



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Dipartimento di Scienze Chimiche

**CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA**

Network Polimerici a Base di Acido Tannico e Loro Applicazioni

RELATORE: Prof. Edmondo Maria Benetti

LAUREANDO: Daniele Bavaresco

MATRICOLA:2018086

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

# Indice

## Capitolo 1: introduzione

- 1.1 Composizione e classificazione dei polifenoli .....3
- 1.2 **Utilizzo dei polifenoli in natura**.....4

## Capitolo 2: l'acido tannico

- 2.1 Struttura.....4
- 2.2 Proprietà.....5
- 2.3 Legami non covalenti intermolecolari dell'acido tannico.....6

## Capitolo 3: Reazioni di reticolazione chimica dell'acido tannico

- 3.1 Reazione di Michael e Schiff tra fenoli e ammine.....8
- 3.2 Addizione di Michael tra fenolo e tiolo.....8
- 3.3 Reazione tra fenolo ed epossido.....9
- 3.4 Reazione di condensazione tra silanolo e fenolo.....9
- 3.5 Reazione di reticolazione tra acido borico e fenolo.....9
- 3.6 Reazione di Mitsunobu (fenolo/alcool) .....9
- 3.7 Reazione di reticolazione tra fenolo e aldeide.....10
- 3.8 Reazione di reticolazione tramite acilazione di polifenoli.....10
- 3.9 Reticolazione tra radicale tiolico e polifenolo.....10

## Capitolo 4: Applicazioni mediche di materiali derivanti da polifenoli

- 4.1 Bioadesivi a base di acido tannico, gelatina e argento nitrato.....11
- 4.2 Particelle emostatiche.....13
- 4.3 Ricostruzione delle ossa.....15
- 4.4 Sintesi di trasportatori di farmaci reversibili, usando l'acido tannico.....17

## CAPITOLO 5: Conclusioni

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 Composizione e classificazione dei polifenoli

I composti polifenolici sono una classe di composti estremamente presente in natura, infatti vengono prodotti esclusivamente dalle piante. Questi composti li possiamo trovare in frutta, ortaggi, semi, fiori e all'interno della corteccia degli alberi.

Finora sono stati estratti e identificati all'incirca 8/9 mila polifenoli, le loro strutture sono estremamente complesse e diversificate.

Solitamente i polifenoli presentano uno o più anelli aromatici e uno o più gruppi ossidrilici legati a un anello aromatico, queste caratteristiche conferiscono ai polifenoli una grande attività biologica. (1)

I polifenoli possono essere classificati in funzione del numero di unità fenoliche che contengono e sulla base degli elementi strutturali che collegano tra loro i vari anelli aromatici. Esistono 4 classi: acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni e lignine (2) (figura 1)

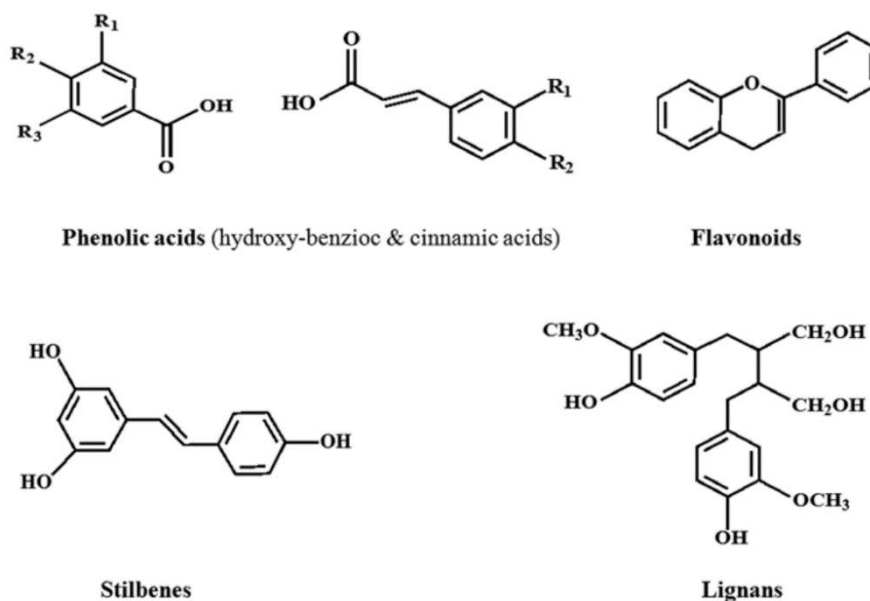


Figura 1 nella figura è possibile vedere le varie strutture delle 4 classi di polifenoli: acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni e lignine caratterizzate tutte da anelli aromatici e gruppi ossidrilici

Un altro metodo per classificare i polifenoli è osservando il numero di gruppi ossidrilici legati ai gruppi terminali aromatici (figura 2). Infatti, possono essere distinte tre categorie:

- I fenoli, contengono un solo gruppo ossidrilico sullo stesso anello aromatico. Un amminoacido componente di questa categoria è la tirosina,
- i catecoli, che contengono due gruppi ossidrilici sullo stesso anello aromatico, un esempio di questa classe è la dopamina,
- I galloli che presentano invece tre gruppi ossidrilici sullo stesso anello aromatico, un esempio di questa categoria è l'acido gallico (3)

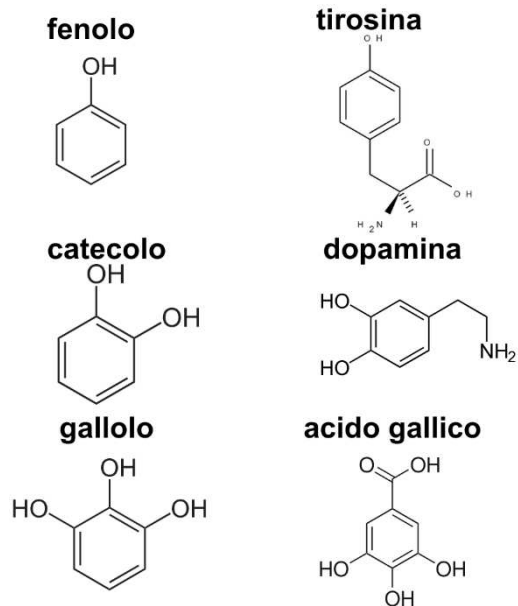


Figura 2 si osserva la classificazione secondo il numero di gruppi ossidrilici legati all'anello aromatico

## 1.2 Utilizzo dei polifenoli in natura

I benefici dei polifenoli per la nostra salute sono tantissimi, ma quello universalmente riconosciuto è la loro capacità di contrastare i radicali liberi, ossia quelle molecole dannose per il nostro metabolismo. I polifenoli, infatti, sono dei potentissimi antiossidanti in grado di prevenire i danni cellulari. Inoltre svolgendo anche un'azione antinfiammatoria.

Ma perché la maggior parte delle specie vegetali producono i polifenoli?

Principalmente per proteggersi: senza i polifenoli, infatti, le piante e gli alberi non sarebbero in grado di difendersi dagli attacchi esterni di agenti patogeni e dallo stress ossidativo provocato, ad esempio, dai raggi UV. I polifenoli sono quelle molecole responsabili del colore dei vegetali, i colori vivaci dei frutti sono una loro caratteristica indispensabile che li rende appetibili sia per l'uomo che per gli animali, facilitando la dispersione dei loro semi ed assicurandone la riproduzione. (4)

## CAPITOLO 2 L'acido tannico

### 2.1 Struttura

L'acido tannico è il composto naturale più presente in natura dopo la cellulosa, l'emicellulosa e la lignina.

Viene utilizzato come agente tanninico nelle pelli, come rivestimento oppure come adesivo.

