

Copolimero acido salicilico-formaldeide ad attività antibradichinica (*)

Riassunto: Ricerche effettuate in precedenza su polimeri ottenuti da unità farmacologicamente attive, avevano condotto alla preparazione di oligomeri policondensati lineari dell'acido salicilico i quali avevano solo un carbossile terminale libero.

Il prodotto oggetto della presente indagine, costituito invece da molecole di acido salicilico i cui nuclei benzenici sono legati tra loro per mezzo di raggruppamenti metilenici, possiede per ogni unità monomerica le due funzioni caratteristiche non impegnate; questo tipo di prodotto può essere considerato come un copolimero tra acido salicilico ed aldeide formica, in cui la possibilità di salificazione dei gruppi funzionali viene ad esaltare le sue caratteristiche di idrosolubilità.

Il polimero è stato ottenuto per reazione diretta tra acido salicilico e formaldeide in ambiente acido per acido cloridrico. Dopo accurata purificazione, il prodotto è stato caratterizzato, determinandone il peso molecolare, la viscosità intrinseca, la densità ed il peso equivalente.

Tenendo presente il notevole antagonismo dimostrato da diversi analgesici-antipiretici, ed in particolare dai salicilici, nei riguardi dell'attività broncoconstrictrice e logopnea della bradichinina, è stata studiata l'azione del poli-metilsalicilico (PMS) nei riguardi della reazione edematosa localizzata provocata dall'iniezione di bradichinina nella zampa del ratto.

I risultati ottenuti hanno mostrato chiaramente che il poli-metilsalicilico (PMS) possiede notevole attività antagonista verso l'edema localizzato da bradichinina.

Résumé: Des recherches effectuées précédemment sur des polymères obtenus à partir d'unités pharmacologiquement actives avaient amené à la préparation d'oligomères de l'acide salicylique polycondensés et linéaires, possédant un seul carboxyle terminal libre. Le produit objet de la présente recherche, pour chaque unité monomérique a les deux fonctions caractéristiques non engagées; constitué par des molécules d'acide salicylique dans lesquelles les noyaux benzéniques sont reliés entre eux par des groupements méthyléniques; ce type de produit peut être considéré comme un copolymère entre l'acide salicylique et l'aldéhyde formique, dans lequel la possibilité de salification des groupements fonctionnels exalte ses caractéristiques d'hydrosolubilité.

Le polymère a été obtenu par réaction directe entre l'acide salicylique et l'aldéhyde formique en milieu acidifié par l'acide chlorhydrique.

Après une purification soignée le produit a été caractérisé en déterminant le poids moléculaire, la viscosité intrinsèque, la densité et le poids équivalent.

En tenant compte du notable antagonisme que présentent divers analgésiques antipyrétiques et en particulier les dérivés salicylés sur l'activité broncho-constrictrice et

(*) Memoria presentata dall'Accademico DOMENICO MAROTTA.

flogogène de la bradykinine, on a étudié l'effet du polyméthylène salicylique (PMS) sur l'œdème local provoqué par l'injection de bradykinine dans la patte du rat.

Les résultats obtenus ont clairement montré que l'acide polyméthylène salicylique (PMS) possède une notable activité antagoniste envers l'œdème localisé de bradykinine.

Summary: Researches previously made on polymers obtained from pharmacologically active units had brought to the preparation of linear polycondensate oligomers of the salicylic acid, which had only one free terminal carboxylic group.

The substance studied in this investigation, which is, instead, made up of salicylic acid molecules, whose benzenic rings are bound together by means of methylenic bridges, has the two functional groups non-engaged for each repeating unit; this type of substance may be considered as a copolymer between salicylic acid and formaldehyde, where the possibility of salification of functional groups gets to enhance its characteristics of hydrosolubility.

The polymer was obtained through direct reaction between salicylic acid and formaldehyde in acid medium for hydrochloric acid. After careful purification, the substance was characterized, its molecular weight, intrinsic viscosity, density and equivalent weight having been determined.

