIMICA AND <sup>B</sup>CENTRO INTERDIPARTIMENTALE SMART UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI "ALDO MORO"  
GIOVANNI.VENTURA@UNIBA.IT

# CISPLATIN CONJUGATE WITH CYANOCOBALAMIN: SOFT IONIZATION/HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY AS A NEW BLADE FOR ITS CHARACTERIZATION

*Conjugate of cisplatin with cyanocobalamin (CNCbl-cisplatin) can be considered as a prodrug for Pt-based antineoplastic drug delivering to cancer cells. Using the CNCbl-cisplatin conjugate as an example, we demonstrate here that detailed molecular analysis can be obtained by either matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) or electrospray ionization Fourier-transform MS (ESI FTMS) using an orbital trap (Orbitrap).*

Cisplatin, *cis*-diamminodichloro platinum(II) (Fig. 1A) is a platinum-based drug used for the treatment of various kinds of cancers (e.g. ovarian and testicular) and head and neck solid tumors [1, 2]. Despite its effectiveness, the toxic side effects and tumor resistance associated with cisplatin have led to the search for newer Pt-containing drugs with enhanced anticancer activities and lower side effects [3, 4]. Indeed, carboplatin and oxaliplatin are recognized as third generation platinum-based drugs [5, 6]. More recently, however, an innovative drug delivery system has been proposed to make the attack more effective against cancer cells, using lower dosages. The production of prodrugs within cancer cells is particularly interesting; vitamin B<sub>12</sub> in the form of cyanocobalamin (CNCbl) functionalized with cisplatin could be regarded as a potential prodrug candidate

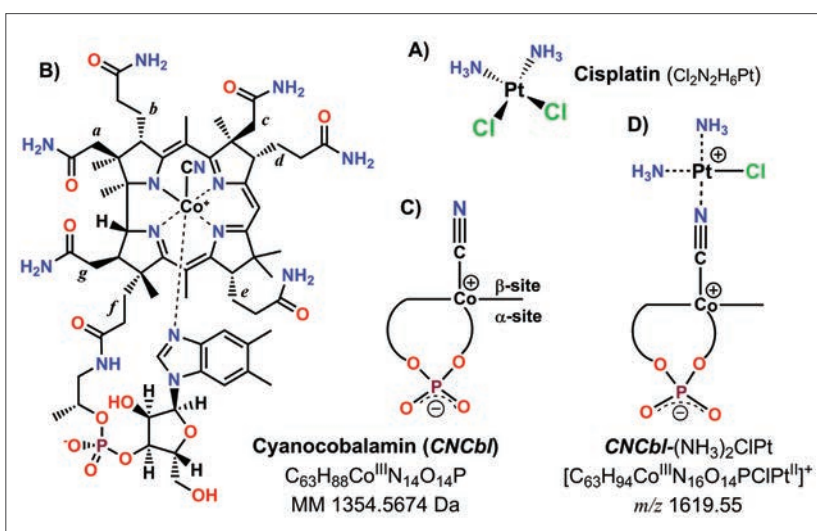


Fig. 1 - A) *cis*-diamminedichloroplatinum(II) commonly named cisplatin; B) chemical structure of cyanocobalamin (CNCbl), also known as vitamin B<sub>12</sub>, along with its empirical formula and monoisotopic mass (MM); C) schematic representation of CNCbl; D) schematic chemical structure of the conjugate species between CNCbl and cisplatin in which the chlorido ligand has been replaced by a cyanide-bridged (Co-CN-Pt). The conjugate species was prepared in good yield in aqueous solution at 60 °C for 16 h. The monoactivated form of cisplatin (i.e., [cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>) reacts with the cyano ligand of Co(III)-cyanocobalamin forming a positively charged species at m/z 1619.55

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.



because *CNCbl* uptake in mammalian cells is mediated by specific, high-affinity receptors that are overexpressed in numerous human tumors [7-10]. Moreover, the affinity of *CNCbl*-cisplatin conjugates for cell surface transcobalamin II receptors is high enough providing the rationale for targeted drug delivering to cancer cells [9].

Fig. 1B shows the molecular structure of *CNCbl* in which the central Co(III) ion is equatorially coordinated to four nitrogens of a corrin ring consisting of four reduced pyrroles and seven acetamide side chains (i.e., *a-f*). The lower axial coordination site ( $\alpha$ -side) is occupied by a dimethylbenzimidazole (DMB) base tethered to the acetamide chain *f* via a nucleotide loop; the upper ( $\beta$ -side) axial ligand identifies different Cbls (e.g. -CN in the *CNCbl*) as illustrated in the simplified structure of Fig. 1C. Reaction in the aqueous phase of cisplatin and *CNCbl* generates the conjugate shown in Fig. 1D as demonstrated by Alberto and coworkers, using X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance (NMR) [11].

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [12, 13], is the golden standard analytical tool for the quantification of elemental Pt and has been used in several studies for monitoring cisplatin uptake and formation of Pt-DNA adducts [12]. To the best of our knowledge, soft ionization mass spectrometry (MS) methods and especially matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) has not yet been fully evaluated for the characterization of *CNCbl*-Pt(II) drug conjugates, one reason being the failure to detect the intact conjugate at the expected  $m/z$  value of 1619.55 using conventional (first generation) matrices. Here it is clearly shown that rationally designed MALDI matrices can overcome this issue. Furthermore, MALDI MS is compared with electrospray ionization (ESI) Fourier transform (FT) high resolution MS using an orbital trap analyzer [14, 15].

Fig. 2 shows typical positive ion mode MALDI and ESI mass spectra of the conjugate formed between

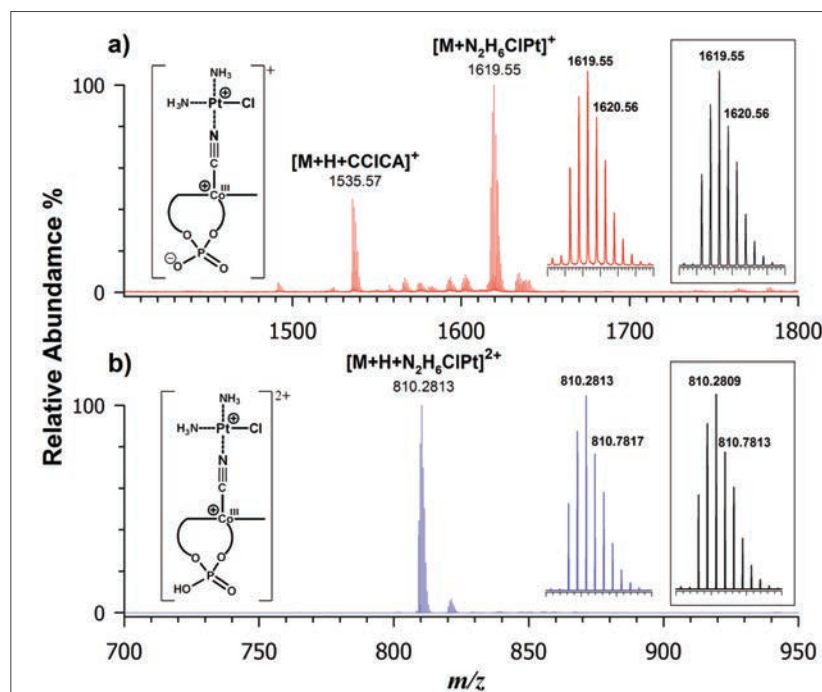


Fig. 2 - a) MALDI-ToF mass spectrum of the conjugate between *CNCbl* (*M*) and monochloro cisplatin ( $[M+cis-Pt(NH_3)_2Cl]^+$ ) where 4-chloro- $\alpha$ -cyano-cinnamic acid (CCICA) was used as a matrix; b) mass spectrum obtained by ESI-FTMS of the same conjugate that exhibits a doubly charged ion as the predominant peak. Insets show the enlarged isotopic cluster at (a)  $m/z$  1619.55 and (b)  $m/z$  810.2813 compared with simulated profiles using the following empirical formulae,  $[C_{63}H_{94}ClCoN_{16}O_{14}PPt]^+$ , and  $[C_{63}H_{95}ClCoN_{16}O_{14}PPt]^{2+}$ , respectively (see boxed frames). Simulated data were obtained by Xcalibur software 2.2 SP1.48 (Thermo Scientific). The peak signal at  $m/z$  1535.57 is due to an adduct of *CNCbl* with the matrix