La struttura dell'acido tannico è caratterizzata da una molecola di glucosio condensata con cinque molecole di acido digallico. Ogni molecola di acido digallico è stata sintetizzata per esterificazione di due molecole di acido gallico, questo genera una struttura che presenta molti gruppi ossidrilici. La molecola presenta molti terminali gallolici o catecolici quindi con rispettivamente 3 o 2 terminali ossidrilici legati a un anello aromatico (5)

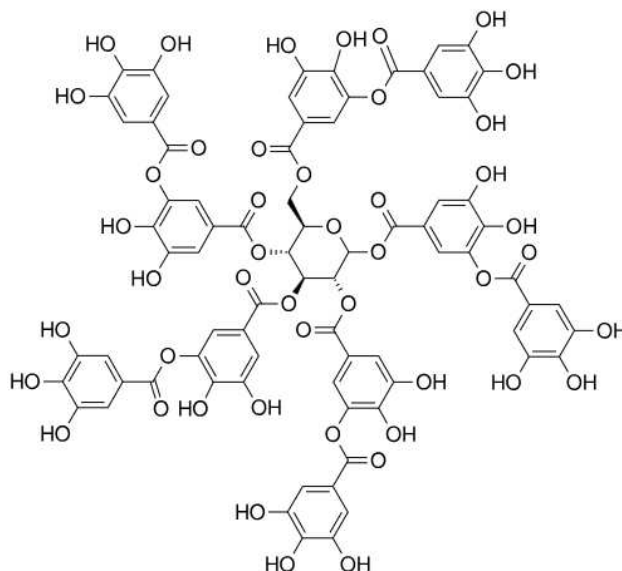


Figura 3 struttura chimica dell'acido tannico

## 2.2 Proprietà

La sua struttura e la grande presenza di gruppi ossidrilici presenti nell'acido tannico conferiscono alla molecola molte proprietà e caratteristiche utili per l'applicazione tecnologica nella fabbricazione di nuovi materiali. Le proprietà principali sono le seguenti:

- una solubilità in acqua molto elevata (300 g/L), che permette modificazioni chimiche tramite metodologie "green" in ambiente acquoso, e permette uno stoccaggio in laboratorio sottoforma di soluzione che può durare anche per più di 30 giorni.
- La biocompatibilità, come già detto l'acido tannico è un polifenolo naturale, poco costoso, facilmente reperibile e generalmente biocompatibile. Inoltre, è idrolizzabile e biodegradabile (importante è la rottura del legame estereo tra due pirogalloli)
- Adesivo universale, grazie alla numerosità di gruppi ossidrilici riesce a formare innumerevoli legami con superfici proteiche, infatti sono molte le reazioni che portano alla formazione di legami intermolecolari
- La proprietà di chelazione metallica, i gruppi ossidrilici permettono di formare complessi con metalli, portando alla formazione di network fenolico metallico, inoltre sono in grado di complessare e stabilizzare nanoparticelle di metalli.
- Coniugazione supermolecolare tra acido tannico e polimeri, infatti l'acido tannico riesce a interagire con biomacromolecole, come collagene, gelatina, seta e albumina tramite interazioni supramolecolari covalenti intramolecolari o interazioni intermolecolari

- f) Utilizzi clinici: l'acido tannico è riconosciuto come antimicrobico e antiossidante, i suoi gruppi terminali ossidrilici possono reagire con composti ossidanti (formando chinoni) oppure possono ricombinarsi con i radicali liberi, diminuendo così la loro concentrazione
- g) Assorbitore di raggi UV, è un ottimo assorbitore di raggi UV, (5)

Grazie alle sue caratteristiche poli ossidriliche, l'acido tannico risulta essere un ottimo reticolante, cioè un "ponte" che permette il legame tra due diverse catene polimeriche andando così ad aumentare il numero di reticolazioni e modificare le caratteristiche del polimero, infatti, è in grado di legarsi tramite molteplici siti di legame, includendo legami idrogeno, legami ionici e  $\pi$ - $\pi$  stacking.

### 2.3 Legami non covalenti intermolecolari dell'acido tannico

La presenza delle funzionalità permette all'acido tannico di formare reticolazioni tramite legami non covalenti. I legami non covalenti che l'acido tannico è in grado di formare sono: legami idrogeno,  $\pi$ - $\pi$  stacking, e network fenolico metallico

#### a) Legami a idrogeno

I legami a idrogeno sono una delle più importanti interazioni che permettono l'adesione dei polifenoli a diverse superfici; infatti, la presenza dei gruppi fenolici permette l'adesione a molecole contenenti gruppi carbossilici, gruppi ossidrilici, gruppi amminici o eterocicli contenenti azoto. La presenza dei gruppi catecolo e gallolo sulla superficie dell'acido tannico permette la formazione di legami a idrogeno più forti (infatti si formano tre siti di legame), garantendo una capacità adesiva anche in sistemi acquosi. (Figura 4)

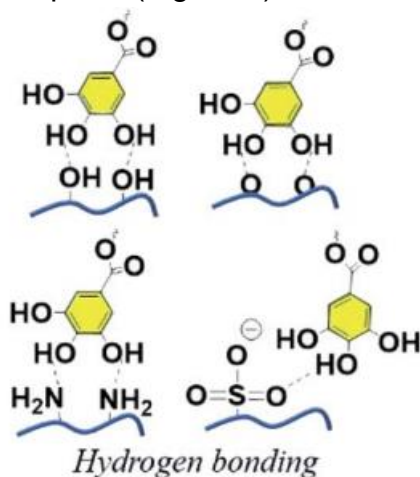


Figura 4 la formazione del legame idrogeno tra i diversi terminali proteici e l'acido tannico

Polimeri naturali come gelatine, collagene o anche polimeri sintetici riescono a reticolare per reazione con l'acido tannico attraverso legami idrogeno. E' importante considerare la dipendenza del legame a idrogeno dal pH, infatti può influenzare le proprietà meccaniche e la stabilità del sistema di reticolazione. In condizioni acide i gruppi fenolici sono protonati, perciò risultano essere dei migliori donatori di legami a idrogeno, in condizioni neutre invece sono ionizzati generando la dissociazione

dei legami idrogeno tra acido tannico e accettori di legami a idrogeno. Aumentando ancora il pH viene generata un'instabilità del complesso polimero/acido tannico, che porta all'ossidazione dei gruppi fenolici a chinone.

### b) $\pi$ - $\pi$ stacking

Queste interazioni sono caratteristiche della presenza di anelli aromatici; infatti, gli orbitali  $\pi$  tendono a formare delle interazioni tra loro. (Figura 5)

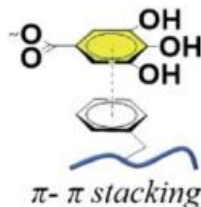


Figura 5 dimostrazione della formazione dell'interazione  $\pi$  tra l'acido tannico e un terminale aromatico

Gli anelli aromatici presenti nella struttura dell'acido tannico interagiscono con altre molecole che contengono anelli aromatici attraverso la formazione di legami intermolecolari di  $\pi$ - $\pi$  stacking. Questo accoppiamento può essere sfruttato per depositare dei nanofogli di grafene su composti biologici come la pelle. I terminali gallici e catecolici dell'acido tannico legano alla pelle mentre l'anello aromatico attraverso le interazioni di  $\pi$ - $\pi$  stacking lega al grafene.

Un'applicazione di questa capacità dell'acido tannico di legarsi al grafene è stata studiata da Liu et al. che svilupparono un nuovo idrogel a base di chitina rinforzato da acido tannico modificato, questo idrogel addizionato con nanofogli di grafene risulta avere una notevole capacità di assorbimento del rosso Congo, questo composto viene utilizzato per la depurazione delle acque (Figura 6)

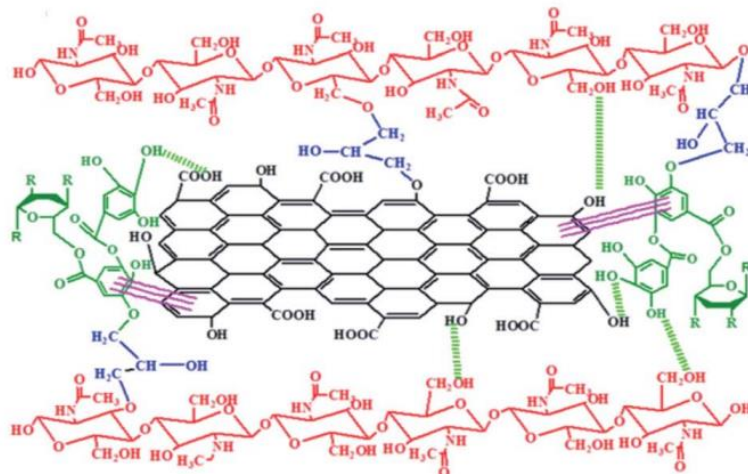


Figura 6 possiamo vedere il complesso sintetizzato da Liu et al. per l'assorbimento del Rosso congo, in violetto sono dimostrati le interazioni di stacking pigreco/pigreco

### c) network fenolico metallico (MPN)

Una delle capacità dell'acido tannico è la sua capacità di complessare atomi metallici. Gli ioni metallici possono fungere loro stessi da reticolanti, e portare alla formazione di network polifenolici mediati da ioni metallici. (figura 7)

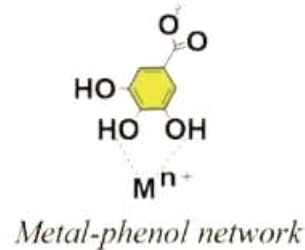


Figura 7 dimostrazione della formazione dell'interazione tra ione metallico e polifenolo

Molte sono state le applicazioni e le attenzioni a questo materiale, legate alle diverse proprietà di questo network. Infatti, il network risulta sensibile a variazioni di temperatura e pH derivato dalla natura dinamica dei legami di coordinazione. La densità delle reticolazioni può essere controllata variando il rapporto metallo/polifenolo.