Considering the remarkable antagonism shown by several analgesics-antipyretics and salicylics, in particular, to the bronchoconstrictor and phlogogen activity of bradykinin, the action of poly-methylensalicylic acid (PMS) has been investigated in connection with localized oedematose reaction caused by injection of bradykinine into the leg of a rat.

The results obtained have clearly shown that the polymethylensalicylic acid has a remarkable antagonist activity to localized oedema from bradykinin.

Gli studi precedentemente effettuati da uno di noi sui polimeri ottenuti da unità monomeriche farmacologicamente attive, avevano condotto alla preparazione di oligomeri policondensati lineari dell'acido salicilico, i quali avevano di conseguenza solo un carbossile terminale libero (1).

Il prodotto oggetto della presente indagine, costituito invece da molecole di acido salicilico i cui nuclei benzenici sono legati tra di loro per mezzo di raggruppamenti metilenici, possiede per ogni unità monomerica le due funzioni caratteristiche non impegnate; questo tipo di prodotto può essere considerato come un copolimero tra acido salicilico ed aldeide formica, in cui la possibilità di salificazione dei gruppi funzionali viene ad esaltare le sue caratteristiche di idrosolubilità.

Poiché studi precedenti (2) hanno messo in evidenza una azione antibradichinica in molti medicinali appartenenti alla categoria degli analgesici-antipiretici, particolarmente accentuata nei derivati salicilici, abbiamo pensato di studiare gli effetti del copolimero sintetizzato sulla flogosi localizzata da bradichinina sintetica nel ratto.

Questa indagine ci sembra particolarmente interessante, in quanto alla bradichinina si attribuisce una importanza non trascurabile nella genesi delle manifestazioni infiammatorie; essa, in particolare, avrebbe notevole interesse come sostanza algogena e fortemente permeabilizzante: come si sa, le reazioni infiammatorie sono caratterizzate fra l'altro da aumentata permeabilità capillare e da dolore (3). La liberazione della bradichinina nell'organismo avverrebbe per l'azione di certi enzimi sul bradichinogeno, un precursore della bradichinina stessa.

Nel prodotto da noi saggiato, l'inserimento di molecole di acido salicilico in un copolimero può rivestire un ruolo importante nei processi di interazione tra la bradichinina, cui spetta la formula di un nonapeptide (4), ed il polielettrolita a carattere acido quale è il polimetilensalicilico (P.M.S.) (5).

In questa nota viene riportata la preparazione del suddetto copolimero a partire da aldeide formica ed acido salicilico, una sua prima caratterizzazione chimica e chimico-fisica ed i risultati sulla attività antibradichinica nell'edema localizzato, prodotto nel ratto da bradichinina sintetica (6).

PARTE SPERIMENTALE.

Sintesi del poli-metilensalicilico. - In un pallone a tre colli munito di agitatore meccanico, di refrigerante a ricadere ed imbuto separatore, vengono posti 400 g. di acido salicilico finemente polverizzato, 1,5 g di acido ossalico, 40 ml di acqua e 350 ml di una soluzione di formaldeide al 40%, per aggiunte successive. La miscela viene tenuta a ricadere sotto energica agitazione per circa due ore fino ad avere una soluzione completamente limpida. A questo punto vengono aggiunti 65 ml di acido cloridrico ($d = 1,19$) e 100 ml di acqua; dopo 20' circa si manifesta un intorbimento con separazione di due fasi liquide di cui la sottostante presenta notevole viscosità. Quasi subito si ottiene una lenta precipitazione che si conclude dopo ca. due ore dall'aggiunta dell'acido cloridrico, con la formazione di una massa solida unica. La fase liquida viene allontanata per filtrazione ed il polimero, dopo polverizzazione, viene lavato con acqua bollente fino ad allontanamento dell'acido salicilico che non ha reagito. Il controllo della purificazione del prodotto viene seguito per via cromatografica con le modalità in seguito descritte.