*CNCbl* and monochloro-cisplatin,  $[cis-Pt(NH_3)_2Cl]^+$  prepared by reacting (at 60 °C for 16 h in aqueous solution) a cisplatin/*CNCbl* mixture (molar ratio >100:1). The MALDI spectrum (Fig. 2a) was obtained using 4-chloro- $\alpha$ -cyano-cinnamic acid (CCICA) as matrix [16]. Note that conventional proton transfer matrices such as  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, does not permit detection of the intact *CNCbl*-cisplatin conjugate in the gas phase, most likely because the labile Co(III)-CN bond of *CNCbl* is homolytically dissociated during the desorption process [17]. Using CCICA, an ion cluster with the most intense signal at  $m/z$  1619.55 is observed with the following empirical formula,  $[C_{63}H_{94}ClCoN_{16}O_{14}PPt]^+$ , being in excellent agreement with that expected for the *CNCbl*-monochloro cisplatin conjugate ( $[M + cis-Pt(NH_3)_2Cl]^+$ ). This species is generated by the elimination of one easy-leaving chloride from the Pt complex and the formation of a Co-CN-Pt bridge, which produces the

single and positively charged ion (Fig. 1D). To our knowledge, the CCICA matrix is the only one available to preserve CN labile axial ligand loss during the MALDI MS analysis [17], which is an indirect confirmation of the linking site.

ESI or MALDI ionization sources greatly influence the resulting spectra of the *CNCbl*-monochloro cisplatin conjugate. Fig. 2 (plot b) shows the mass spectrum obtained by ESI-Orbitrap FTMS: the base peak is due to a doubly charged platinum containing ion at  $m/z$  810.2813. Experimental isotopic pattern matches very well with the chemical composition  $[C_{63}H_{95}Cl-Co^{III}N_{16}O_{14}Pt^{II}]^{2+}$  as illustrated in the boxed frame, with a mass accuracy better than 0.5 ppm. Definitely, both ionization sources allowed us to obtain reliable and informative pictures of cisplatin interplay with *CNCbl*, at the molecular level. As cisplatin produces its pharmacological effects by cross-linking the DNA nucleobases, forming intra- and inter-strand cisplatin-DNA adducts, the use of these high resolution and sensitive MS techniques can qualitatively characterize and elucidate their chemical structure. Though cellular uptake studies of cisplatin can be addressed by elemental speciation analysis at biological relevant concentration levels (i.e. ca. 5  $\mu$ M), no detailed structure information can be obtained. Conversely, the accurate quantification of intact *CNCbl*-cisplatin is possible also in complex biological samples, especially when ESI-FTMS is coupled to liquid chromatography, thus preserving the molecular identity of Pt-based drugs (manuscript in preparation). Compared to LC-ICP-MS, the molecular identity of Pt-based drugs is conserved without losing molecular details, which might influence the cellular uptake and drug selectivity. As many authors have revealed, a higher number of DNA-adducts in the patients responding to Pt drugs, the coupling of LC with ESI-FTMS will afford the examination of such adducts including those formed with *CNCbl*-cisplatin. The key for successful identification can be retrieved by acquiring MS/MS spectra and comparing fragmentation pattern obtained by different MS instruments.

### Acknowledgments

This work was supported by the project PONA3\_00395/1 "Bioscienze & Salute (B&H)" of Italian Ministero per l'Istruzione, l'Università e la Ricerca (MIUR).

### REFERENCES

- [1] D. Wang, S.J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, **4**, 307.
- [2] S. Dasari, P.B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.*, 2014, **740**, 364.
- [3] M.J. McKeage, *Drug Saf.*, 1995, **13**, 228.
- [4] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 573.
- [5] N. Shah, D.S. Dizon, *Futur. Oncol.*, 2009, **5**, 33.
- [6] T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 3436.
- [7] G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan *et al.*, *Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1625.
- [8] D.A. Collins, H.P. Hogenkamp, M.K. O'Connor *et al.*, *Mayo Clin. Proc.*, 2000, **75**, 568.
- [9] Y. Gupta, D.V. Kohli, S.K. Jain, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2008, **25**, 347.
- [10] S.M. Clardy, D.G. Allis, T.J. Fairchild, R.P. Doyle, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2011, **8**, 127.
- [11] S. Mundwiler, B. Spingler, P. Kurz *et al.*, *Chem. - A Eur. J.*, 2005, **11**, 4089.
- [12] D. Garcia Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 861.
- [13] M.T.Q. Tran, S. Stürup, I.H. Lambert *et al.*, *Metallomics*, 2016, **8**, 298.
- [14] A. Makarov, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1156.
- [15] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2005, **40**, 430.
- [16] G. Ventura, F. Arnesano, C.D. Calvano *et al.*, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 53658.
- [17] C.D. Calvano, G. Ventura, F. Palmisano, T.R.I. Cataldi, *J. Mass Spectrom.*, 2016, **51**, 841.

### Analisi MS della cianocobalamina cisplatinata

La cianocobalamina funzionalizzata con cisplatino è un esempio di pro-farmaco che potrebbe consentire il rilascio mirato del cisplatino, un noto agente antitumorale a base di Pt(II); in questo studio la spettrometria di massa ad alta risoluzione con sorgenti di ionizzazione soft MALDI o ESI è utilizzata per ottenere informazioni sulla composizione chimica e strutturale di specie a base di Pt.



EMANUELA FRAPICCINI<sup>A</sup>, ANNA ANNIBALDI<sup>B</sup>, MATTIA BETTIA, SILVIA ILLUMINATI<sup>B</sup>, MAURO MARINI<sup>A</sup>, MONICA PANFILI<sup>A</sup>, GIUSEPPE SCARPONI<sup>B</sup>, CRISTINA TRUZZI<sup>B</sup>

<sup>A</sup>NATIONAL RESEARCH COUNCIL (CNR), INSTITUTE OF MARINE SCIENCE (ISMAR), ANCONA

<sup>B</sup>DEPARTMENT OF LIFE AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
EMANUELA.FRAPICCINI@AN.ISMAR.CNR.IT

## IPA IN *MULLUS BARBATUS*: ESTRAZIONE CON QuEChERS

**Scopo di questo studio è testare la tecnica di estrazione QuEChERS per la determinazione degli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) nel filetto della triglia di fango, *Mullus barbatus*, del Mar Adriatico. Tale metodo di estrazione è stato applicato con successo (% di recupero  $85 \pm 13,3\%$ ), risultando un'efficace alternativa ai metodi più tradizionali (MAE, microwave assisted extraction). Il benzo(a)pirene era al di sotto del LOD e pertanto, inferiore ai tenori massimi consentiti dalla legge (2 ng/g w.w., Reg. CE 1881/2006).**

Gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) sono contaminanti organici costituiti da due o più anelli aromatici. Le principali caratteristiche chimico-fisiche sono la bassa solubilità in acqua e l'elevata lipofilia, che permette loro di attraversare la membrana biologica e di bioaccumularsi negli organismi marini [1].

