



**TURUN
YLIOPISTO**

Polyfenolien synteettiset polymerisaatio- ja stabilointimenetelmät

Luonnonyhdistekemia
LuK-tutkielma

Justus Hakamäki

16.5.2024
Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Oppiaine: Luonnonyhdistekemia

Tekijä(t): Justus Hakamäki

Otsikko: Polyfenolien synteettiset polymerisaatio- ja stabilointimenetelmät

Ohjaaja(t): prof. Juha-Pekka Salminen, FT Marianna Manninen

Sivumäärä: 20 sivua

Päivämäärä: 16.5.2024

Polyfenolit ovat kaikissa kasvilajeissa ja niiden kaikissa osissa esiintyvä laaja erikoistuneiden metaboliittien ryhmä yhdistettä, joita on tunnistettu tuhansia erilaisia. Viimeisen vuosikymmenen aikana polyfenolit ovat olleet tutkimuksen mielenkiinnon kohteena, sillä niillä on paljon terveyttä edistäviä ominaisuuksia. Polyfenoleilla on havaittu esimerkiksi syöpää, Alzheimeria ja diabetesta ehkäiseviä sekä hoitavia vaikutuksia.

Polyfenolien hyötykäytölle on ilmaantunut myös haasteita, joista suurin on niiden osittainen epästabiilisuus. Rakenteesta riippuen, ne voivat hapettua tai hajota altistuessaan esimerkiksi valolle, lämmölle, hapelle tai metalli-ioneille. Polyfenoleja voidaan stabiloida polymerisoimalla niitä joko itsensä tai jonkin toisen linkkeriyksikön kanssa. Tällöin niistä voi tulla paitsi pysyvämpiä niin myös lääketieteellisesti aktiivisempia.

Erilaisia synteettisiä polyfenolien polymerisaatiotekniikoita ovat esimerkiksi vaiheittaiskasvupolymerisaatiot, joissa polyfenolimonomerejä kiinnitetään yksitellen toisiinsa kondensaatioreaktiolla käyttäen esimerkiksi aldehydiä linkkerinä ja entsyymikatalysoidut polymerisaatiot, joissa esimerkiksi hapetus-pelkistysreaktioita katalysoiva entsyymi helpottaa fenoksiradikaalien muodostumista, mikä johtaa polyfenolien polymerisaatioon.

Polyfenoliset polymeerit ovat osoittaneet parantuneita lääketieteellisiä aktiivisuuksia monomeereihinsä verrattuna, mutta paljon tutkittavaa on vielä jäljellä polyfenolien ja polymerisaatiotekniikoiden moninaisuuden takia.

Avainsanat: erikoistuneet metaboliitit, kondensaatioreaktiot, polyfenoli, polymerisaatio, synteesi

Sisällysluettelo

1	Lyhenteet	4
2	Johdanto	5
3	Polyfenolien kemiaa	6
4	Polyfenolien polymerisaatio	7
4.1	Step-growth-polymerisaatio	7
4.1.1	Aldehydikondensaatio	7
4.1.2	Glyseroli-diglysidyylietterikondensaatio	8
4.2	Entsyymikatalysoidut polymerisaatiosynteesit	10
4.3	Polyfenolien konjugointi amidaatiolla ja esteröinnillä	11
4.3.1	Polyfenolien konjugointi kitosaaniin	11
4.3.2	Resveratrolin konjugaatio polykaprolaktoniin	12
4.3.3	HA-EGCG-hydrogeelin valmistus amidaatiolla ja HRP-entsyymikatalyysillä	14
4.4	Vapaa radikaalipolymerisaatio	15
5	Tiivistelmä ja johtopäätökset	17
6	Lähteet	18

1 Lyhenteet

AIBN	Atsobisisobutyronitriili
DMF	Dimetyyliformamidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EDAC	1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi
EGDMA	Etyleeni-glykoli-dimetaklyraatti
EGCG	Epigallokatekiinigallaatti
HA	Hyaluronihappo
HRP	Piparjuuren peroksidaasi (eng. horseradish peroxidase)
MAA	Metakryylihapo
NIPAAm	Propyyliakryyliamidi
PCL	Polykaprolaktone
ROS	Reaktiivinen happiradikaali (eng. reactive oxygen species)
THF	Tetrahydrofuraani
XO	Ksantiinioksidaasi