Caratterizzazione del copolimero. - Il prodotto seccato all'aria presenta un caratteristico comportamento al riscaldamento; esso infatti inizia il rammolimento alla temperatura di 195°C; superata questa temperatura, il polimero si decompone prima decarbossilandosi ed infine carbonizzando. Il polimero è solubile in bicarbonati ed idrossidi alcalini e presenta inoltre una discreta solubilità nei comuni solventi organici (Tab. I). Le soluzioni alcoliche danno la caratteristica colorazione bleu con $FeCl_3$. La densità, misurata con il metodo della flottazione impiegando come liquidi n-esano e bromoformio, ha fornito il valore di 1,42 g/ml.

Analisi cromatografica. - L'analisi su strato sottile, impiegando come eluente acido acetico/benzene/acqua (2:2:1 v/v/v) e supporti vari quali gel di silice, allumina e resina poliammidica, ha portato ad una netta separazione del polimero dall'acido salicilico eventualmente presente ed all'ottenimento di varie frazioni dotate presumibilmente di differente peso molecolare. Questa separazione è ancora più accentuata quando si effettua la cromatografia su carta Wathman n. 1 con l'eluente sopra indicato. I valori di Rf in tal modo ottenuti adoperando il metodo ascendente, tempo circa 13 h, sono riportati nella Tab. II. Il numero di frazioni nettamente evidenziabili alla osservazione UV sono 7; si nota inoltre una striscia

continua con intensità decrescente dal valore di Rf 0,0 al valore 0,25. Per l'acido salicilico si è avuto un valore di Rf 0,89.

Peso equivalente. - La determinazione del peso equivalente è stata fatta mediante titolazione potenziometrica in solvente non acquoso. Come miscela solvente è stata impiegata una miscela acetone: acetonitrile (1:1; v/v) e come agente titolante

TABELLA I.

SOLVENTI	a freddo	a caldo
Anilina	+ -	+ +
Etilendiammina	+ +	+ +
Dimetilformammide	+ +	+ +
Butilammina	+ +	+ +
Piridina	+ +	+ +
Formammide	+ +	+ +
Acetato di etile	— —	— —
Cloroformio	— —	— —
Bromoformio	+ -	+ -
Tetracloruro di carbonio	+ -	+ -
Metacloroanilina	+ -	+ -
Acilonitrile	— —	— —
Acido formico	— —	— —
Acido acetico	— —	— —
Anidride acetica	— —	— —
Glicerina	— —	— —
Acetone	+ -	+ +
Acetilacetone	+ +	+ +
Etere	— —	+ -
Ossano	+ -	+ +
Metanolo	+ -	+ +
Etanolo	+ -	— —
Propanolo	— —	+ -
Butanolo	— —	— —
Alcool isamilico	— —	— —
Glicol etilenico	+ -	+ -
Pentano	— —	— —
Esano	— —	— —
Ligroina	— —	— —
Benzene	— —	— —
Nitrobenzene	— —	— —
Toluolo	— —	— —
Xilolo	— —	— —
Essidrobenezene	— —	— —
Tetraidrofurano	+ -	+ +

(+ -): parzialmente solubile
 (+ +): solubile
 (— —): insolubile

TABELLA II.

Frazioni polimeriche	Rf
I	0,25
II	0,38
III	0,54
IV	0,69
V	0,76
VI	0,81
VII	0,85

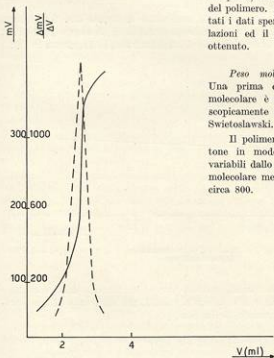


Fig. 1 - Titolazione del PMS con KOH metanolica.

—
curva integrale- - -
curva differenziale

è stata usata una soluzione 0,1 N di potassa metanolica. La titolazione è stata effettuata sciogliendo una quantità pesata di campione in 15 ml di acetone e 15 ml di acetonitrile ed agitando la soluzione con agitatore elettromagnetico. L'andamento delle titolazioni è stato eseguito mediante un potenziometro (Radiometer E 23) dotato di una coppia di elettrodi vetro/calomelano. I dati sperimentali ottenuti sono stati riportati in grafico tracciando le curve integrali e quelle differenziali di titolazione (Fig. 1). Conoscendo la normalità della soluzione titolante, il volume di essa impiegato ed il peso del campione, si calcola il peso equivalente del polimero. In Tab. III sono riportati i dati sperimentali per alcune titolazioni ed il peso equivalente medio ottenuto.

