

# **Introduzione alla ricerca scientifica universitaria in campo farmaceutico**

In collaborazione con  
il Liceo Scientifico "Luigi Siciliani" di Catanzaro,  
il Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di Scienze  
Neurologiche sezione Farmacologia di Catanzaro  
e la Facoltà di Farmacia dell'Università "Magna Græcia"  
di Catanzaro.

24-25 febbraio e 3-4 marzo 2005

Responsabile del progetto per l'area chimico-farmaceutica:  
Prof. Stefano Alcaro (Facoltà di Farmacia - Università "Magna Græcia" di Catanzaro)  
alcaro@unicz.it

Responsabile del progetto per l'area biologica e farmacologica:  
Dott. Michelangelo Iannone (C.N.R. - I.S.N. sez. Farmacologia di Catanzaro)  
iannone@unicz.it

## ESPERIENZA NEL LABORATORIO CHIMICO-FARMACEUTICO I: ESTRAZIONE DI UN PRINCIPIO ATTIVO

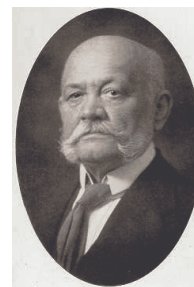


In questa esperienza si procederà con l'estrazione del principio attivo contenuto in una spezia di vostra conoscenza: il pepe nero o meglio il ***Piper nigrum L.***

Per fare questa operazione si userà una vetreria particolare costituita da tre elementi che si assemblano tra loro per dare luogo all'apparecchio inventato da Franz von **Soxhlet** (1848-1926).

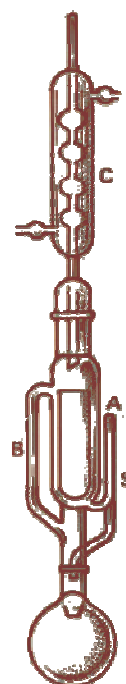
*Chi era costui?*

Se sei interessato alla vita di chimici illustri, come Soxhlet, puoi iniziare consultando il sito internet: [www.minerva.unito.it/Storia/Storia\\_Indice.htm](http://www.minerva.unito.it/Storia/Storia_Indice.htm)



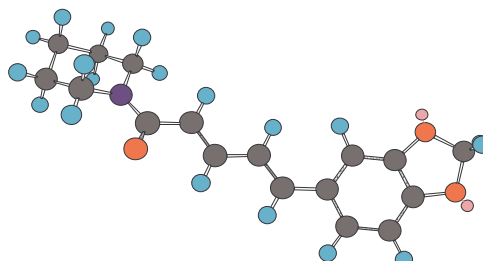
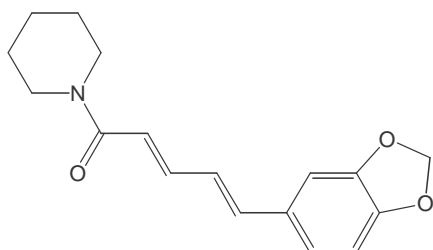
*Come funziona il nostro Soxhlet?*

L'estrazione avviene riscaldando il solvente contenuto nel **matraccio**, dopo aver posto il campione nel ditale filtrante contenuto nell'**estrattore**. I vapori che si sviluppano, salendo lungo il tubo laterale, entrano nel corpo centrale per poi salire nel **refrigerante**. Qui condensano e ricadono allo stato liquido nel ditale, fino a riempire l'estrattore al livello del sifone, attraverso cui il liquido si scaricherà nel matraccio. A questo punto l'estrazione è automatica ed autosufficiente.