2 Johdanto

Polyfenolit ovat ryhmä orgaanisia molekyyliä, joissa esiintyy useampi kuin yksi fenolinen ryhmä. Ne voidaan jakaa muun muassa tanniineihin, flavonoideihin ja fenolisiin happoihin, joista flavonoidit ovat laajin ryhmä. Yli 8000 erilaista polyfenolista yhdistettä on tunnistettu eri kasvilajeista [1]. Kasvit tuottavat polyfenoleja erikoistuneina (sekundaarisina) metaboliitteina ja hyödyntävät niitä esimerkiksi suojautuakseen UV-säteilyltä ja biologisilta uhilta, kuten bakteereilta ja eläimiltä. Polyfenoleja esiintyy kaikissa kasvinosissa, kuten juurissa, rungossa ja lehdistä [2]. Polyfenolit ovat merkittävä osa niin ihmisten kuin eläintenkin ruokavaliota [3]. Esimeriksi marjat, vihannekset, hedelmät ja teet tunnetaan hyvin polyfenolirikkaina [2].

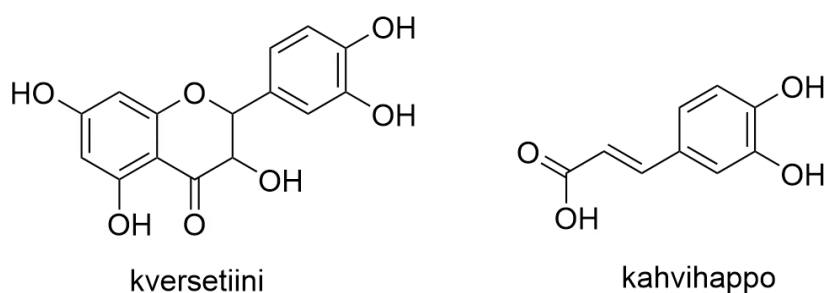
Polyfenolit ovat olleet tutkimuksen mielenkiinnon kohteena viimeisen vuosikymmenen ajan, sillä ne ovat osoittaneet paljon terveyttä edistäviä ominaisuuksia niin osana ruokavaliota kuin lääkekehityksessään niiden antioksidanttisten, antibakteeriallisten ja antiviraalien ominaisuuksien takia. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kasvien polyfenoleita runsaasti sisältävä ruokavalio auttaa ennaltaehkäisemään syöpiä sekä sydämen ja hermoston toimintaan liittyviä tauteja. Polyfenolit ovat tämän lisäksi osoittaneet potentiaalia edellä mainittujen tautien hoidossa lääkeaineina. Ne ovat myös kestäväen kehityksen kannalta lupaava tutkimuskohde, sillä ne ovat riittoisia ja nopeasti uusiutuva luonnonvara. [1]

On myös todettu, että polyfenolit inhiboivat ksantiinioksidaasia (XO) ja muita entsyymejä, jotka muodostavat reaktiivisia happiradikaaleja (ROS). ROS:t ovat tärkeitä useissa biologisissa ja biokemiallisissa prosesseissa, mutta niiden liikatuotanto ruuissa voi johtaa hapettumisstressiin, joka puolestaan voi vahingoittaa lipidejä, proteiineja ja DNA:ta [4]. Tämä vahinko aiheuttaa muun muassa sydän- ja verisuonitauteja, syöpää, diabetesta ja reumaa. Erityisesti aivot ovat hyvin herkät hapettumisstressille, joka johtaa hermostollisiin sairauksiin, kuten Alzheimeriin, Parkinsoniin ja kognitiivisiin oireisiin iäkkäillä ihmisillä [5].

Polyfenolien sovellutuksessa on kuitenkin haasteensa, sillä ne ovat hyvin epästabiileja yhdisteitä. Ne ovat erittäin herkkiä reagoimaan altistuessaan muun muassa valolle, lämmölle, emäksisyydelle, hapelle tai metalli-ioneille, mikä johtaa niiden pilaantumiseen [2]. Erilaisia menetelmiä on kuitenkin kehitetty stabiloimaan ja parantamaan polyfenolien lääketieteellisiä ominaisuuksia. Tässä tutkielmassa esitellään erilaisia polyfenolien synteettisiä polymerisaatio- ja stabilointimenetelmiä niiden ominaisuuksien parantamiseksi sekä pohditaan näiden menetelmien mahdollisuuksia ja haasteita niiden sovellutuksessa.