Peso molecolare ebullioscopico.

Una prima determinazione del peso molecolare è stata effettuata ebullioscopicamente usando un apparecchio Swietoslawski.

Il polimero è stato sciolto in acetone in modo da ottenere soluzioni variabili dallo 0,60 allo 0,85%. Il peso molecolare medio ottenuto è stato di circa 800.

TABELLA III.

PESO EQUIVALENTE P M S			
g. PMS	SOLVENTE	ml di titolante N/10 (*)	Peso equival.
0,0526	Acetone/Acetonitrile (1 : 1 v/v)	3,21	163,86
0,0598	Acetone/Acetonitrile (1 : 1 v/v)	3,67	162,99
0,0842	Acetone/Acetonitrile (1 : 1 v/v)	5,13	164,21
0,0712	Acetone/Acetonitrile (1 : 1 v/v)	4,35	163,74
0,0627	Acetone/Acetonitrile (1 : 1 v/v)	3,80	164,65
			Media : 163,89

(*) KOH metanolica

Viscosità. - Le misure di viscosità sono state effettuate alla temperatura di 20°C ($\pm 0,05$) impiegando il viscosimetro a diluizione di Desreux e Bischoff (7). Il solvente per ora preso in esame è stato il tetraidrofurano. Il diagramma in Fig. 2

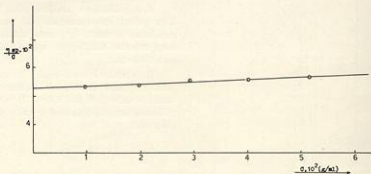


Fig. 2 - Viscosità ridotta (η_{sp}/c) in funzione della concentrazione (C) per un campione di PMS in tetraidrofurano.

mostra l'andamento della viscosità ridotta (η_{sp}/c) in funzione della concentrazione (c), dal quale si mette in evidenza la validità, per l'intervallo di concentrazione considerato, dell'equazione di Huggins (8) :

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K' [\eta]^2 c$$

Il valore $[\eta]$ nel solvente considerato è di 0,053 in accordo con quanto previsto per oligomeri di peso molecolare inferiore a 1.000.

Attività antibradichinina. - Tenendo presente il notevole antagonismo dimostrato da diversi antiaggrigii-antipiretici, ed in particolare dai salicilici e dai pirazolici, nei riguardi della attività broncoconstrittiva e flogogena della bradichinina (9), ci è parso interessante studiare l'azione del PMS c, a scopo comparativo, di due pirazolici, nei riguardi della reazione edematosa localizzata provocata dall'iniezione di bradichinina nella zampa del ratto. È stata seguita, in linea di massima, la tecnica riportata da P. Preziosi e P. Manca (10).

A ratti (130-180 g) digiuni da 12 h veniva somministrato per via endoperitoneale il prodotto PMS alla dose di 100 mg/Kg ovvero aminopirina o 4-(nicotinilaminoacetilamino)-1-fenil-2,3-dimetilpirazolone-5 cloridrato (NIPI) alla dose rispettiva di 150 mg/Kg.

Tutti i prodotti sono stati solubilizzati in H_2O , in modo da somministrare le quantità desiderate in 10 cc di liquido pro Kg.

Trascorsi 15 minuti, si è praticata ai ratti nell'aponevrosi plantare della zampa posteriore destra la iniezione di 5 mcg di bradichinina in 0,1 cc di H_2O distillata; gli animali sono stati sacrificati mediante colpo alla nuca 15 minuti dopo l'iniezione dell'agente edemigemo e sono state loro tagliate le due zampe posteriori a livello dell'articolazione tibio-astragalo-calcaneare. Le due zampe erano pesate singolarmente.

Per ogni gruppo di esperimenti venivano tenuti dei controlli digiuni da 12 h, ai quali a tempo zero era iniettata nella zampa posteriore destra la bradichinina (5 mcg in 0,1 ml di H_2O distillata); i ratti venivano sacrificati 15 minuti dopo tale iniezione.