Comunque, la reticolazione tra acido tannico e polimeri risulta essere complicata, dato che la soluzione che si forma tende a spostarsi verso una parziale coacervazione, anziché portare alla formazione di un materiale omogeneo.

## CAPITOLO 3 Reazioni di reticolazione chimica dell'acido tannico

L'acido tannico risulta essere un ottimo reticolante, grazie ai suoi innumerevoli gruppi fenolici, che possono essere sfruttati anche per la formazione di reticolazioni chimiche attraverso la formazione di legami covalenti.

### 1. Reazione di Michael e Schiff tra fenoli e ammine

Questa è una reazione che permette la formazione di una reticolazione tra fenoli e ammine, la reazione avviene in ambiente leggermente basico, ma il meccanismo con il quale avviene la reazione, non è ancora del tutto chiaro. Un lavoro riportato da Qiu et al. suggerisce che l'addizione di Michael avviene in condizioni anaerobiche o in condizioni lievemente basiche, infatti in presenza di un ossidante, l'acido tannico, può venir ossidato portando alla formazione di una struttura chinonica, in grado di reagire con un'ammina favorendo la reazione di Shiffs. (figura 8)

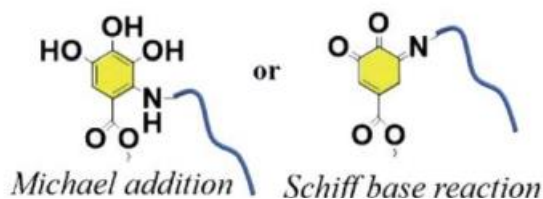


Figura 8 dimostrazione del legame polifenolo ammina attraverso addizione di Michael (sinistra) e reazione di Schiff (destra)



L'acido tannico viene usato come reticolante in polimeri amminici e risulta essere un ottimo sostituto alla dopamina che utilizzata in bioadesivi cutanei come reticolante generava effetti collaterali a livello neurologico. L'acido tannico viene inoltre addizionato a polimeri naturali come seta o gelatina, andando ad aumentare le proprietà adesive del polimero. (figura 9)

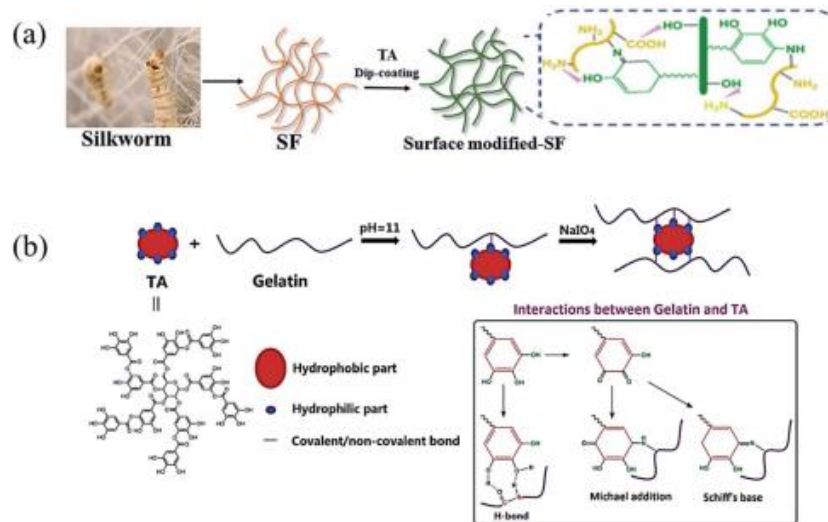


Figura 9 dimostrazione della formazione di reticolazioni nella seta e nella gelatina, in entrambi i casi l'acido tannico reagisce con i terminali amminici proteici della seta (a) o della gelatina (b)

## 2. Addizione di Michael tra fenolo e tiolo

La reazione è del tutto analoga alla reazione con un'ammina, la reazione di Michael tra tiolo e fenolo viene spesso utilizzata per portare alla sintesi di ricoprimenti antivegetativi del tutto naturali. (figura 10)

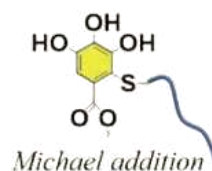


Figura 10 dimostrazione reazione tra fenolo e tiolo

## 3. Reazione tra fenolo ed epossido

I gruppi ossidrilici presenti nell'acido tannico riescono a reagire con l'anello epossidico portando alla sua apertura, rendendo così l'acido tannico una sostanza indurente per resine epossidiche (figura 11). Alcune ricerche hanno definito che i gruppi ossidrilici dello strato interno (gruppi ossidrilici appartenenti ai catecoli dell'acido tannico) risultano essere meno reattivi rispetto ai gruppi dello strato esterno appartenenti al gallolo. Questa differente reattività è legata principalmente dovuto a motivi sterici.

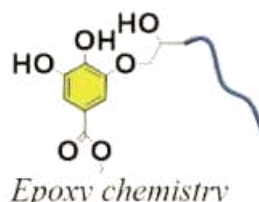


Figura 11 dimostrazione formazione del legame tra fenolo ed epossido

#### 4. Reazione di condensazione tra silanolo e fenolo

I gruppi fenolici dell'acido tannico possono anche reagire con i terminali silanologici di polimeri siliconici, come è possibile osservare in figura 12. La reazione avviene in due fasi: una prima fase di idrolisi dei precursori silani e silossani in acqua con formazione dei silanoli, che reagiscono nella seconda fase con i polifenoli dell'acido tannico. La reazione avviene in condizioni basiche deboli. In passato veniva utilizzata per produrre polimeri organici/inorganici super idrofili.

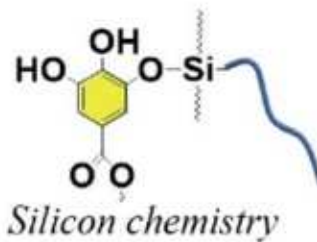


Figura 1 dimostrazione formazione del legame tra fenolo e silanolo

#### 5. Reazione di reticolazione tra acido borico e fenolo

In questo caso avviene una reazione di esterificazione tra i gruppi ossidrilici dell'acido borico e i gruppi ossidrilici in cis (1,2 oppure 1,3) dell'acido tannico, portando alla formazione di una reticolazione (figura 13). Questa reticolazione è reversibile in ambiente acido, ma stabile in condizioni fisiologiche, con quasi nessun effetto collaterale. Come già detto risulta essere dipendente dal pH, perciò, è possibile costruire delle strutture o delle capsule in grado di disgregarsi a ben definiti valori di pH, strutture utili per la costruzione di carrier antitumorali

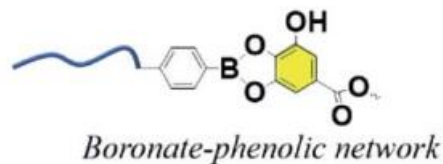
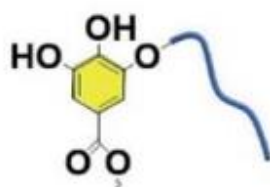


Figura 2 dimostrazione formazione del legame tra fenolo e acido borico

## 6. Reazione di Mitsunobu (fenolo/alcool)

Questa è una semplice reazione di disidratazione e avviene spesso tra un alcool primario o secondario e un pro-nucleofilo acido (una sostanza che una volta perso l'idrogeno diventa un buon nucleofilo (NuH)) (figura 14). L'acido tannico con una  $pK_a=10$  può essere definito un pronucleofilo acido e un ottimo reticolante, la reazione viene catalizzata in presenza di composti trialchilici, o di triarilfosfine ( $PPh_3$ )



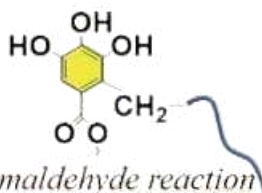
*Mitsunobu reaction*

Figura 3 dimostrazione formazione del legame tra fenolo e alcool (reazione di Mitsunobu)

## 7. Reazione di reticolazione tra fenolo e aldeide

Possiamo svolgere una reazione di polimerizzazione tra acido tannico e formaldeide, formando una resina fenolica.