Valutare il livello di IPA in matrici complesse, quali il cibo, spesso richiede procedure di estrazione e purificazione complicate. Scopo di questo lavoro è testare e validare il metodo di estrazione dei QuEChERS, messo a punto per la determinazione degli IPA nel filetto di una specie demersale del Mar Adriatico: il *Mullus barbatus* (triglia di fango), largamente consumata dalla popolazione locale con un elevato interesse economico e commerciale e, pertanto, utilizzata come bioindicatore [2].

### Materiali e metodi

Esemplari di *Mullus barbatus* (n=215) sono stati catturati con reti a strascico nella Geographical Sub Area (GSA) 17, Mar Adriatico Centro-Settentrionale (Fig. 1). Il campionamento è avvenuto mensilmente nel periodo tra agosto 2015 e marzo 2016, esclu-



Fig. 1 - Zona di campionamento di *Mullus barbatus* effettuato nella Geographical Sub Area (GSA) 17, Mar Adriatico Centro-Settentrionale

dendo il mese di settembre per fermo biologico. La parte edibile del pesce è stata sfilettata e resa omogenea. La tecnica QuEChERS utilizzata in questo studio, si è basata su lavori presenti in letteratura [3]. Essa è costituita da una fase di estrazione in cui avviene l'aggiunta dei sali (4 g  $MgSO_4$  e 1 g NaCl) al filetto omogenato con acetonitrile (10 mL). È stato eseguito un vortex (3 min) e la centrifugazione del campione (3400 r.p.m. x 3 min). Nella seconda fase di purificazione il surnatante (3 mL) è stato inserito nel D-SPE Kit dei QuEChERS, costituito da 900 mg  $MgSO_4$ , 300 mg PSA e 150 mg C18. In seguito, il campione è stato

shakerato (1 min) e messo in centrifuga (3400 r.p.m. x 1 min). Dopodiché tutto il surnatante è stato recuperato, fatto evaporare e risospeso con il solvente di analisi (acetonitrile, 0,4 mL). L'analisi chimica è stata effettuata in HPLC-FD. La separazione degli analiti è avvenuta su una colonna a fase inversa (Hypersil Green PAH, 2,1 mm X 150 mm, 1,8  $\mu m$ ) eluendo la fase mobile (acetonitrile:H<sub>2</sub>O), secondo un programma a gradiente (3% min<sup>-1</sup>). La retta di taratura è stata costruita diluendo lo standard EPA 610 PAH Mix (1:50, 1:100, 1:200, 1:400 v/v) (Tab. 1).

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

IPA	Tempo di ritenzione (min)	R <sup>2</sup>	pendenza (b)	$\lambda_{ex/em}$ (nm)	LOD* (ppb)	LOQ* (ppb)
Naftalene	10,17	0,997	1,6373	270-360	0,3	0,9
Acenaftene + fluorene	13,05	0,999	1,4567	270-360	0,2	0,5
Fenantrene	14,37	0,992	8,2981	270-360	0,1	0,2
Antracene	15,12	0,993	29,3243	250-406	0,3	0,9
Fluorantene	16,17	0,993	7,8025	280-450	0,4	0,9
Pirene	16,86	0,995	40,8134	270-390	0,2	0,8
Benzo[a]antracene	18,88	0,992	29,0732	265-380	0,2	0,5
Crisene	19,10	0,993	31,412	265-380	0,2	0,5
Benzo[b]fluorantene	20,91	0,991	13,3407	290-430	0,2	0,7
Benzo[k]fluorantene	21,43	0,996	63,478	290-430	0,2	0,7
Benzo[a]pirene	22,23	0,999	32,8034	290-430	0,2	0,6
Dibenz[a,h]antracene	23,11	0,999	18,5948	290-410	0,2	0,6
Benzo[ghi]perilene + Indeno[1,2,3-cd]pirene	24,15	0,996	19,6476	290-410	0,2	0,6

\*LOD = 3,3 Sa/b  
 \*LOQ = 10 Sa/b; Sa, deviazione standard dell'intercetta della retta di regressione, ICH Q2B (ICH, 2005)

Tab. 1 - Tempo di ritenzione degli IPA, R2 della retta di taratura, pendenza della retta di taratura (b),  $\lambda_{ex/em}$  (nm), LOQ e LOD degli IPA indagati

## Risultati e discussioni

La metodologia utilizzata nell'estrazione QuEChERS è stata validata calcolando, secondo la metodica ICH Q2B [4], il LOQ (limite di rivelabilità) e LOD (limite di quantificazione) di ogni analita (Tab. 1). Inoltre, la tecnica QuEChERS è stata confrontata con un metodo di estrazione più tradizionale: il MAE, microwave assisted extraction. Sono state calcolate le percentuali di recupero delle due metodiche utilizzando un materiale certificato (NIST 1974C). I risultati ottenuti hanno dimostrato che i due metodi di estrazione sono confrontabili, pertanto, la tecnica QuEChERS ha rappresentato una valida alternativa rispetto al metodo più tradizionale del MAE, con percentuali di recupero del materiale certificato di  $85 \pm 13,3\%$  (Fig. 2). Inoltre, è stata valutata la precisione del metodo analitico calcolando l'inter-day ( $\leq 5\%$ ) e intra-day ( $\leq 8\%$ ), mentre la ripetibilità della tecnica di estrazione dei QuEChERS è risultata  $\leq 9\%$  (n=5).

Le concentrazioni degli IPA totali determinate con la metodica QuEChERS-HPLC variavano da 8 a 45 ng/g w.w. (peso umido) e, pertanto, erano confrontabili

con altri studi di letteratura [5]. Dei 16 inquinanti prioritari estratti dai campioni di filetto di *Mullus barbatus*, solamente tre IPA (naftalene, fenantrene e fluorantene) sono stati riscontrati al di sopra dei valori del LOD (Tab. 1). Tutti gli altri IPA ad alto peso

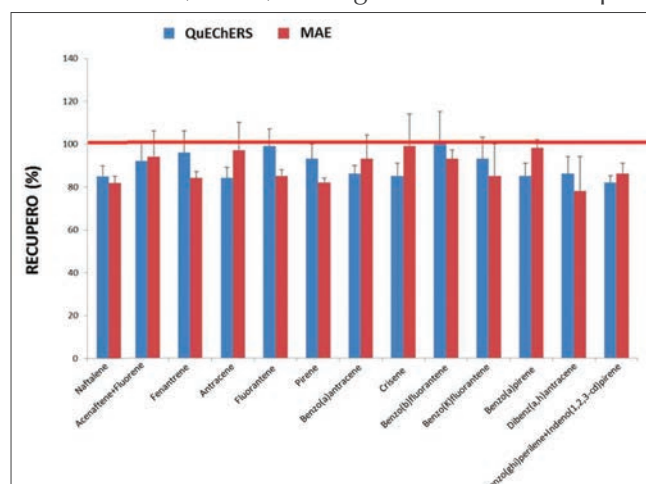


Fig. 2 - Confronto tra le percentuali di recupero dei metodi di estrazione QuEChERS e MAE (microwave assisted extraction) utilizzando materiale certificato (NIST 1974C)