*Quale procedura va seguita nell'estrazione?*

1. Costruire i ditali di carta da filtro e introdurre 25 g di pepe nero (*piper nigrum L.*) macinato.
2. Montare sotto cappa l'estrattore di Soxhlet utilizzando 2 pinze di sostegno e collegare i refrigeranti al flusso dell'acqua.
3. Riempire il pallone da 250 ml con 220 ml di  $\text{CHCl}_3$  usando un cilindro graduato.
4. Avviare l'estrazione in continuo per sei ore, verificando che il sifone dell'estrattore funzioni correttamente.
5. Raffreddare la soluzione cloroformica e filtrare per gravità nel caso in cui sia presente del materiale in sospensione.
6. Evaporare la soluzione usando il rotavapor direttamente sul pallone di estrazione.
7. Raccogliere il cloroformio distillato che andrà in un apposita bottiglia.
8. Aggiungere al residuo di colore verde 10 ml di una soluzione di KOH al 10% in etanolo-acqua 1:1.
9. Filtrazione per gravità e la soluzione si pone in frigo a 2-4° per 15 min per favorire la precipitazione.
10. Filtrare i cristalli su Buchner quando la soluzione è ancora fredda e lavarli con acqua.
11. Lavare con etere di petrolio (anidrifcazione) e asciugare sullo stesso filtro sotto vuoto.
12. Pesare, determinare la resa e il punto di fusione della piperina (130-132°C).

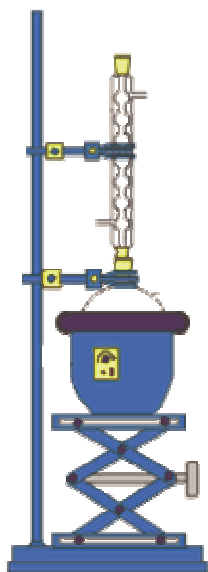


Struttura chimica della piperina: bidimensionale (sinistra) e modello tridimensionale (destra).

*A cosa serve la piperina?*

È in grado di attivare il metabolismo favorendo il consumo di calorie (si vende anche in compresse). In India si usa, come estratto secco, per il trattamento di bronchiti e tradizionalmente per le nevralgie, stimola i recettori termici ed incrementa la secrezione di saliva e mucose gastriche; possiede un effetto antimicrobico e benefico contro i disturbi intestinali e digestivi.

## ESPERIENZA NEL LABORATORIO CHIMICO-FARMACEUTICO II: SINTESI DI UN PRINCIPIO ATTIVO



In questa esperienza si procederà con la sintesi di un principio attivo (acetato di isopentile) facilmente identificabile dal caratteristica odore di banana.



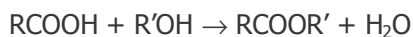
*Come si ottiene l'acetato di isopentile?*

La sintesi chimica verrà condotta attraverso un **reattore a riflusso** costituito dai seguenti elementi schematizzati nella figura a sinistra:

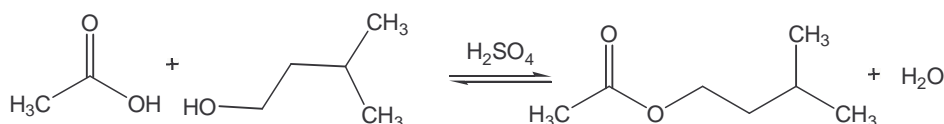
- un pallone a due colli in vetro pyrex da 100 ml
- un refrigerante a ricadere collegato ad un rubinetto di acqua fredda
- un mantello riscaldante o bagno ad olio

*Che tipo di reazione si compie attraverso tale attrezzatura?*

La reazione necessaria alla sintesi del prodotto profumato è una semplice **esterificazione** di Fisher un alcool mediante un acido carbossilico in ambiente fortemente acido, genericamente indicata:

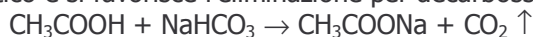


Nel nostro caso l'acido è quello acetico, l'alcool è quello isopentilico e l'acido forte è quello solforico. La reazione è quindi schematizzata come segue:

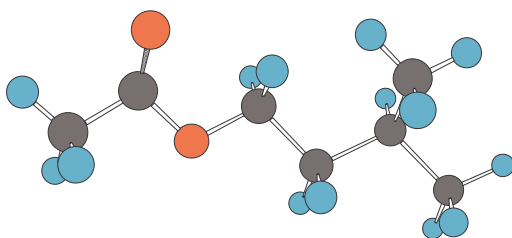


*Quali sono nel dettaglio le procedure da seguire per ottenere il prodotto desiderato?*