3 Polyfenolien kemiaa

Polyfenolit ovat kemiallisesti laaja ja monipuolinen ryhmä molekyyliä, jotka koostuvat kahdesta tai useammasta bentseenirenkaasta, jossa on kiinni vähintään yksi hydroksyyli-ryhmä. Näissä fenolisissa ryhmissä on yleensä kiinnittyneenä orgaanisia happoja ja sokereita, jotka voivat olla konjugoituneita [2]. Luonnossa esiintyvät fenoliset yhdisteet vaihtelevat yksinkertaisista, yksirenkaisista fenolisista hapoista erittäin polymerisoituneisiin yhdisteisiin, kuten tanniineihin [3]. Kuvassa 1 on esitetty kversetiini ja kahvihappo esimerkkeinä yksinkertaisten fenolisten yhdisteiden rakenteista. Kversetiini kuuluu flavonoidien laajaan ryhmään ja kahvihappo on fenolinen happo.



Kuva 1. Kversetiini ja kahvihappo esimerkkeinä fenolisten yhdisteiden rakenteista.

Polyfenolien rakenne vaikuttaa niiden stabiilisuuteen ja aktiivisuuteen. Merkittävin tekijä niiden reaktiivisuudessa on hydroksyyli-ryhmät. Mitä enemmän ja lähempänä toisiaan hydroksyyli-ryhmät ovat bentseenirenkaassa, sitä reaktiivisempi ja epästabiilimpi polyfenoli on. Polyfenolit voivat hapettua spontaanisti happirikkaissa olosuhteissa, jolloin muodostuu peroksiedeja ja vetyperoksiedeja. Hydroksyyli-ryhmien määrä vaikuttaa myös tähän. Spontaani hapettuminen vähentää polyfenolien pitoisuutta ja bioaktiivista hyötysuhdetta sekä johtaa niiden rakenteen pilaantumiseen. [6]

Parantaakseen polyfenolien lääketieteellisiä ominaisuuksia, polyfenoleja voidaan polymerisoida ja stabiloida useita erilaisia reaktiota hyödyntäen [2]. Yksi ajankohtainen, laaja ja kiinnostava menetelmä on polyfenolien polymerisaatio erilaisia synteesejä hyödyntäen. Seuraavaksi tässä tutkielmassa esitellään erilaisia polyfenolien polymerisaatiosynteesejä ja arvioidaan niiden hyötyjä ja haittoja niiden sovellutuksessa.