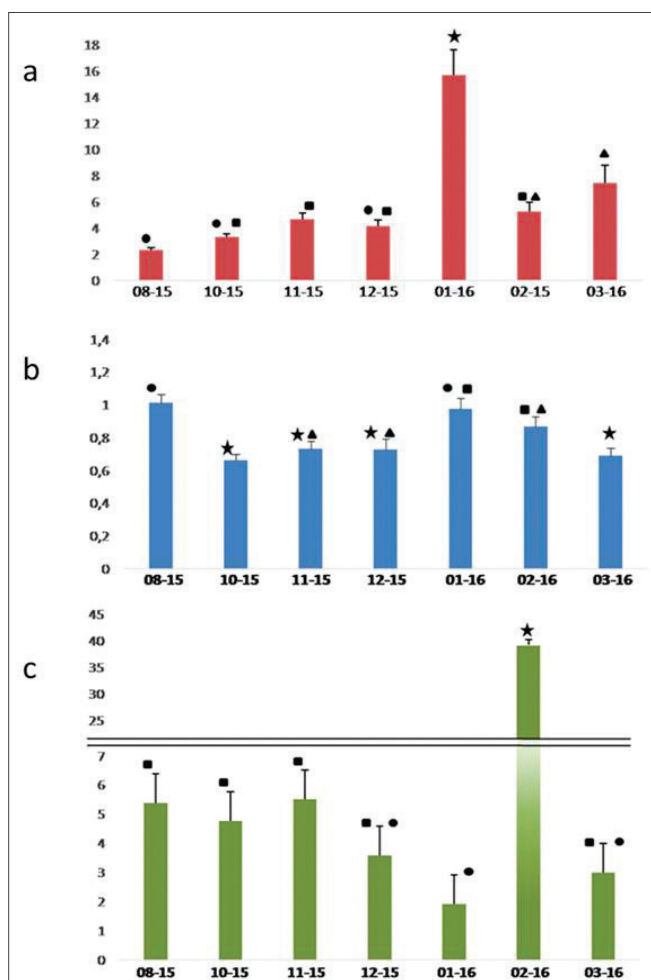
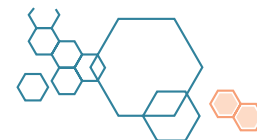


Fig. 3 - Concentrazioni (ng/g w.w.) di naftalene (a), fenantrene (b) e fluorantene (c) riscontrate nei campioni di filetto di *Mullus barbatus* campionati mensilmente (agosto 2015 - marzo 2016) nella GSA 17

molecolare ( $\geq 4$  anelli) sono risultati al di sotto del LOD e, pertanto, ben lontani dai tenori massimi stabiliti per quanto riguarda la sicurezza dei prodotti ittici alimentari, in particolare il benzo(a)pirene (2 ng/g w.w., Reg. CE 1881/2006). In questo studio è stata riscontrata una maggior presenza di IPA a basso peso molecolare (2-3 anelli) rispetto a quelli ad alto peso molecolare ( $\geq 4$  anelli). Questo risultato è stato spesso ritrovato in letteratura sia su filetti che in altre matrici biologiche di organismi marini [6]. Ciò accade perché gli IPA ad alto peso molecolare sono maggiormente soggetti a meccanismi di detossificazione da parte dell'animale [7]. In Fig. 3 sono rappresentate le medie delle concentrazioni di nafta-

lene, fenantrene e fluorantene, durante il periodo di campionamento. È stato possibile notare come la presenza di naftalene e fenantrene (2-3 anelli aromatici) è risultata piuttosto costante nel periodo di indagine. Al contrario, il fluorantene (4 anelli aromatici), che è considerato l'IPA maggiormente presente nei sedimenti marini [8], ha presentato concentrazioni che variano molto durante il periodo di campionamento, con un valore massimo nel mese di febbraio ( $39 \pm 1$  ng/g d. w.). Ciò potrebbe essere legato a contaminazioni di carattere ambientale, maggiormente presenti durante il periodo invernale (risospensione del sedimento, mareggiate, aumento degli apporti fluviali) [9]. È stato osservato come la stagionalità si è dimostrata essere una variabile che ha influenzato, in maniera statisticamente significativa, l'accumulo dei tre IPA nel filetto di *Mullus barbatus*, in accordo con alcuni lavori presenti in letteratura [10]. Inoltre, è stato osservato che gli esemplari di *Mullus barbatus* campionati nel periodo estivo-autunnale (agosto - settembre - ottobre - novembre), mostravano concentrazioni IPA più basse rispetto a quelli campionati nel periodo invernale (dicembre - gennaio - febbraio - marzo). Questo è stato osservato per il naftalene, il fenantrene e il fluorantene (Fig. 4).

Alcuni parametri biologici del pesce (età, sesso, peso) sono stati studiati e messi a confronto con le concentrazioni dei tre IPA riscontrate nel filetto (Fig. 5). Tranne alcune eccezioni, non si sono apprezzate differenze statisticamente significative tra il livello di IPA, il sesso e l'età degli individui di *Mullus barbatus*. Anche per quanto riguarda il peso dell'animale, non è stata apprezzata alcuna relazione statisticamente significativa tra le concentrazioni di naftalene e fe-

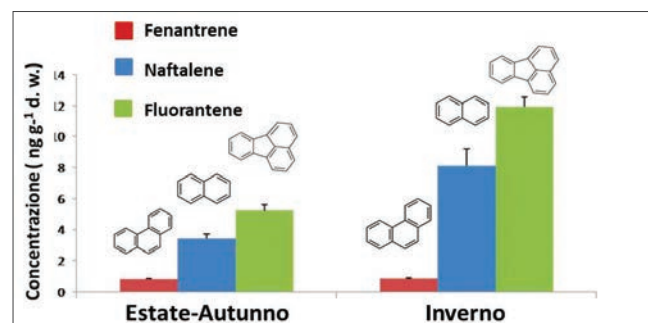


Fig. 4 - Concentrazione dei tre IPA in relazione alla stagionalità (estate-autunno/inverno)