La reazione avviene per attacco nucleofilo del gruppo fenolico del polifenolo al carbonio carbonilico dell'aldeide in questione (figura 15). Wei et al. Scoprirono un metodo per la formazione di microsfeere a diametro uniforme utilizzando come monomeri acido tannico e formaldeide

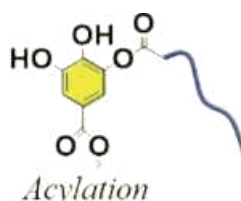


*Phenol-formaldehyde reaction*

Figura 4 dimostrazione formazione del legame tra fenolo e aldeide

## 8. Reazione di reticolazione tramite acilazione di polifenoli

Il processo di acilazione incorpora una fase di attivazione dei gruppi acidi appartenenti a un polimero o a un monomero attraverso un catalizzatore, oppure attraverso riscaldamento continuo. E una seconda fase di disidratazione, tra il gruppo acido attivato e il gruppo ossidrilico con formazione del legame e della reticolazione (figura 16).



*Acylation*

Figura 16 dimostrazione formazione del legame di acilazione al fenolo

## 9. Reticolazione tra radicale tiolico e polifenolo

La reazione del polifenolo con radicale tiolico porta a una riduzione della sua attività, i radicali vengono prodotti principalmente da biomacromolecole sotto raggi UV o alte temperature (figura 17). Queste reazioni portano poi alla formazione di nuovi composti stabili.

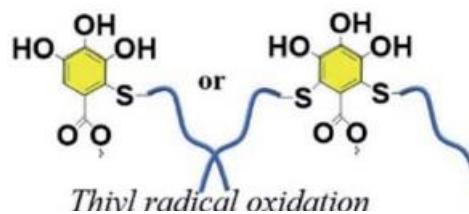


Figura 5 dimostrazione formazione del legame tra fenolo e radicale tiolo

## CAPITOLO 4. applicazioni mediche

Sfruttando la reattività dell'acido tannico è possibile andare a sintetizzare nuovi composti utili per l'applicazione medica.

### 4.1 Bioadesivi a base di acido tannico, gelatina e argento nitrato

Le suture adesive giocano un ruolo molto importante in chirurgia e nell'ambito medico per migliorare e aiutare la chiusura di ferite aperte. I bioadesivi già in commercio però dimostrano una debole adesione in ambiente acquoso, o posseggono una scarsa biocompatibilità.

In tempi recenti sono stati sviluppati degli adesivi in grado di legare la pelle ispirati alla struttura molecolare delle sostanze naturali che permettono il legame dei mitilidi sott'acqua. Lo sviluppo di questi composti ha portato alla produzione di sostanze in grado di legarsi alla pelle anche in ambienti acquosi. (6)

Questa tipologia di adesivi aveva però un problema, per andare a riprodurre l'effetto adesivo dei mitilidi si usava come monomero, la dopamina. La polidopamina, infatti, dimostrava delle ottime caratteristiche adesive in immersione, ma portava a effetti collaterali a livello neurologico, questo impediva il suo utilizzo in ambito medico (7) Esistono anche altre tipologie di adesivi biologici, non ispirati alla dopamina, ma i costi proibitivi rendono questi composti, che presentano una funzione catecolica, impossibili da commercializzare.

L'acido tannico presenta delle importanti caratteristiche che lo rendono un composto chiave nella sintesi di bioadesivi:

- Presenta diversi siti funzionali, dove è possibile formare dei legami
- Riesce a formare interazioni covalenti con i gruppi amminici dei peptidi
- I terminali pirrogallici quando vengono ossidati, possono legarsi chimicamente al tessuto, garantendo forti proprietà adesive alla pelle
- Presenta attività antiossidante e antimicrobica (6)

Uno dei problemi dell'acido tannico è che preferisce la coacervazione alla formazione di un network esteso.

La coacervazione complessa è un processo che avviene in un sistema trifasico costituito da solvente, il principio attivo e il ricoprimento. Il processo segue quattro fasi:

- Preparazione di una soluzione acquosa e una idrofobica di due o più polimeri,
- Mescolare la fase idrofobica con la soluzione acquosa
- Cambiare il pH e la temperatura per indurre la coacervazione e la separazione di fase
- Indurire il polimero usando elevate temperature e agenti desolvatanti

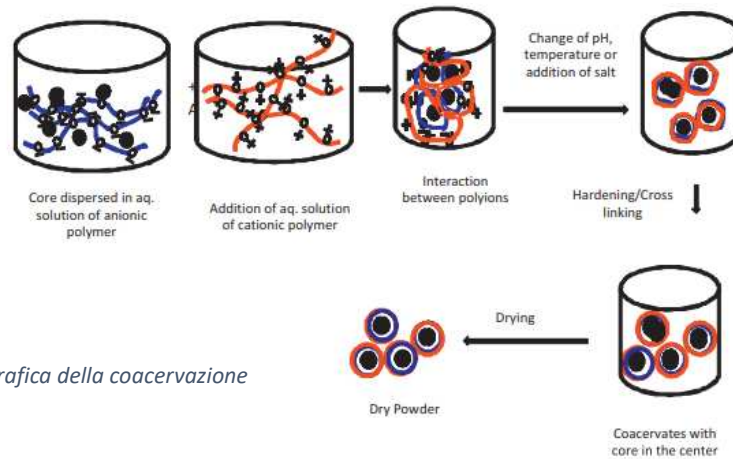
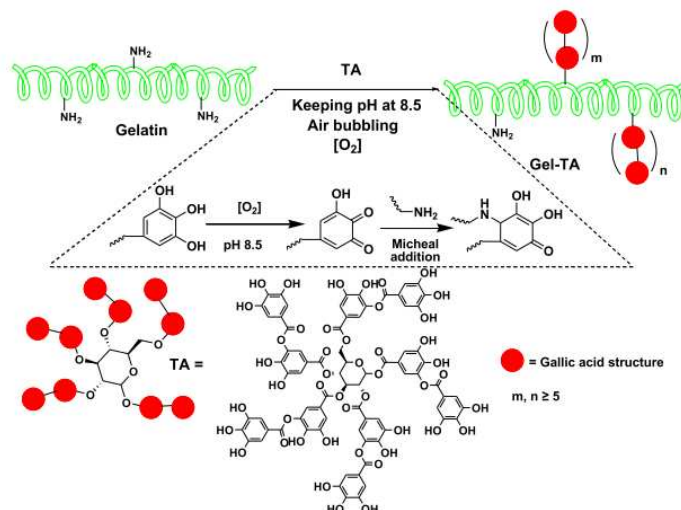


Figura 6 dimostrazione grafica della coacervazione

In soluzione abbiamo la formazione di capsule costituite da un rivestimento esterno con all'interno il principio attivo. Il processo è portato avanti da un equilibrio di fase, non appena variamo pH o  $T^\circ$  l'equilibrio si sposta verso un sistema bifasico. (8)(7)

Evitando la coacervazione è possibile preparare dei bioadesivi attraverso una addizione di Michael. Lavorando in condizioni ossidanti, può essere sintetizzata una gelatina modificata con acido tannico. La reazione viene svolta a  $60^\circ\text{C}$  a  $\text{pH}=8.5$ , costante durante la reazione, insufflando sempre nell'ambiente di reazione ossigeno. Poco alla volta viene aggiunto l'acido tannico alla soluzione contenente la gelatina.

In figura è possibile osservare il meccanismo di reazione. I terminali gallolici vengono ossidati a chinone in condizioni aerobiche basiche, dopo di che il carbonio in beta risulta essere un ottimo centro elettrofilo che viene attaccato dal terminale amminico proteico portando così alla formazione del legame reticolante (addizione di Michael)



Una volta preparata la gelatina modificata con l'acido tannico, questa viene fatta reagire (sul substrato sulla quale deve essere depositato l'adesivo) con del nitrato di argento. Il nitrato di argento è in grado di complessare con l'acido tannico, portando alla formazione di reticolazioni secondarie. L'argento nitrato viene utilizzato anche per le sue proprietà antibatteriche e per la sua compatibilità a formare complessi con i terminali gallolici.