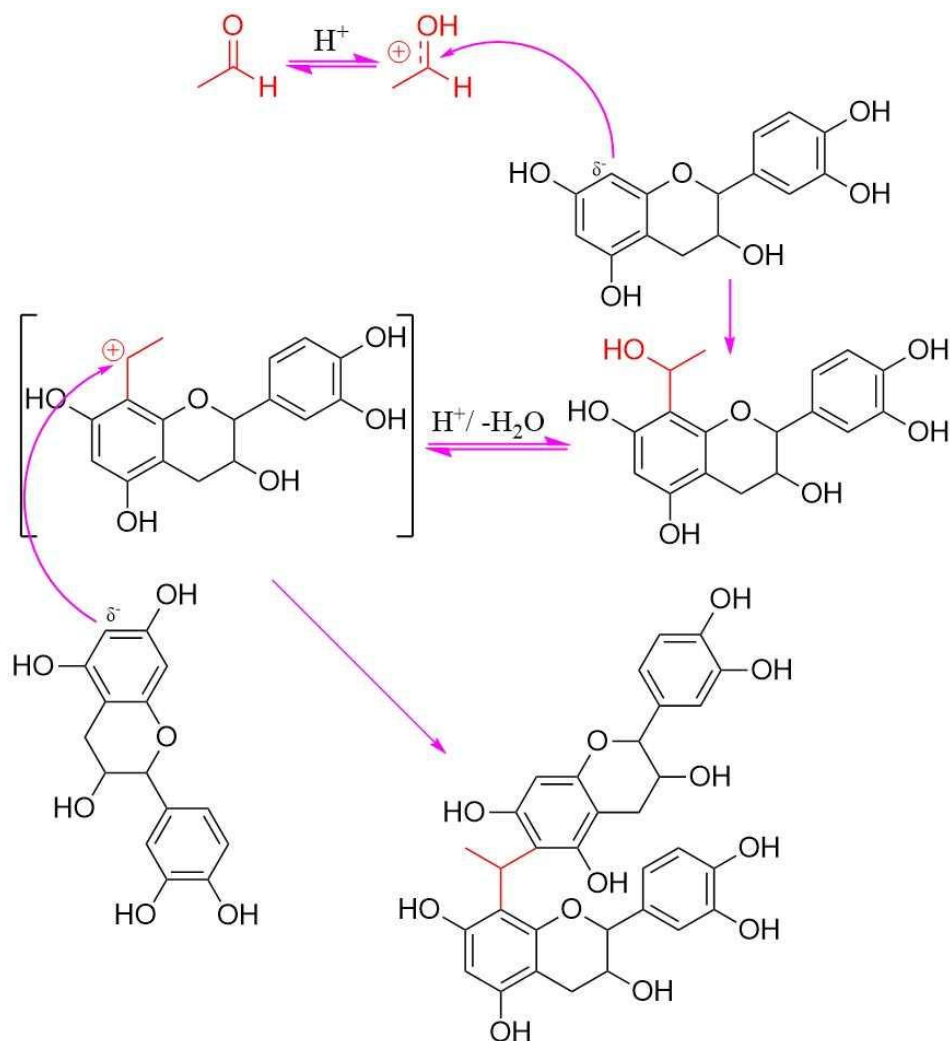
4 Polyfenolien polymerisaatio

4.1 Step-growth-polymerisaatio

Step-growth-polymerisaatiolla tarkoitetaan synteesimenetelmää, jossa polyfenolimonomerejä linkitetään yhteen yksi kerrallaan. Seuraavaksi tutkielmassa esitellään kaksi erilaista step-growth-polymerisaatiomenetelmää: aldehydikondensaatiot ja glyserolidiglysidyylietterikondensaatiot, joita pidetään merkittävimpinä step-growth-polymerisaatiotekniikoina polyfenoleille [7].

4.1.1 Aldehydikondensaatio

Alkuperäiset tutkimukset polyfenolien polymerisaatiosta aldehydikondensaatiolla suoritettiin, kun yritettiin tutkia oligomeerien ja polymeerien muodostumista viinissä. Fulcrand et al. käyttivät nestekromatografiaa ja massaspektrometriä havainnollistamaan polyfenolien ja asetaldehdydin välistä reaktiota etikkahappoliuoksessa [8]. Reaktiomekanismi on esitetty kaaviossa 1. Ensimmäinen askel on asetaldehdydin protonaatio, joka muodostaa karbokationin, johon flavanoli hyökkää nukleofiilisesti. Vesimolekyyli katoaa muodostuneesta etanoliadduktista luodakseen uuden karbokationin. Seuraavaksi toinen flavanoli hyökkää tähän karbokationiin, jolloin muodostuu dimeeri. Polymerisaatio jatkuu pidemmälle samankaltaisesti. Tämä reaktiomekanismi on hyvin samankaltainen jo hyvin tunnettuun happokatalysoituun reaktioon formaldehydin ja fenolisten yhdisteiden välillä, jolloin muodostuu novolak hartseja, jotka ovat myös fenolisia polymeerejä. Reaktioiden välinen ero on se, että novolak hartsien reaktiossa fenolisia yhdisteitä on ylimäärä formaldehydiin verrattuna, kun taas esitetystä flavanolien polymerisaatioreaktiossa asetaldehydiä on ylimäärä (50 : 1). Uskotaan, että aldehdydin ylijäämä suosii kondensaatioreaktiota, jolloin onnistutaan välttymään sivureaktioilta. [7]