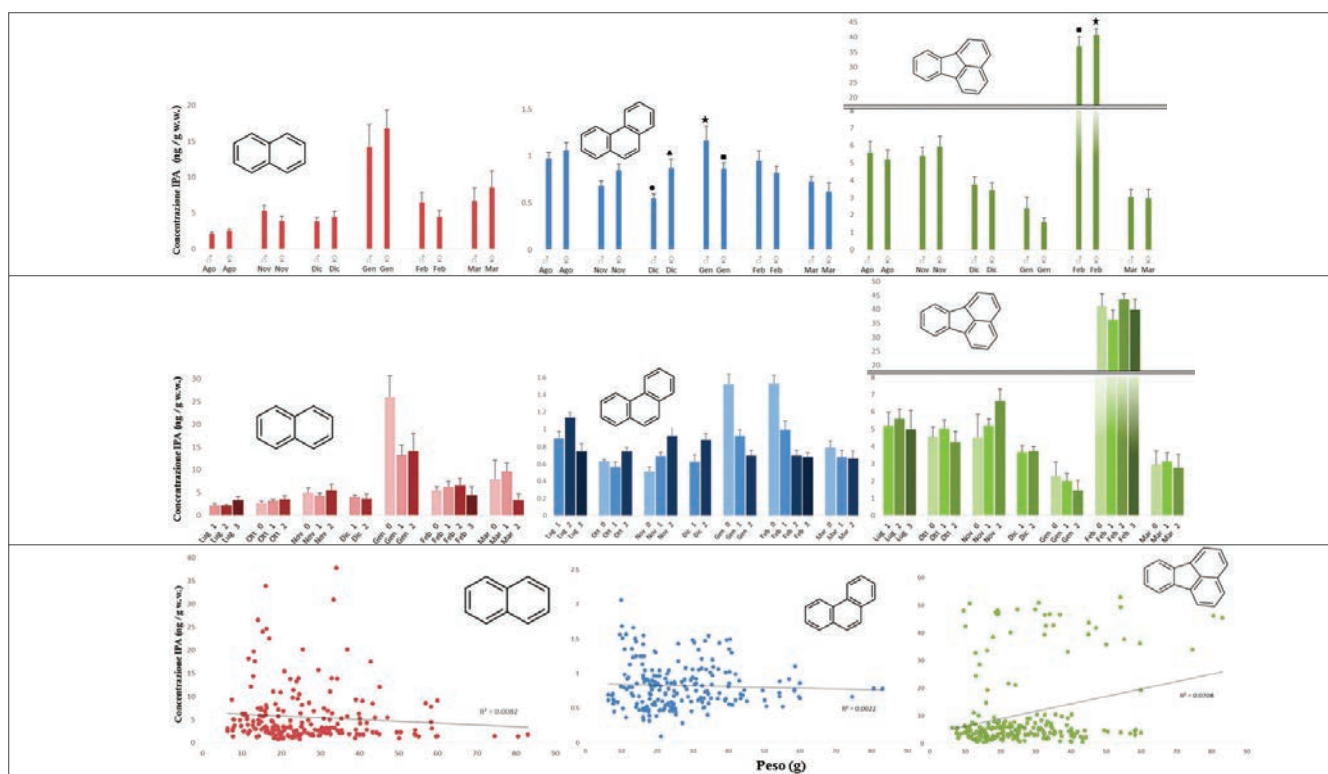


Fig. 5 - Concentrazione (ng/g w.w.) di naftalene, fenantrene e fluorantene rispetto ad alcune variabili biologiche di *Mullus barbatus*: sesso (M e F), età (0, 1, 2, 3 anni) e peso (g) dell'animale

nantrene con il peso (g) della specie. È stata invece riscontrata una leggera correlazione lineare positiva tra la concentrazione del fluorantene e il peso dell'animale (Fig. 5).

In conclusione, è possibile affermare che la metodica QuEChERS-HPLC, studiata e validata nel presente lavoro, può essere considerata una valida alternativa ai metodi di estrazione più tradizionali (MAE), per quanto riguarda l'estrazione degli IPA dal filetto di pesce. Tra le variabili ambientali e biologiche indagate, solamente la stagionalità ha presentato una relazione statisticamente significativa con l'accumulo degli IPA nel filetto, presentando valori di concentrazione maggiori nel periodo invernale. Poiché la stagionalità è legata al ciclo biologico di questa specie, sarebbe opportuno estendere tale ricerca andando ad esaminare l'intero ciclo biologico di *Mullus barbatus*, in particolare il periodo di riproduzione.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] B.A. Musa Bandowe *et al.*, *Environment International*, 2014, **65**, 135.
- [2] C. Porte *et al.*, *Marine Ecology Progress series*, 2002, **235**, 205.
- [3] M.J. Ramalhosa *et al.*, *Journal of Separation Science*, 2009, **32**, 3529.
- [4] C. Truzzi *et al.*, *Analytical Letters*, 2014, **47**, 1118.

- [5] M. Perugini *et al.*, *Chemosphere*, 2007, **66**, 1904
- [6] C.-L. Ke *et al.*, *Marine Pollution Bulletin*, 2017, **117**, 507.
- [7] M. Tiwari *et al.*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, **50**, 58.
- [8] M. Perugini *et al.*, *Environmental Pollution*, 2001, **119**, 91.
- [9] H.M. Hwang *et al.*, *Environmental Pollution*, 2006, **146**, 416.
- [10] V.M. León *et al.*, *Marine Pollution Bulletin*, 2014, **87**, 352.

## PAHs in *Mullus barbatus*: Extraction by QuEChERS

The purpose of this study was to test QuEChERS extraction method for the PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) determination in the red mullet fillet, *Mullus barbatus*, of the Adriatic Sea. QuEChERS method was successfully applied (percentage of recovery was 85±13.3%) becoming an effective alternative to more traditional methods (MAE, microwave assisted extraction). Benzo(a)pyrene was below the LOD and, therefore, lower than maximum levels permitted by law (2 ng/g w.w., Reg. CE 1881/2006).

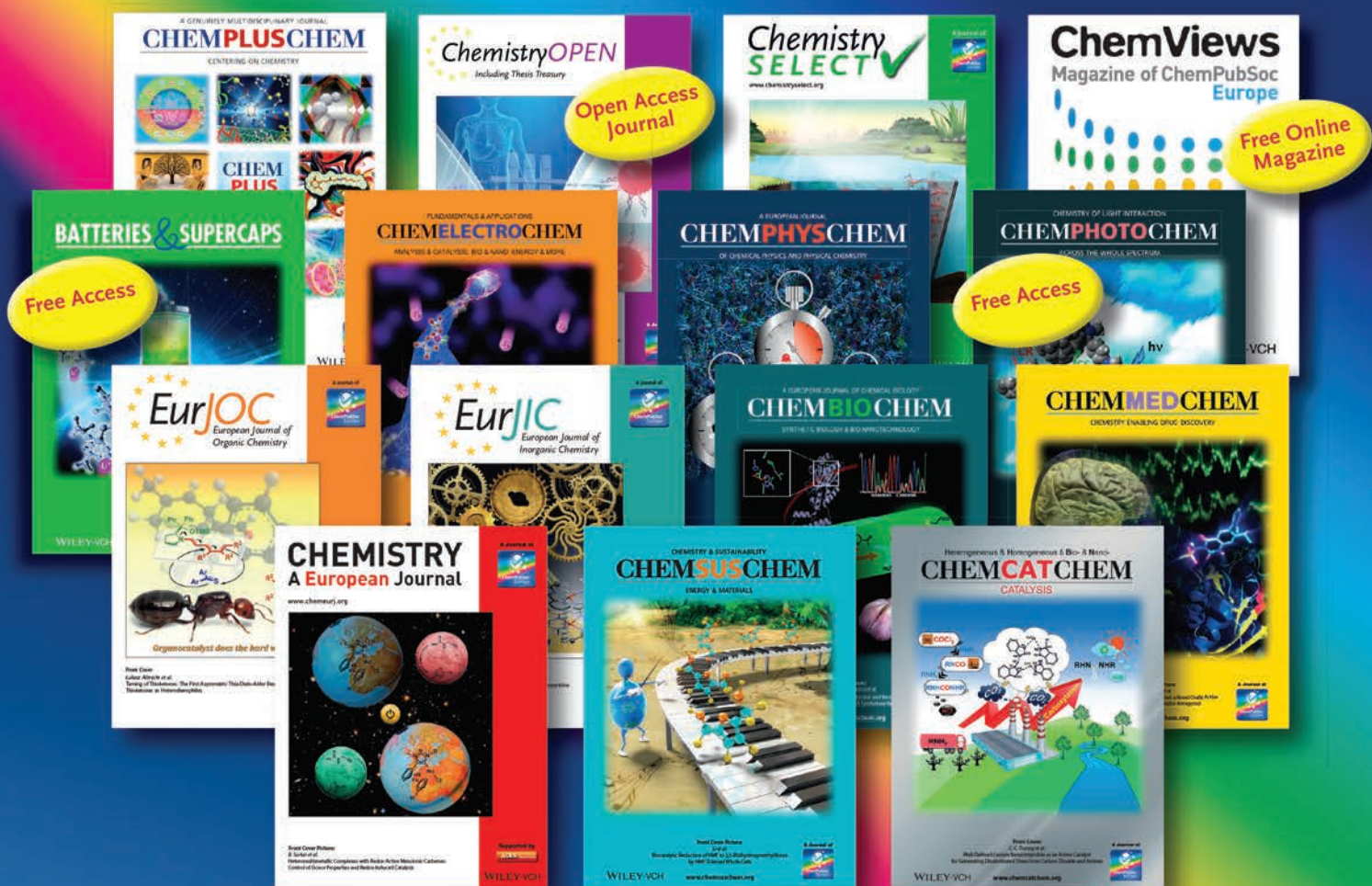


# Individual Member Rate of € 98,-\*

## for members of ChemPubSoc Europe societies



\*[electronic access to your favorite ChemPubSoc Europe title, without local VAT]