Quindi come è possibile vedere in figura 20 l'acido tannico legherà al tessuto epidermico attraverso legami chimici (quindi reazioni di addizione di Michael e reazione di Schiff), o attraverso la formazione di legami idrogeno, mentre all'interno dell'adesivo avremo la formazione di una reticolazione per reazione tra acido tannico e argento nitrato, oltre alle reticolazioni covalenti già presenti tra acido tannico e terminali amminici della gelatina

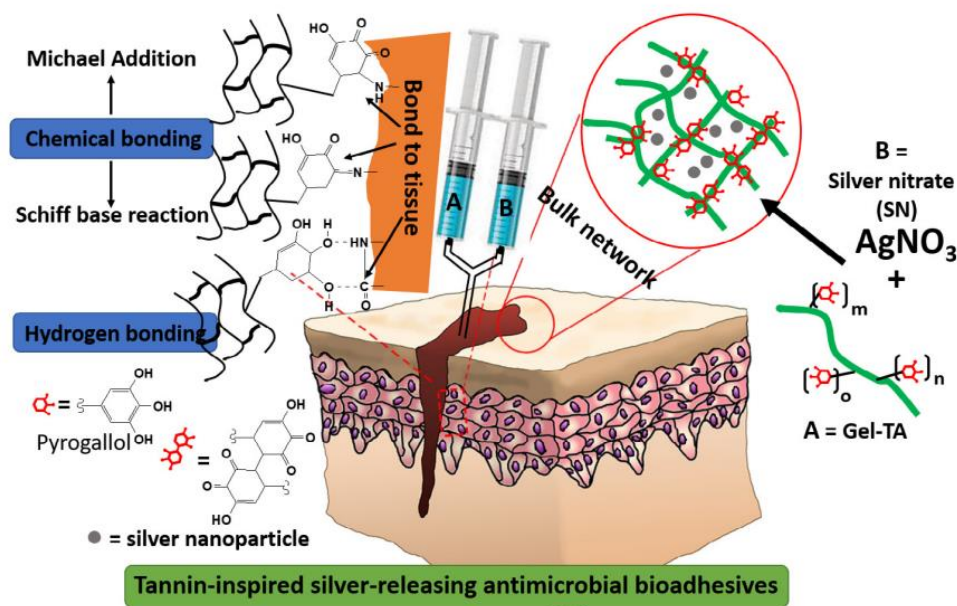


Figura 8 dimostrazione grafica delle varie tipologie di legami che si formano, in particolare in alto a sinistra è possibile osservare i legami covalenti e non covalenti che l'acido tannico crea con il tessuto epiteliale, mentre in alto a destra le reticolazioni tra acido tannico e argento nitrato

## 4.2 Particelle emostatiche

Negli scorsi decenni sono stati sviluppati numerosi prodotti emostatici per la chirurgia. Una sostanza emostatica è una sostanza in grado di fermare il sangue dovuto a una ferita o un'emorragia.

Nel caso di ferite irregolari, i punti di sutura, o altri metodi non sono efficaci per fermare il sanguinamento, si possono però utilizzare in aggiunta le emosfere microporose polisaccaridiche, queste microparticelle riescono a legare alle proteine andando a fermare le emorragie. Purtroppo, però durante la preparazione di queste microsfeere, venivano utilizzati dei reticolanti come epicheloidrina o polifosfati che risultano essere dannosi per la salute; infatti, potevano rimanere tracce dei solventi utilizzati o dei reticolanti, che sono citotossici.

Un ottimo sostituto reticolante per poter sintetizzare le microsfeere è l'acido tannico, che risulta essere anche un ottimo adesivo, infatti, l'acido tannico lega fortemente al terminale amminico presente nelle proteine.

Un primo tentativo fu quello di sintetizzare un composto utilizzabile come bioadesivo. Le proprietà antiinfiammatorie e antibatteriche furono efficaci, ma i procedimenti di sintesi erano tediosi e lunghi, questo fu il principale problema che limitò la sintesi di nuovi composti. Perciò l'opzione più efficace fu quella di partire da composti antibatterici naturali noti. Si utilizzarono acido tannico, acido ialuronico, chitosano carbossimetilato, collagene e alginato.

Le microparticelle emostatiche multifunzionali vengono preparate attraverso un'emulsione inversa dove all'interno sono contenuti tutti i reagenti, in questo caso acido tannico, acido ialuronico, chitosano carbossimetilato e collagene. All'interno di questa soluzione si andranno poi a formare i legami chimici per portare alla reticolazione, infatti, i gruppi terminali ossidrilici dell'acido tannico e i terminali amminici dei polimeri proteici reagiscono tra loro formando reticolazioni, si formano altre tipologie di legami, come legami a idrogeno o interazioni dipolo-dipolo. Una volta formati i legami si formano delle microparticelle attorno all'acido tannico, che possono essere separate e purificate.

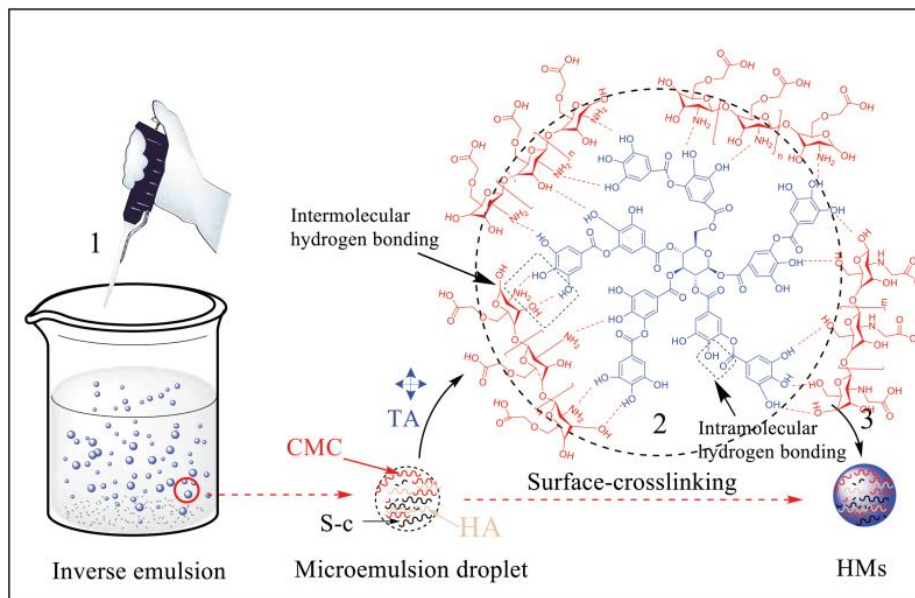


Figura 9 schema della preparazione delle microparticelle emostatiche. dimostrazione dei legami che si formano tra acido tannico e terminali amminici.

Il composto di sintesi una volta applicato sulla ferita porta alla formazione di una reticolazione secondaria tra le microparticelle e la superficie della ferita. Una volta applicate, le microsfeere creano un primo legame con i gruppi amminici presenti nelle proteine, avviene poi l'assorbimento di acqua, con il rilascio di acido tannico, acido ialuronico e il chitosano carbossimetilato, che formeranno un idrogel con le cellule presenti nella ferita. (figura 22)

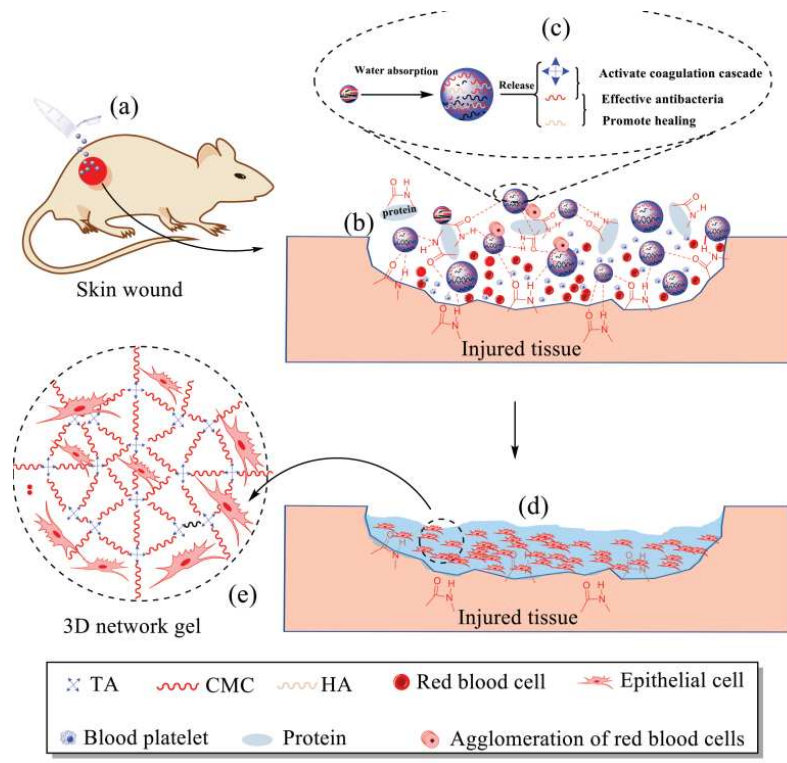


Figura 10 schema dell'interazione di particelle emostatiche in una ferita

### 4.3 Ricostruzione delle ossa

L'acido tannico e la sua capacità di svolgere reticolazioni possono essere utilizzati anche nella cura e ricostruzione delle ossa. Per risolvere malfunzioni ossee legate a incidenti stradali, difetti alla nascita o infortuni. I metodi convenzionali come placche metalliche e viti possono portare a reazioni di rigetto del materiale estraneo e una seconda operazione per rimuoverlo.