Per la valutazione dell'edema, si è calcolato l'aumento percentuale di peso della zampa posteriore destra rispetto al peso della zampa di sinistra in ciascuno dei ratti controllo e di quelli trattati.

È stata effettuata la media delle variazioni percentuali per ogni gruppo, sono stati calcolati l'errore standard di tale media e la significatività rispetto ai valori ottenuti nei controlli al tempo corrispondente. Inoltre è stata calcolata l'inibizione percentuale della reazione edematosa riscontrata negli animali trattati con PMS aminopirina o NIPI, rispetto ai controlli con la formula seguente (11):

$$\frac{Ic - It}{Ic} \times 100$$

dove: Ic = incremento percentuale medio della zampa destra rispetto a quella di sinistra riscontrata nei controlli.

It = medesimo incremento riscontrato nei trattati.

L'entità dell'inibizione percentuale esprime l'intensità dell'azione protettrice del composto nei riguardi dell'edema in esame.

I dati ottenuti documentano che il PMS possiede notevole attività antagonista verso l'edema localizzato da bradichina e questo suo effetto appare evidentemente superiore a quello dei due pirazolici sperimentati (Fig. 3).

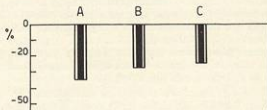


Fig. 3 - Azione dell'ac. polimetilensalicilico (A), dell'aminopirina (B) e del 4-(nicotinilaminoacetilamino-1-fenil-2, 3-dimetilpirazalone-5 cloridrato (C) sull'edema localizzato da bradichina. Le colonnine indicano, per i diversi composti sperimentali, l'inibizione percentuale della reazione edematosa rispetto a quella rilevata nei controlli non pretrattati con i composti di cui si voleva aggiungere l'effetto antiedema.

Napoli. Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologia dell'Università diretto dal Prof. M. Covello.

Istituto di Farmacologia dell'Università. - 2ª Cattedra: Titolare Prof. P. Preziosi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) M. COVELLO e G. CIAMPA, Rend. Accad. Sci. Fis. e Mat. (Soc. Naz. Sci. Lett. e Arti, Napoli) 27, 537 (1960).
M. COVELLO e G. CIAMPA, Rend. Accad. Sci. Fis. e Mat. (Soc. Naz. Sci. Lett. e Arti, Napoli) 28, 369 (1961).
M. COVELLO e G. CIAMPA, Annali di Chimica 2, 52, 1127 (1962).
G. CIAMPA, Annali di Chimica 1, 54, 412 (1964).
G. CIAMPA e A. VITTORIA, Annali di Chimica 2, 55, 1197 (1965).
- 2) H. O. J. COLLIER, J. A. HOGGATE, M. SCHACHTER e P. G. SHORLEY, Brit. J. Pharmacol. 15, 209 (1960).
- 3) H. O. J. COLLIER e P. G. SHORLEY, Brit. J. Pharmacol. 15, 601 (1960).
- 4) P. LEWIS, Metabolism 13, 1256 (1964).
- 5) R. A. BOISSONAS, Synthesis of bradykinin and of structurally related peptides. In: Symposium on bradykinin and vaso-dilating polypeptides. 1st Intern. Pharmacol. Meeting, Stockholm, 1961.
- 6) R. C. DE GEISO, L. G. DONARUMA e E. A. TOMIC, J. Org. Chem. 27, 1424 (1962).
- 7) M. ROCHA E SILVA, Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 191 (1963).
- 8) V. DESREUX e J. BISCIOFF, Bull. Soc. Chim. Belg. 59, 93 (1950).
- 9) M. L. HUGGINS, J. Am. Chem. Soc. 64, 2716 (1942).
- 10) H. O. J. COLLIER, In: Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs, S. GARATTINI e M. N. G. DICKER, Eds., Excerpta Med. Found. Intern. Corp. Series n. 82, Amsterdam, 1965, 129.
- 11) Il Farmaco (Ed. Sci.) 20, 81 (1965).
- 12) S. GARCET, Therapie 13, 549 (1958).