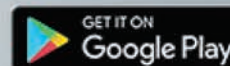


[www.onlinelibrary.wiley.com](http://www.onlinelibrary.wiley.com)



## One App

### 18 chemical society journals



Search for **ChemPubSoc Europe** in the stores

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

WILEY-VCH



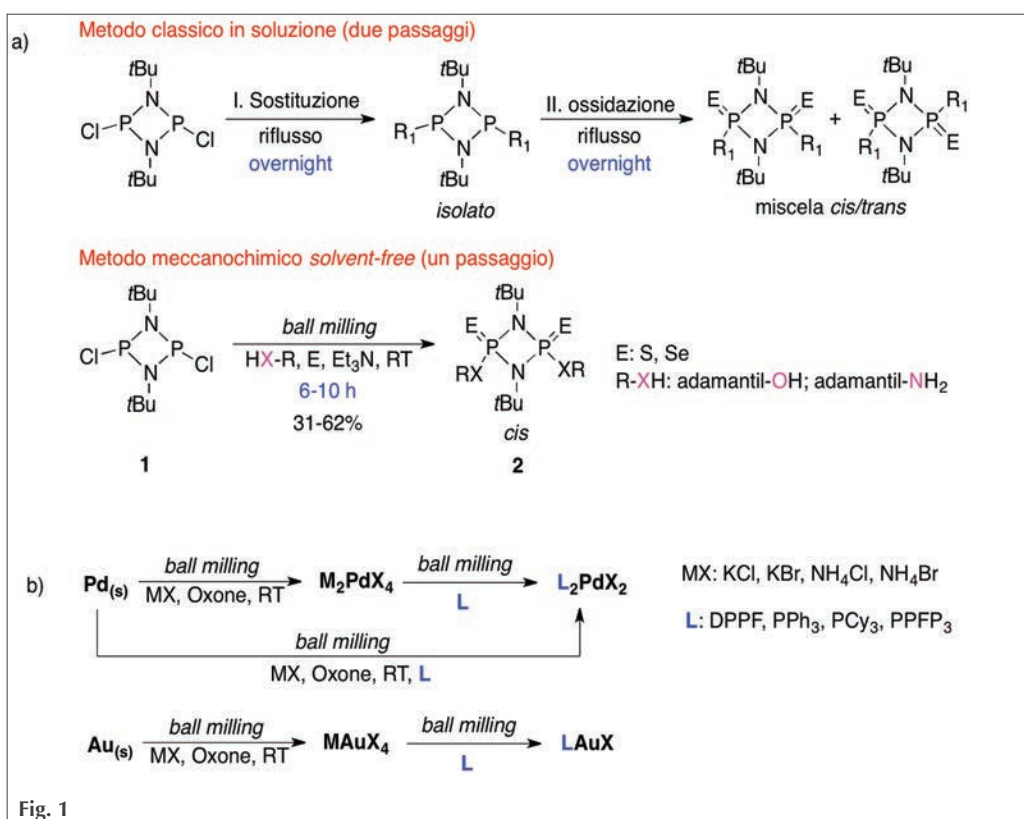
A CURA DI SILVIA CAUTERUCCIO E MONICA CIVERA  
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA  
 UNIVERSITÀ DI MILANO  
 SILVIA.CAUTERUCCIO@UNIMI.IT  
 MONICA.CIVERA@UNIMI.IT

## La meccanochimica nei processi chimici avanzati

Un argomento di grande attualità nel mondo della sintesi chimica è rappresentato dalla meccanochimica, definendo, secondo il “gold book” della IUPAC, una reazione meccanochimica una trasformazione indotta dall’assorbimento diretto di energia meccanica derivante da processi di macinazione. L’attivazione meccanochimica è considerata una metodologia molto importante nel contesto della *green chemistry*, in quanto non prevede l’impiego di solventi, i quali costituiscono uno dei principali inquinanti, sia su scala di laboratorio che industriale. D’altra parte, le condizioni *solvent-free* permettono di diminuire sensibilmente i tempi di reazione, operando a elevate concentrazioni e in assenza di fenomeni di solvatazione. Il grande salto di qualità che recentemente la meccanochimica sta facendo nei processi sintetici riguarda la possibilità di combinare tutti i suoi vantaggi con delle metodologie mirate a migliorare l’efficienza sintetica mediante la formazione di diversi legami in una singola operazione, ovvero le cosiddette *multiple bond-forming transformations* (MBFTs), che permettono inoltre di ridurre gli stadi di isolamento e purificazione. La sinergia meccanochimica-MBFTs rappresenta un passo avanti per una chimica più sostenibile, come ampiamente argomentato nella *Perspectives* di Menéndez [J.C. Menéndez, *Chem. Sci.*,

2018, **9**, 2042], nella quale vengono discussi i risultati ottenuti nell’applicazione della meccanochimica alle reazioni multicomponente, che sono senza dubbio tra gli esempi più brillanti ed efficaci di MBFTs. L’impiego della meccanochimica è risultato altrettanto vincente anche per promuovere processi “one-step one-pot”, anch’essi finalizzati a ridurre passaggi sintetici e relativi stadi di purificazione-isolamento degli intermedi, soprattutto quando quest’ultimi sono poco stabili.

Ne è un esempio la sintesi di una serie di ciclofosfani **2** (Fig. 1a) che sono stati ottenuti a partire dal dicloruro **1** mediante un processo di sostituzione-ossidazione one-pot utilizzando un mulino a sfere [F. Garcia, *Chem. Commun.*, DOI: [10.1039/C8CC01043A](https://doi.org/10.1039/C8CC01043A)]. Rispetto alle classiche procedure a due passaggi, il processo meccanochimico avviene in tempi decisamente più brevi, risulta altamente selettivo nell’otte-





nimento dell'isomero *cis* rispetto all'isomero *trans*, e permette di evitare l'isolamento dell'intermedio di P(III) generalmente poco stabile. Concludo segnalando una procedura meccanochimica di ossidazione-complettazione per la conversione diretta di metalli nobili (Pd e Au) in complessi metallorganici a base fosfinica comunemente utilizzati in catalisi [T. Friščič, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 2667]. La macinazione del metallo in presenza di oxone, quale blando ossidante, e un cloruro o bromuro inorganico a temperatura ambiente permette di ottenere i corrispondenti complessi solubili in acqua, i quali, trattati con eccesso di legante fosfinico, possono essere a loro volta convertiti, sempre per macinazione, in complessi fosfinici (Fig. 1b).