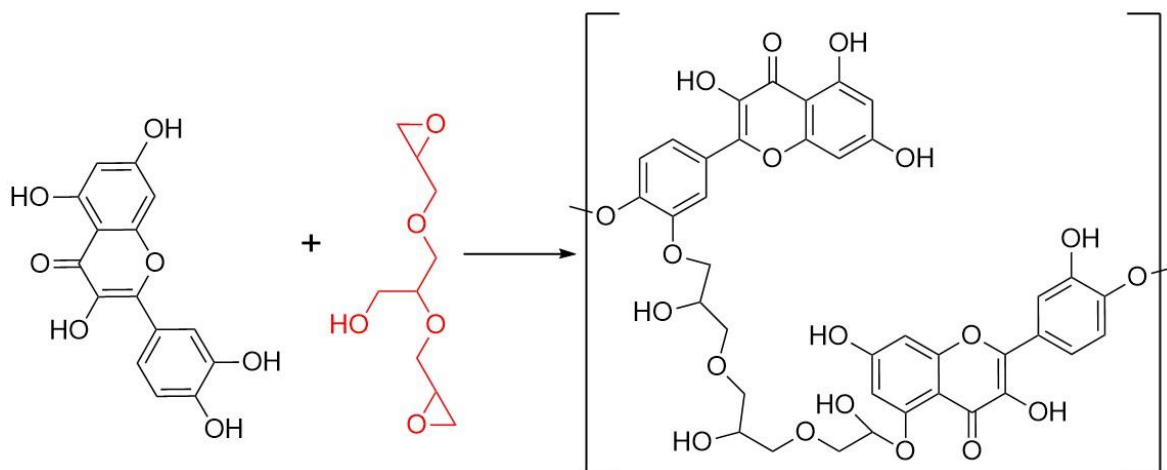


Kaavio 1. Flavanolin polymerisaatioreaktion mekanismi, jäljitelty lähteestä [8].

Synteesi on toistettu käyttämällä useita eri aldehydejä syntetisoimaan erilaisia katekiinipolymeerejä Kim et al. toimesta [9]. Muun muassa asetaldehydiä, glyoksyylihappoa, puryvaattialdehydiä ja orto- sekä parahydroksybentsaldehydiä kutakin kokeiltiin polymeerien muodostamiseksi etikkahappoa tai suolahappoa katalyyttinä käyttäen. Kaikkia polymeerejä syntetisoitiin onnistuneesti korkeilla 71–94 % saantoprosenteilla (korkein saanto katekiinin ja asetaldehydin kanssa). Saavutetut molekyylipainot vaihtelivat 1700–3700 Da välillä. Polymeerit liukenivat hyvin asetoniin, metanoliin, DMF:ään, DMSO:hon, THF:ään ja NaOH:iin, mutta ei veteen. Kaikkien tätä mekanismia hyödyntäen valmistettujen polymeerien hapetusaktiivisuus oli merkittävästi parempi katekiiniin verrattuna. Polymeerit osoittivat potentiaalia Alzheimerin, syövän ja skleroderman hoitamisessa. [10]

4.1.2 Glyceroli-diglysidyylietterikondensaatio

Toinen onnistunut menetelmä step-growth-polymerisaatiossa on glyserolidiglysidyylietterikondensaatio. Sahiner polymerisoi kversetiiniä käyttäen glyserolidiglysidyylietteriä komonomeerinä. Synteesi suoritettiin mikroemulsiossa, jossa käytettiin lesitiiniä tensidinä ja sykloheksaania orgaanisena faasina. Tässä reaktiossa glyserolidiglysidieetterin epoksiryhmät reagoivat kversetiinin fenolisten ryhmien kanssa linkittäen monomeerit toisiinsa. Reaktio on esitetty kaaviossa 2. [11]



Kaavio 2. kversetiinipolymeerin reaktioyhtälö, jäljitely lähteestä [11].

Syntetisoidut kversetiinipolymeerit osoittivat antioksidanttista aktiivisuutta sekä antibakteriaalisia vaikutuksia yleisiä bakteereja, kuten *Bacillus subtilisa* ja *E. colia* vastaan. Sahiner käytti samaa tekniikkaa syntetisoimaan polymeerejä rutiinista [12] ja parkkihaposta [13]. Tuotteet osoittivat jälleen sekä antioksidanttista että antibakteerillista aktiivisuutta. Ne olivat myös stabiilimpia altistuessaan korkeille lämpötiloille. Esimerkiksi polykversetiini alkoi hajota vasta 320 °C:ssa vapaan kversetiinin hajotessa jo 100 °C:ssa. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin, että polyparkkihappo oli yhtä tehokas kuin sisplatiini tiettyjä syöpäsoluja vastaan. Molemmat tässä tutkimuksessa valmistetut polymeerit osoittivat myös tehokasta kykyä lääkeaineiden vapauttamisessa.