1. versare 15 ml (12,2 gr, 0,138 moli) di alcool isopentilico e 20 ml (21 gr, 0,35 moli) di acido acetico glaciale in un pallone da 100 ml.
2. Mentre si agita con movimento rotatorio, introdurre cautamente nel pallone 4 ml di acido solforico concentrato e aggiungere poi alcuni ebollitori.
3. Dopo aver munito il pallone di un refrigerante a ricadere portare la miscela ad ebollizione mediante un mantello riscaldante o un bagno d'olio. Continuare l'ebollizione a ricadere per un ora, quindi togliere il riscaldatore e lasciar raffreddare a temperatura ambiente.
4. Lavare con una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 5% in un imbuto separatore, agitando poi l'imbuto con movimento rotatorio finchè cessa lo sviluppo di anidride carbonica. Tappare e agitarlo debolmente una o due volte, sfiatando ogni volta i vapori. Continuare ad agitare finchè non si sviluppa più vapore. Con questa procedura si neutralizza l'eccesso di acido acetico e si favorisce l'eliminazione per decarbossilazione:



5. L'estere ottenuto bolle ad una temperatura di 134°-143°.

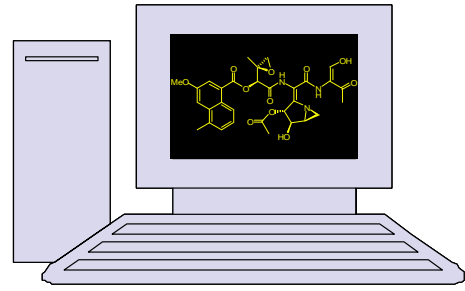


*Quale precauzione va seguita in questa procedura?*

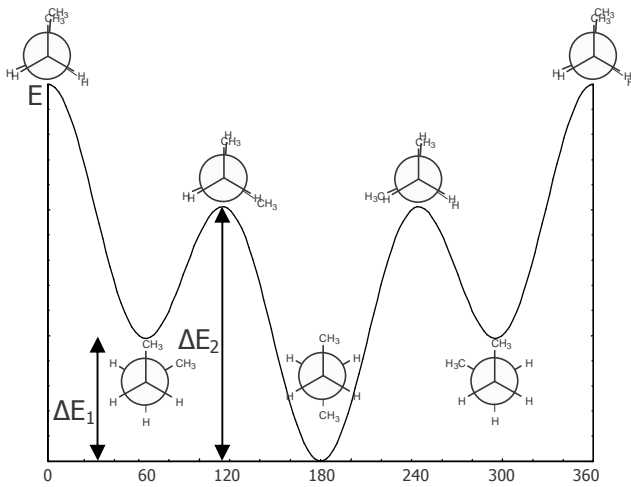
Evitare con estrema cura qualsiasi contatto con l'acido solforico conc. Che può causare gravi ustioni sulla pelle. Qualora esso sia venuto a contatto con la pelle lavare con molta acqua, aggiungendo eventualmente bicarbonato di sodio per neutralizzare l'acido. Lavare immediatamente ogni goccia.

### ESPERIENZA NEL LABORATORIO CHIMICO-FARMACEUTICO III: MODELLISTICA MOLECOLARE DI FARMACI E BIOMOLECOLE

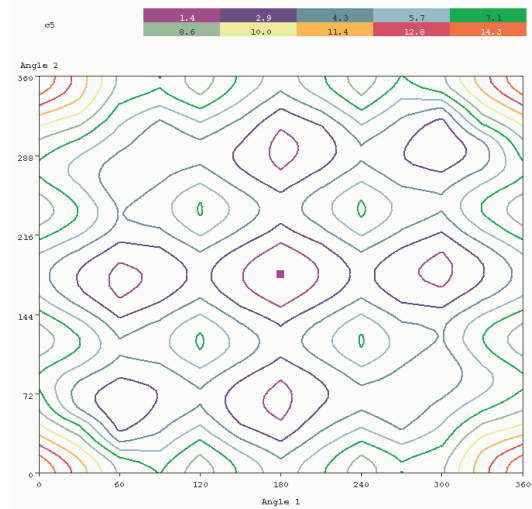
Le interazioni tra le molecole sono alla base della vita. I farmaci stessi per svolgere la propria azione terapeutica necessitano di interagire con le strutture biologiche che sono biomolecole come alcune proteine o gli acidi nucleici. Le interazioni tra diversi tipi di specie chimiche si basano sia sui gruppi funzionali delle molecole sia sulle conformazioni che queste possono assumere. Lo studio di tali grandezze viene di norma affrontato utilizzando modelli in scala ridotta dai quali vengono derivate le proprietà per i sistemi complessi. La complessità delle strutture chimiche dipende sia dal numero di atomi che le compongono che dai gradi di libertà.