Esistono già alcuni adesivi, come il poli(metilmetacrilato) (PMMA) e il calcio fosfato (CP) utilizzati come cementi per le ossa, questi composti creano un'alternativa più personalizzata alla riparazione delle ossa. Anche se vengono già utilizzati, presentano dei difetti, come citotossicità, durezza meccanica inappropriata, un povero legame e spesso non si ha una completa guarigione. Per esempio, PMMA causa necrosi termiche e chimiche (necrosi: complesso di alterazioni strutturali irreversibili dovute a cause di diversissima natura, che comportano la perdita di ogni vitalità ossia la morte di gruppi cellulari, o zone di tessuto (10)). Possono essere



presenti all'interno del polimero alcuni monomeri tossici per l'organismo. Invece il CP è associato a deboli proprietà meccaniche e presenta la tendenza a collassare facilmente quando esposto ai fluidi corporei

Serve perciò sviluppare un nuovo adesivo per ossa biocompatibile, con ottime prestazioni di adesione anche in ambienti umidii. Sarebbe ideale la sintesi di un composto in grado di promuovere la rigenerazione delle ossa.

Nell'osso umano la rigenerazione delle ossa avviene attraverso la deposizione di nano cristalli di idrossiapatite (HA) sulle nano fibre di collagene organico e assemblati in un'organizzazione gerarchica, in cui le proteine non collagene e i proteoglicani fungono da molecole di colla per tenere insieme le nano fibre mineralizzate.

La presenza di molecole di colla fornisce un meccanismo di dissipazione dell'energia in cui si formano legami sacrificali mediati dal calcio atti contrastare la formazione di crepe, che assicura un'unica combinazione di elevata resistenza meccanica e tenacità in ambienti biologici.

L'idrossiapatite (figura 23) è un minerale di fosfato di calcio, con formula chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , e compone circa il 65% delle ossa, rendendolo una appetibile opzione per un composto sintetico utile alla rigenerazione delle ossa. (11-12)

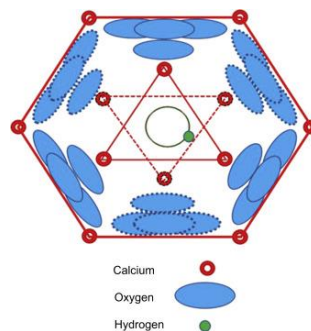
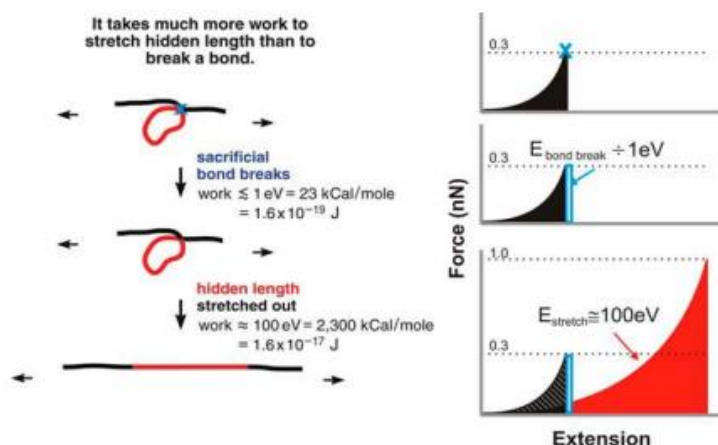


Figura 11 schema dei legami presenti nell'idrossiapatite

Una cosa simile avviene anche nella madreperla, dove nano grani di aragonite inorganica sono incollati assieme attraverso proteine e polisaccaridi, che portano alla formazione di strutture ben definite con sempre la presenza di legami sacrificali. In figura è possibile osservare un esempio di un principio base di legame sacrificale. Prima che il legame sacrificale venga rotto, solo la parte nera della molecola contribuisce alla formazione di legami, una volta raggiunta l'energia per permettere la rottura del legame anche la parte rossa contribuisce alla formazione di nuovi legami, aumentando così l'entropia della molecola. Questo è solo un esempio semplice, ma ne esistono molti altri. (13)

Figura 12 schema rottura legame sacrificale per liberazione di una seconda parte di molecola



Ispirandosi a questi meccanismi inorganici legati da composti organici, in presenza di legami sacrificali, si è cercato di sintetizzare dei collanti ispirati al mondo naturale. Sono stati perciò studiati i composti fenolici, come potenziali molecole collanti, grazie anche alla presenza di numerosi legami sacrificali. In questo studio viene proposto un sistema utile alla ricostruzione delle ossa utilizzando acido tannico, come collante e assemblante spontaneo con le fibre della seta e l'idrossiapatite. La seta è una proteina naturale che ha attratto attenzione nelle applicazioni mediche, grazie alla sua biocompatibilità, a una biodegradazione controllata e a una grande forza meccanica.

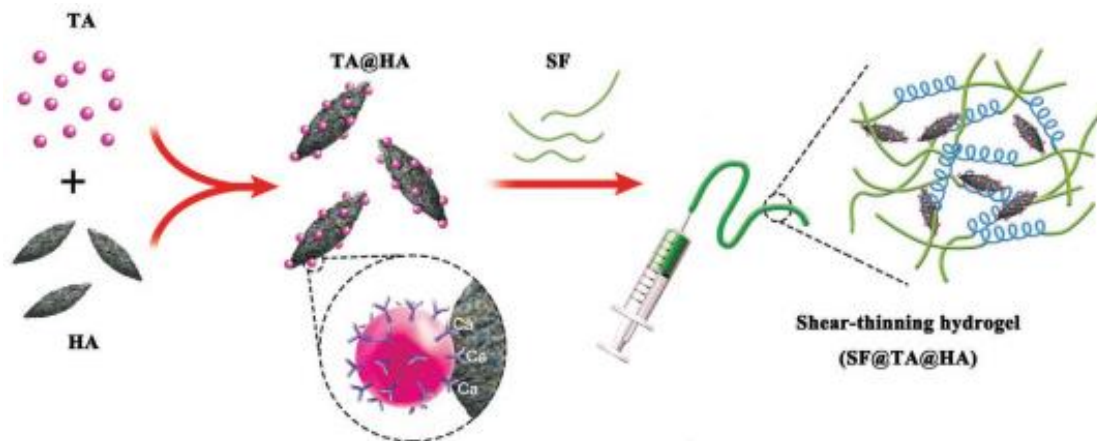


Figura 13 schema rappresentativo della formazione dei legami tra acido tannico e idrossiapatite e poi con le fibre di seta

L'acido tannico induce un arrangiamento molecolare con la seta e l'idrossiapatite, che porta alla formazione di un idrogel ibrido inorganico/organico. L'acido tannico interagisce con la seta, per formare una struttura ricca di conformazioni foglietto beta, mentre il  $\text{Ca}^{2+}$  si lega attraverso legami coordinativi all'acido tannico, permettendo così la formazione di un legame con l'idrossiapatite. Questo meccanismo di legame contribuisce a un'augmentata durezza dell'idrogel, incrementando l'ammontare dell'energia dissipata, come risultato otteniamo una forte adesione in ambienti biologici bagnati.

La preparazione prevede inizialmente l'unione dell'idrossiapatite a una soluzione acquosa di acido tannico, ottenendo nanoparticelle di idrossiapatite decorate da acido tannico, dopo di che viene aggiunta una soluzione di fibre di seta, vigorosamente mescolate assieme per permettere la formazione dei legami con l'acido tannico. È possibile osservare come il composto che si ottiene (una gelatina dura) è modulabile, e può essere modellato portando alla formazione di forme diverse.