### La struttura e dinamica dell'RNA: uno sguardo computazionale

In questa recente *review* [J. Sponer, *Chem. Rev.*, 2018, articolo ASAP, DOI: [10.1021/acs.chemrev.7b00427](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00427)] gli autori riassumono i risultati ottenuti applicando diverse tecniche di dinamica molecolare (MD) allo studio dell'RNA, una molecola plurifunzionale la cui funzione biologica è intrinsecamente legata alla struttura e alla sua flessibilità. Queste specie chimiche sono coinvolte in molti processi cellulari e svolgono diverse attività, da quella catalitica a quella genetica. Grazie al sequenziamento di molti genomi e la disponibilità crescente di dati sperimentali, negli ultimi anni anche gli studi computazionali in questo campo sono aumentati. Infatti, con le simulazioni MD si possono interpretare ed integrare i dati sperimentali, generare relazioni struttura-attività per le diverse specie di RNA e fare ipotesi sul loro meccanismo di azione. Rispetto al DNA, dal punto di vista strutturale, le molecole di RNA formano diversi tipi di interazioni tra i residui nucleotidici. Infatti, oltre al classico accoppiamento Watson-Crick tra le basi azotate, RNA può formare legami ad idrogeno zucchero-base, zucchero-zucchero e base-fosfato, anch'essi molto specifici. La combinazione dei diversi tipi di interazione internucleotidica determina la struttura 3D

dell'RNA, che, per il principio di isostericità, è molto più importante e conservata della sequenza 2D (Fig. 2).

Secondo gli autori di questo lavoro, quando si studia la struttura 3D di una molecola di RNA con metodi computazionali come la dinamica molecolare, data la potenza dei sistemi di calcolo attuali, un approccio di tipo classico sembra essere la scelta più valida (non escludendo applicazioni future di metodi quanto meccanici). Esistono diversi *force fields* sviluppati per studiare RNA e ogni potenziale comporta delle approssimazioni e dei limiti. Se i *force fields pair-additive* sembrano avere raggiunto il loro limite, a meno di qualche tentativo di migliorare i parametri van der Waals delle interazioni di non legame e dei modelli di solvatazione, le strade da intraprendere in futuro potrebbero essere lo sviluppo di *force fields* polarizzabili.

Per ridurre i tempi di calcolo e aumentare il campionamento dello spazio conformazionale, diverse tecniche avanzate di dinamica molecolare sono già state utilizzate. Spesso per osservare alcuni fenomeni su una scala di tempi ragionevole, altre semplificazioni sono state introdotte, come l'uso di approcci *coarse grained*, in cui si riducono i gradi di libertà del sistema utilizzando una particella per rappresentare un gruppo di atomi. In questo caso le informazioni ottenute sulle molecole di RNA studiate sono più ristrette e riproducono solo un limitato set di osservabili in funzione alle limitazioni (termodinamiche o non-termodinamiche) applicate nella parametrizzazione.

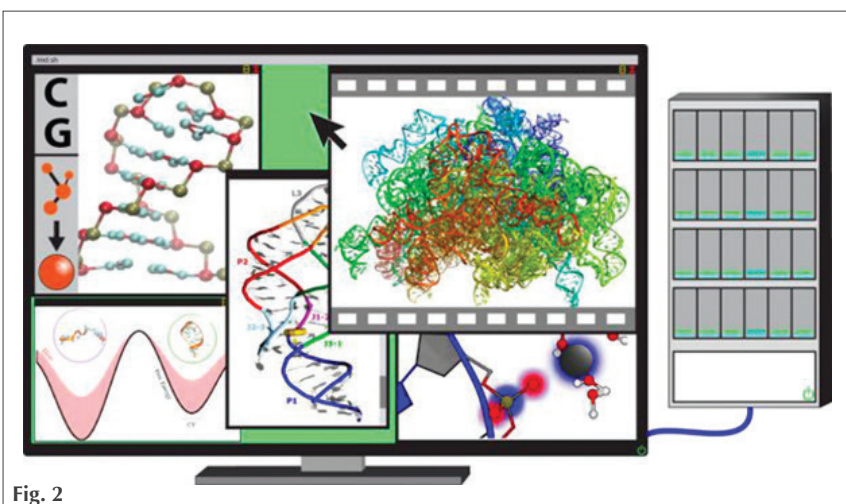


Fig. 2

CLAUDIO DELLA VOLPE  
UNITN, SCI, ASPO-ITALIA  
CLAUDIO.DELLAVOLPE@UNITN.IT

## MA L'INDUSTRIA CHIMICA È VERAMENTE PIÙ SICURA?

La nostra rivista si occupa di incidenti e di sicurezza; forse potrebbe farlo più spesso. Ricordo qua il bell'articolo di un anno fa di Ferruccio Trifirò dedicato agli incidenti negli spazi confinati (**La Chimica e l'Industria Newsletter - 2017, 4(1), gennaio/febbraio**), ma non ne ricordo altri recenti.

Tuttavia l'approccio medio e la vulgata tradizionale è che l'industria chimica è più sicura di altre. Certamente iniziative come Responsible Care hanno contribuito allo stabilirsi di un livello più elevato di sicurezza ed anche alla riduzione del numero di incidenti per numero di ore lavorate, ma ci sono una serie di precisazioni da fare.

Anzitutto va detto che i confronti e le statistiche sulla sicurezza non sono così banali da procurarsi; basti dire che la pagina Inail dedicata a questo tema offre sì una gran quantità di dati ma l'accesso è reso estremamente specialistico dall'uso praticamente obbligatorio di un linguaggio di consultazione (SPARQL) che non consente al non specialista di effettuare facilmente confronti od analisi; le uniche domande consentite a chi non conosce il linguaggio sono quelle sulle malattie professionali, mentre gli incidenti non sono accessibili in questa modalità e dunque occorre aspettare le sintesi annuali o semestrali degli enti dedicati.

La situazione generale è che gli articoli di giornale sembrano bollettini di guerra:

6/12/2017 Vaber Torino, 2 lavoratori gravemente ustionati

16/1/2018 Lamina Milano, 3 morti 3 feriti

23/1/2018 Axomatic di Settimo Milanese, 6 feriti

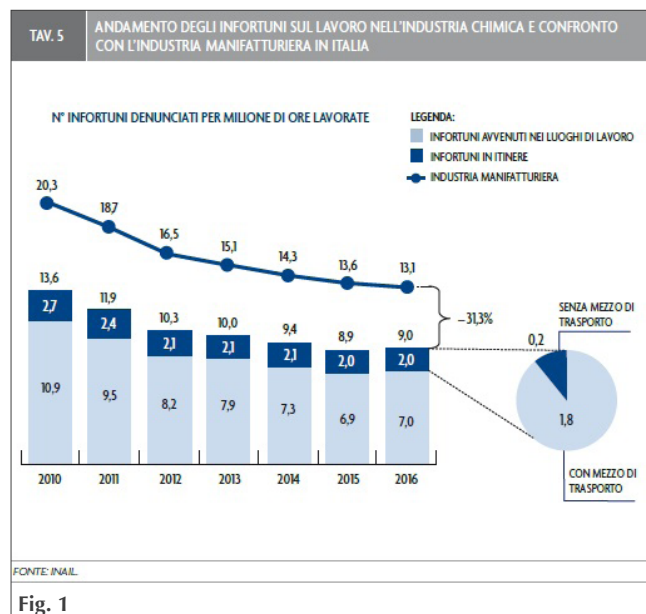
7/2/2018 Bulgarograsso (CO), Ecosfera 10 feriti

22/2/2018 Ichemco Cuggiono (MI), 1 ferito

11/3/2018 incendio cartiera Cologno Monzese (MI)

1/4/2018 Ecb Co. Srl Treviglio (BG), 2 morti.

E questa situazione, che non è di adesso, faceva già parlare il sindacato nel luglio scorso di "reticenza" dell'Inail, a seguito dell'episodio di un repentino cambiamento nel numero di incidenti denunciati in due documenti ufficiali successivi nella prima parte del 2017 (<http://www.rassegna.it/ra1-new.html?gobacktolive=http://www.rassegna.it/articoli/infortuni-sul-lavoro-la-reticenza-dellinail>) (Fig. 1).