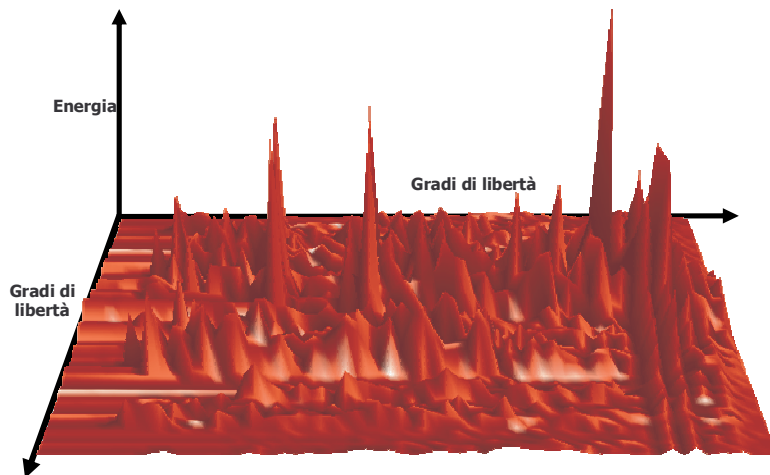
A seconda del grado di complessità del sistema possono essere impiegati metodi sistematici, dinamici o stocastici. I primi si adattano bene esclusivamente all'esplorazione dello spazio conformazionale di molecole semplici dotate di uno o due gradi di libertà (es. butano o pentano).



Profilo energetico del Butano  
 $CH_3-CH_2-CH_2-CH_3$



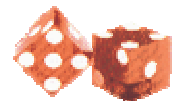
Profilo energetico del Pentano  
 $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$



In pratica sistemi così semplici sono rari e molto più spesso si ha a che fare con molecole il cui profilo energetico può essere rappresentato solo in forma  $n$ -dimensionale (figura a sinistra). In questi casi il ricorso a sofisticati metodi statistici (MonteCarlo) o dinamico molecolari diviene indispensabile.

*Che cosa è il metodo Monte Carlo?*

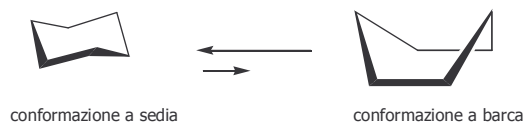
È un po' come giocare a dadi! O quasi! Immagina di dover esplorare



uno spazio sconosciuto senza sapere dove è la direzione che ti interessa seguire. Se ti affidi ad un sistema di generazione random ti trovi come a giocare con i dadi in cui i numeri che tiri di volta corrispondono a valori angolari casuali che ti aiutano a comporre la superficie conformazionale della tua molecola. Dopo aver tirato molte volte i dadi e valutato l'energia di ciascun stato avrai un'idea delle geometrie più favorite ovvero delle conformazioni più probabili della tua molecola.

*Dove si applica il metodo dei dadi o Monte Carlo?*

Anche in molecole semplici come nel caso del **cicloesano**. In questo caso il metodo di esplorazione sistematico non è applicabile, né risulta sufficiente una semplice minimizzazione per raggiungere la conformazione di minima energia (a meno di non partire da una struttura molto vicina). La dinamica molecolare o il metodo Monte Carlo diventano assolutamente necessari.