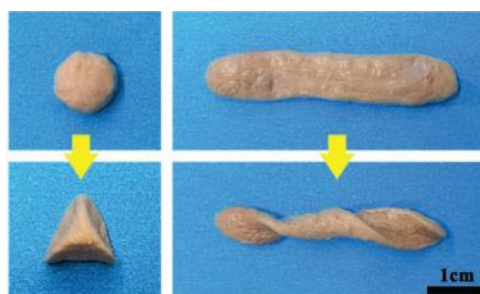


Figura 14 dimostrazione della modellazione del composto costituito da acido tannico idrossiapatite e fibre di seta

Alcuni modelli ossei hanno dimostrato che le singole fibrille di collagene presenti nelle ossa, sono tenute assieme da filamenti di colla. Quando viene applicata una forza, i filamenti di colla vengono tirati per resistere alla separazione delle fibrille di collagene mineralizzate. La stessa cosa avviene anche con l'unione della seta, dell'acido tannico e dell'idrossiapatite, come è possibile vedere in figura tramite la microscopia a forza atomica. Queste nanofibrille sono state attribuite al comportamento di auto assemblamento della seta con l'acido tannico (13)

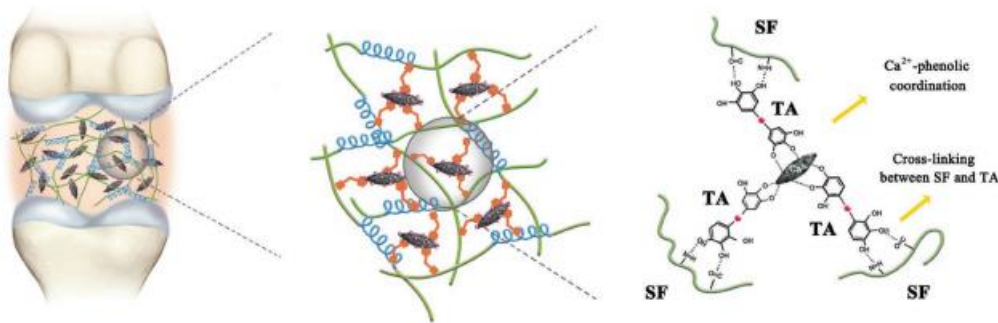


Figura 157 illustrazione schematica che spiega la forza e la robustezza del composto appena sintetizzato

#### 4.4 Sintesi di trasportatori di farmaci reversibili, usando l'acido tannico

Il cancro è la malattia che causa più morti al mondo, tutt'oggi la cura più utilizzata è la chemioterapia, ma alcuni fattori non favorevoli, come citotossicità non specifica e perdite del farmaco durante il trasporto rendono questa tecnica non utilizzabile. Con lo sviluppo delle nanotecnologie in ambito medico però si è riusciti a migliorare il rilascio mirato dei farmaci nei tessuti tumorali. Spesso la liberazione del farmaco è legata a uno stimolo ambientale come pH, riduzione del complesso, la luce o gli enzimi. Tra questi il pH è di sicuro quello più utilizzato, grazie alla sua grande applicabilità dato che il pH nelle cellule tumorali risulta essere più basso (il motivo è dovuto al metabolismo delle cellule tumorali, anche in condizioni aerobiche, la cellula tumorale consuma glucosio portando alla formazione di acido lattico e portando a una diminuzione del pH della cellula).

Perciò molti dei trasportatori di farmaci per la chemioterapia sfruttano come stimolo di rilascio la variazione del pH. Questi nano trasportatori sono raramente reversibili e possono causare dei effetti collaterali secondari, causati dal scarso legame del nano trasportatore con il farmaco in eccesso che andrà ad intaccare gli altri tessuti.

Sarebbe utile la sintesi di un nano trasportatore intelligente, in grado di aprirsi e rilasciare il farmaco quando si presenta all'interno di un tessuto tumorale, e richiudersi quando invece si trova nel tessuto sano.

Si è preso spunto dalla dopamina, che in ambiente alcalino polimerizza formando la polidopamina. Basandosi su questo effetto è possibile dimostrare come tutti i composti che contengono gruppi terminali catecolici e amminici possono svolgere questa tipologia di polimerizzazione, garantendo anche proprietà adesive. Possiamo sintetizzare un sistema binario costituito da acido tannico (gruppo catecolo) e tetraetilenpantanammina (TEPA) (gruppi amminici) in grado di aprirsi e chiudersi in funzione del pH come la dopamina.

Lo studio portato avanti da Chao C. et al. esamina le varie possibilità per sostituire il sistema binario acido tannico/tetraetilenpentanammina al sistema che utilizza dopamina, basandosi su un sistema che sfrutta nanoparticelle porose di silice.

Le nanoparticelle di silice mesoporosa avvolti in poli(acido tannico) sono state sintetizzate attraverso un metodo modificato ispirato ai mitilidi. Prima di tutto, le nanoparticelle di silice mesoporosa (100 mg) vengono disperse con ultrasuoni in una soluzione tamponata. Qui avviene l'unione delle nanoparticelle di silice sferiche con doxorubicina cloridato (composto utilizzato nella chemio terapia che andremo a utilizzare durante questo esperimento). Successivamente aggiungiamo, acido tannico e tetraetilenpentanammina portando alla formazione di un rivestimento attorno alla nano particella estremamente reticolato. Viene poi legato alla superficie esterna l'anticorpo HER2 che porta a una riduzione degli effetti collaterali.

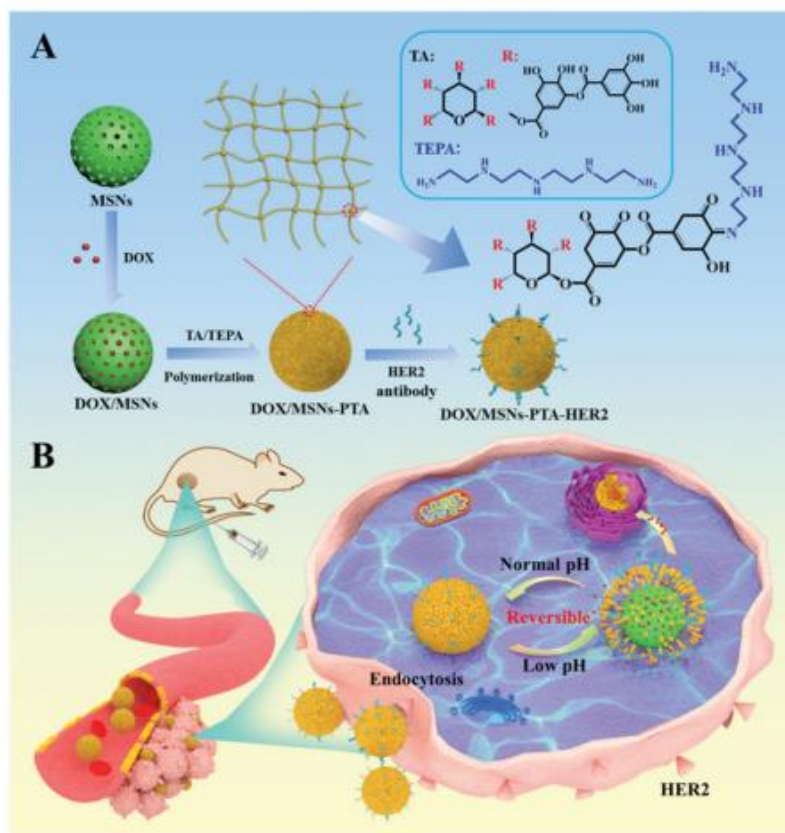


Figura 16 in alto è possibile osservare il meccanismo di reazione della sintesi delle particelle, mentre in basso il meccanismo con il quale il composto è in grado di rilasciare il farmaco dopo variazione del pH

Si è sintetizzato così un sistema in grado di rilasciare farmaci e ricombinarsi in funzione della variazione del pH, come è possibile osservare in figura 26. (15)

Dopo la sintesi sono state misurati i diametri idrodinamici medi (attraverso scattering di luce dinamico) osservando che il diametro idrodinamico medio delle nanoparticelle di silice mesoporose risulta essere più piccolo rispetto alle stesse ricoperte dal sistema acido tannico/TAPE e aumenta ancora nel caso delle nanoparticelle funzionalizzate con l'anticorpo HER2 (figura 29)

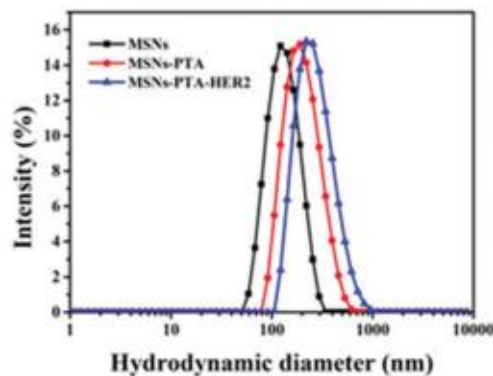


Figura 17 aumento raggio idrodinamico medio

Attraverso un'analisi al FTIR delle nanoparticelle di silice mesoporosa, si è osservato un forte picco di assorbimento a  $1097\text{ cm}^{-1}$  attribuito alla vibrazione del legame Si-O-Si nel silano, se confrontiamo questo grafico con quello delle nanoparticelle ricoperte dal rivestimento di acido tannico e TAPE, osserviamo 2 nuove bande di assorbimento a  $1706$  e  $1599\text{ cm}^{-1}$  caratteristiche delle vibrazioni del gruppo carbonilico e amminico. Questi risultati dimostrano che la modifica è avvenuta con successo.