I dati ufficiali sono riportati nell'ultimo documento Federchimica e limitati all'industria chimica e dimostrano due cose: la riduzione degli incidenti in tutta l'industria e una riduzione MENO accentuata nell'industria chimica.

Come vedete, e su questo concordo assolutamente, le statistiche sono riportate in incidenti per numero di ore lavorate, perché è chiaro che il rischio



dipende dal parametro probabilistico e dunque non può che dipendere non da valori assoluti, ma da parametri relativi alle dimensioni numeriche e temporali degli eventi.

Al contrario si trovano frequentemente considerazioni basate sulle dimensioni assolute del parametro incidenti, non rapportato al numero di ore lavorate od almeno al numero di lavoratori (ma già sarebbe meno preciso). Se si vuole comprendere ciò che è veramente cambiato nella sicurezza occorre dunque fare attenzione a questa modalità di confronto.

Ora, effettuando il confronto in modo relativo, si vede che sia pur di poco l'industria chimica mostra un peggioramento già fra 2016 e 2015 e, inoltre, che comunque la riduzione generale è più marcata di quella dell'industria chimica; dunque pur rimanendo più sicura l'industria chimica non riesce a mantenere questo vantaggio che si era procurata negli ultimi anni, anzi mostra un sia pur lieve peggioramento. Purtroppo i dati aggiornati al 2017 non ci sono ancora, ma le notizie giornalistiche non lasciano ben sperare.

Tuttavia c'è un altro aspetto che pure appare importante e che potrebbe ridimensionare il successo dell'industria chimica: è un aspetto che è stato fatto notare di recente (<https://www.punto-sicuro.it/sicurezza-sul-lavoro-C-1/rubriche-C-98/interviste-inchieste-C-117/rischio-chimico-malattie-infortunati-nel-comparto-metalmeccanico-AR-17571/>) (Fig. 2). In sostanza ci sono molti incidenti chimici anche in industrie NON chimiche e

Sostanze/prodotti chimici come agenti materiali di infortunio:

La maggior parte di tali infortuni coinvolge agenti caustici, corrosivi (47%) o tossici e nocivi (33%)

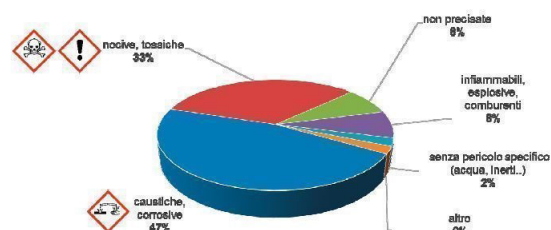


Fig. 2

dunque, per esempio, nell'industria metalmeccanica; si tratta di una sostanziale sottovalutazione allora del numero complessivo di incidenti chimici, incidenti dovuti ad una scarsa consapevolezza del rischio chimico in ambienti culturalmente meno attrezzati. Secondo questa indagine nel triennio 2013-2015 ci sono stati oltre 2000 incidenti di tipo chimico nell'industria metalmeccanica, un numero significativo, legati all'uso di sostanze corrosive ed al lavoro di carpenteria.

La conclusione è che la vulgata di un'industria chimica ormai più sicura delle altre potrebbe avere qualche problema di narrazione, e che, inoltre, la chimica è così profondamente diffusa nelle attività umane che per valutarne gli impatti non ci si può restringere al solo settore chimico propriamente detto. Infine una maggiore trasparenza da parte dell'Inail, una maggiore capacità di divulgare e far usare i dati, che pure esistono, sarebbe benvenuta e necessaria.

**SALUTE E SICUREZZA**  
NELL'UTILIZZO  
**DI PRODOTTI CHIMICI**  
**SUL LAVORO**

International Labour Organization

Giornata mondiale per la salute e la sicurezza sul lavoro  
28 aprile 2014

SafeDay



Società Chimica Italiana

La *Società Chimica Italiana*, fondata nel 1909 ed eretta in Ente Morale con R.D. n. 480/1926, è un'associazione scientifica che annovera quasi quattromila iscritti. I Soci svolgono la loro attività nelle università e negli enti di ricerca, nelle scuole, nelle industrie, nei laboratori pubblici e privati di ricerca e controllo, nella libera professione. Essi sono uniti, oltre che dall'interesse per la scienza chimica, dalla volontà di contribuire alla crescita culturale ed economica della comunità nazionale, al miglioramento della qualità della vita dell'uomo e alla tutela dell'ambiente.

La *Società Chimica Italiana* ha lo scopo di promuovere lo studio ed il progresso della Chimica e delle sue applicazioni. Per raggiungere questi scopi, e con esclusione del fine di lucro, la *Società Chimica Italiana* promuove, anche mediante i suoi Organi Periferici (Sezioni, Divisioni, Gruppi Interdivisionali), pubblicazioni, studi, indagini, manifestazioni.

Le Sezioni perseguono a livello regionale gli scopi della Società. Le Divisioni riuniscono Soci che seguono un comune indirizzo scientifico e di ricerca. I Gruppi Interdivisionali raggruppano i Soci interessati a specifiche tematiche interdisciplinari.

La Società organizza numerosi convegni, corsi, scuole e seminari sia a livello nazionale che internazionale. Per divulgare i principi della scienza chimica nella scuola secondaria superiore organizza annualmente i *Giochi della Chimica*, una competizione che consente ai giovani di mettere alla prova le proprie conoscenze in questo campo e che seleziona la squadra nazionale per le *Olimpiadi Internazionali della Chimica*.

Rilevante è l'attività editoriale con la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale. Organo ufficiale della Società è la rivista *La Chimica e l'Industria*.

### **Nuova iscrizione**

Per la prima iscrizione il Candidato Socio deve essere presentato, come da Regolamento, da due Soci che a loro volta devono essere in regola con l'iscrizione. I Soci Junior (nati nel 1987 o successivi) laureati con 110/110 e lode (Laurea magistrale e Magistrale a ciclo unico) hanno diritto all'iscrizione gratuita e possono aderire - senza quota addizionale - a due Gruppi Interdivisionali.

#### **Contatti**

##### *Sede Centrale*

Viale Liegi 48c - 00198 Roma (Italia)

Tel +39 06 8549691/8553968

Fax +39 06 8548734

Ufficio Soci Sig.ra Maria Carla Ricci

E-mail: [ufficiosoci@soc.chim.it](mailto:ufficiosoci@soc.chim.it)

Segreteria Generale Sig.ra Barbara Spadoni

E-mail: [segreteria@soc.chim.it](mailto:segreteria@soc.chim.it)

Amministrazione Rag. Simone Fanfoni

E-mail: [simone.fanfoni@soc.chim.it](mailto:simone.fanfoni@soc.chim.it)

Congressi Sig.ra Manuela Mostacci

E-mail: [ufficiocongressi@soc.chim.it](mailto:ufficiocongressi@soc.chim.it)

#### *Supporto Utenti*

Tutte le segnalazioni relative a malfunzionamenti del sito vanno indirizzate a [webmaster@soc.chim.it](mailto:webmaster@soc.chim.it)

Se entro 24 ore la segnalazione non riceve risposta dal webmaster si prega di reindirizzare la segnalazione al coordinatore WEB [giorgio.cevasco@unige.it](mailto:giorgio.cevasco@unige.it)

#### *Redazione "La Chimica e l'Industria"*

*Organo ufficiale della Società Chimica Italiana*

Anna Simonini

P.le R. Morandi, 2 - 20121 Milano

Tel. +39 345 0478088

E-mail: [anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)