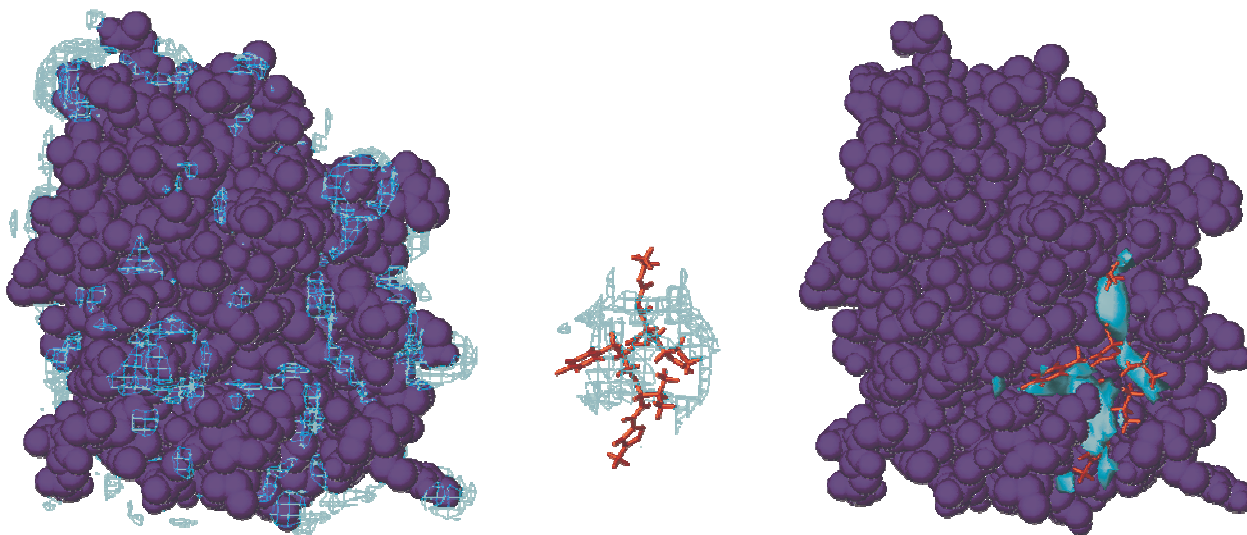


*E che succede in sistemi complessi come quelli tra farmaci e biomolecole?*

Nell'interazione tra due composti è necessario che l'energia libera del complesso risulti inferiore rispetto alla somma delle energie libere relative ai componenti isolati. In altri termini il processo di aggregazione tra il farmaco e la biomolecola deve essere **energeticamente conveniente!**

*Come si può studiare tale interazione?*

Immagina di avere a disposizione un modello tridimensionale di un complesso tra una proteina e un farmaco. Un metodo consiste nel definire i punti di contatto tra le due componenti molecolari. Studiando il complesso in toto, e ciascuna delle molecole isolate (proteina e farmaco) si può per confronto tra i tre modelli ottenere delle mappe delle aree più importanti per l'interazione:



Le informazioni di uno studio di mappatura tridimensionale risulta utile sia per capire perché i farmaci agiscono in un certo modo sia per disegnarne altri con migliori caratteristiche.

*Dove trovo le informazioni sulle strutture tridimensionali di complessi tra farmaci e biomolecole?*

Nel compact disk che ti abbiamo inserito nella cartellina! E trovi anche dei semplici programmi di visualizzazione di strutture molecolari che ti aiuteranno a vedere e manipolare le biomolecole di cui siamo fatti. Inoltre ti farai un'idea anche di come funzionano alcuni farmaci che usiamo o che sono in fase di sviluppo. Se vuoi saperne di più collegati al sito internet <http://www.rcsb.org/pdb/> dove troverai circa 30.000 modelli tridimensionali di biomolecole e di complessi. Buon divertimento!



*Qual è il vantaggio dell'uso di modelli al computer?*

L'approccio computazionale rappresenta uno strumento a disposizione del ricercatore in grado di razionalizzare i fenomeni complessi rendendo lo sviluppo e la sintesi di nuovi farmaci più rapidi e con costi più contenuti.