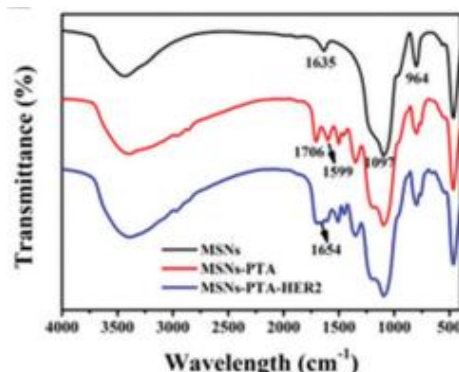


Figura 18 assorbimento IR delle nanosfere di silice porose, e le stesse ricoperte dal rivestimento in acido tannico e TAPE

## CONCLUSIONI

La classe dei polifenoli, in particolar modo l'acido tannico negli ultimi anni sta ricevendo molte attenzioni in ambito scientifico. La sua polifunzionalità di gruppi ossidrilici legata alle sue proprietà antiossidanti lo rendono un composto estremamente versatile, molte sono le ricerche che si stanno svolgendo su questa molecola estremamente biocompatibile e facilmente reperibile. In questa tesi abbiamo studiato inizialmente i polifenoli, le caratteristiche che li accomunano e le varie classificazioni, andando a capire anche da dove provengono. Dopo di che ci siamo concentrati sullo studio dell'acido tannico, dalla sua struttura polifunzionale che lo rende un ottimo candidato come agente reticolante, studiando poi anche le sue proprietà come estremamente solubile, assorbitore di raggi UV, ecc. Abbiamo studiato anche le interazioni intermolecolari che riesce a svolgere e le reazioni di reticolazione chimica. Come abbiamo già detto molte possono essere le applicazioni dell'acido tannico, ma in particolare molto importanti sono le applicazioni a livello medico, dove l'acido tannico può essere utilizzato da reticolante tra diversi polimeri naturali, modificandone le proprietà e sfruttandole in ambito medico. Infatti l'acido tannico può essere utilizzato per la sintesi di bioadesivi, qui viene sfruttata la capacità adesiva alla pelle dell'acido tannico assieme alla capacità di complessare con ioni metallici, per la

sintesi e la fabbricazione di bioadesivi cutanei che aiutino la guarigione e la cicatrizzazione di una ferita, sempre in questo ambito l'acido tannico ha trovato applicazione sempre come reticolante nella sintesi di microparticelle emostatiche, utili per le emorragie causate durante un'incidente stradale per esempio. Sempre sfruttando la capacità reticolante dell'acido tannico nei confronti dei terminali amminici e la sua capacità di complessarsi con ioni, è stato sviluppato un composto costituito da acido tannico, idrossiapatite e fibre setose utili per la ricostruzione delle ossa un'ottima alternativa alle classiche piastre metalliche. Le proprietà reticolanti sono però dipendenti dal pH, questa proprietà può essere sfruttata per sintetizzare composti in grado di trasportare farmaci antitumorali, in grado di aprirsi e chiudersi solo quando si trova in un tessuto tumorale, questo migliora la somministrazione del farmaco che evita la sua distribuzione anche nei tessuti non tumorali evitando così innumerevoli effetti collaterali.

Nel complesso negli ultimi decenni, la chimica del catecolo ispirato all'adesione delle cozze ha aggiunto nuova vita e vigore all'acido tannico, portando alla costruzione di nuovi e vari complessi polimerici. In vista del sorgere di problematiche ambientali legate all'industria petrolchimica l'acido tannico risulta essere un ottimo sostituto reticolante.

Comunque, molti meccanismi che riguardano i meccanismi di associazione e dissociazione dell'acido tannico rimangono tutt'ora non chiari. Vengono svolti molti studi sull'acido tannico, dimostrando che questo campo sta gradualmente crescendo ed espandendosi. I materiali a base di acido tannico continueranno a essere molto interessanti in ambito scientifico, soprattutto nella biomedicina, nella nano-tecnologia, nella catalisi e nell'immagazzinamento di energia.

## RIFERIMENTI

1. Liu, W.C.; Yan, Q.W.; Xia, C.; Wang, X.X.; Kumar, A.; Wang, Y.; Liu, Y.W.; Pan, Y. Recent advances in cell membrane coated metal–organic frameworks (MOFs) for tumor therapy. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 4459–4474
2. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Nov-Dec;2(5):270-8. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498. PMID: 20716914; PMCID: PMC2835915.
3. Choi, H.; Lee, K. Crosslinking Mechanisms of Phenol, Catechol, and Gallol for Synthetic Polyphenols: A Comparative Review. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11626. <https://doi.org/10.3390/app122211626>
4. <https://www.tannins.org/it/polifenoli-a-cosa-servono-dove-si-trovano-e-che-funzione-hanno/>
5. Chen C, Yang H, Yang X, Ma Q (2022) Tannic acid: a crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: a review. *RSC Adv* 12(13):7689–7711. <https://doi.org/10.1039/d1ra07657d>
6. J. Guo, W. Sun, J.P. Kim, X. Lu, Q. Li, M. Lin, O. Mrowczynski, E.B. Rizk, J. Cheng, G. Qian, J. Yang  
Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives  
*Acta Biomater.*, 72 (2018), pp. 35-44
7. <https://www.researchgate.net/publication/316982788> Recent Progress of Mussel-Inspired Underwater Adhesives
8. Noushin Eghbal, Ruplal Choudhary, Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems, *LWT*, Volume 90, 2018, Pages 254-264, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>.
9. Yakindra Prasad Timilsena, Taiwo O. Akanbi, Nauman Khalid, Benu Adhikari, Colin J. Barrow,  
Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 121, 2019, Pages 1276-1286, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>.
10. <https://www.treccani.it/vocabolario/necrosi/>
11. R Z LEGEROS, J P LEGEROS, 16 - Hydroxyapatite, Editor(s): Tadashi Kokubo, In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Bioceramics and their Clinical Applications*, Woodhead Publishing, 2008, Pages 367-394, ISBN 9781845692049, <https://doi.org/10.1533/9781845694227.2.367>.
12. S. Fernando, M. McEnery, S.A. Guelcher,  
16 - Polyurethanes for bone tissue engineering, Editor(s): Stuart L. Cooper, Jianjun Guan, *Advances in Polyurethane Biomaterials*, Woodhead Publishing, 2016, Pages 481-501, ISBN 9780081006146, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100614-6.00016-0>.
13. Georg E. Fantner, Emin Oroudjev, Georg Schitter, Laura S. Golde, Philipp Thurner, Marquesa M. Finch, Patricia Turner, Thomas Gutschmann, Daniel E. Morse, Helen Hansma, Paul K. Hansma, Sacrificial Bonds and Hidden Length: Unraveling Molecular Mesostructures in Tough Materials, *Biophysical Journal*, Volume 90,

Issue 4, 2006, Pages 1411-1418, ISSN 0006-3495,  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069344>.

14. Bai, S.; Zhang, X.; Lv, X.; Zhang, M.; Huang, X.; Shi, Y.; Lu, C.; Song, J.; Yang, H. Bioinspired Mineral–Organic Bone Adhesives for Stable Fracture Fixation and Accelerated Bone Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, 30.
15. F. He, M. C. Han, J. Zhang, Z. X. Wang, X. C. Wu, Y. Y. Zhou, L. F. Jiang, S. Q. Peng and Y. X. Li, *Nano Energy*, 2020, 71, 104650



## RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto ringrazio il mio relatore il prof Edmondo Maria Benetti per avermi aiutato nella stesura della tesi, e alla sua disponibilità nel spiegarmi e chiarirmi alcuni dubbi che sono emersi durante la stesura e durante il corso di studi.

Ringrazio la mia famiglia, in particolare i miei genitori che aiutandomi nelle faccende di tutti i giorni mi hanno permesso di concentrarmi al massimo nel lavoro e nello studio

Ringrazio tutti i miei amici, quelli di vecchia data per avermi regalato momenti di spensieratezza e mi hanno distratto in quei momenti difficili dove l'ultima cosa che volevo fare era continuare a studiare, in particolare Manuel per il mouse,

Ringrazio i compagni/colleghi/amici incontrati nel percorso di studi

Ringrazio i miei attuali colleghi di lavoro presso H.C.I. che mi hanno permesso nell'ultimo anno di studiare e in contemporanea studiare per completare l'ultimo anno di tesi

Ringrazio Christian e Gabriele, colleghi di lavoro nel 2019 presso l'azienda A.M.F. snaps per avermi motivato a iniziare il percorso di studi universitario, senza il vostro incontro probabilmente non sarei qui ora

Ringrazio i nonni Gianna e "Nadain" entusiasti ogni volta dopo la ben riuscita di ogni esame svolto

Ringrazio chiunque abbia passato del tempo assieme a me, regalandomi un'esperienza, un'insegnamento, un attimo di spensieratezza e felicità, fino ai 18 anni non credevo assolutamente possibile riuscire ad arrivare a questo giorno

29/09/2023

Grazie!