Tässä tutkimuksessa valmistettu polyparkkihappo voisi tulevaisuudessa olla hyvä vaihtoehto sisplatiinille syöpähoidoissa kestävän kehityksen kannalta, sillä sisplatiini sisältää platinaa, joka on hyvin harvinainen metalli ja uusiutumaton luonnonvara, kun taas parkkihappoa valmistetaan luonnossa uusiutuvista materiaaleista. Lisäksi kaikkien valmistettujen polyfenolipolymeerien uskotaan olevan tulevaisuudessa mahdollisia sovellettavia lääkeaineita ja niitä tutkitaan ja kehitetään edelleen [11].

4.2 Entsyymikatalysoidut polymerisaatiosynteesit

Entsyymikatalysoidut synteesit makromolekyylien muodostamiseksi ovat hyvin yleisiä luonnossa ja niihin sisältyy muun muassa nukleiinihappojen, proteiinien ja polysakkaridien synteesiä [7]. Merkittävin entsyymiluokka näiden synteesien ilmenemiseen ovat oksidoreduktaasit, jotka katalysoivat hapetus-pelkistysreaktioita [14]. Muutamia oksidoreduktaaseja on käytetty valmistamaan polymeerejä eri polyfenoleista, kuten piparjuuren peroksidaasia (HRP, horseradish peroxidase), soijapavun peroksidaasia, lakkaasia ja tyrosinaasia. Taulukkoon 1 on kerätty entsyymikatalysoituja fenolisten yhdisteiden polymerisaatiosynteesiä ja niiden tuloksia [15–24]. Entsyymikatalysoitujen polymerisaatioreaktioiden on oletettu olevan tulevaisuudessa myrkytön vaihtoehto polymerisoida fenolisia yhdisteitä ilman formaldehydiä [25].

Taulukko 1. Entsyymikatalysoidut polymerisaatiot. EGCG = epigallokatekiinigallaatti, HRP = piparjuuren peroksidaasi, XO = ksantiinioksidaasi

Fenolinen yhdiste	Entsyymi	Molekyyllipaino (Da)	Lääketieteellinen soveltuvuus	Viite
Katekiini	HRP	14 000	Antioksidantti, XO-inhibiittori	15
Taksifoliini	Bilirubiinin oksidaasi	2 800	Antioksidantti	16
Kversetiini, kemferoli	Lakkaasi, tyrosinaasi	-	Antioksidantti	17
Rutiini	Lakkaasi	10 000	Antioksidantti	18
Kversetiini	HRP	14 000	LDL-oksidaatio, XO-inhibiittori	19
Katekiini	Lakkaasi	3 000	Antioksidantti, XO-inhibiittori	20
Kversetiini, rutiini, daidzeiini, 5,6,4-trihydroksyisoflavoni	Piparjuuren tai soijapavun peroksidaasi	4 000 - 12 000	LDL-oksidaatio inhibiittori	21
EGCG	Lakkaasi	4 200	Antioksidantti, XO-inhibiittori	22
Katekiini, vihreä tee -uute	HRP	-	Antimikrobinen	23
Kversetiini, parkkihappo*	Lakkaasi	-	Antioksidantti	24
*Ei tuottanut polymeerejä				

Oksidoreduktaasit katalysoivat polyfenolien polymerisaatiota helpottamalla fenoksiradikaalien muodostumista. Useimpien oksidoreduktaasien keskellä sijaitsee matalassa hapetusilassa oleva metalli. Esimerkiksi HRP:ssä on rauta(III)-ioni ja tyypillisessä entsyymikatalysoidussa polymerisaatiossa vetyperoksidi hapettaa sen rauta(IV):ksi, jolloin muodostuu positiivisesti varautunut radikaali. Tämä radikaali puolestaan vie polyfenoliryhmältä yhden vedyn muodostaen fenoksiradikaalin. [14]

Muutamia polyfenoleja polymerisoitiin tällä menetelmällä käyttäen HRP:tä ja lakkaasia katalyytteinä. Polymerisoidut polyfenolit olivat katekiini [20], rutiini [18] ja EGCG [22]. Polykatekiini oli niukkaliukoinen veteen, mutta hyvin liukeneva DMF:ään, DMSO:hon, pyridiiniin ja NaOH:iin. Muiden polymeerien liukenemista ei tutkittu. Kaikki polymeerit osoittivat kuitenkin hyvää XO-inhibitioaktiivisuutta monomeereihinsä verrattuna. Tämän lisäksi lakkaasilla katalysoidut polykatekiini ja polyrutiini osoittivat inhiboivia vaikutuksia low-density lipoproteiinien hapetuksessa.

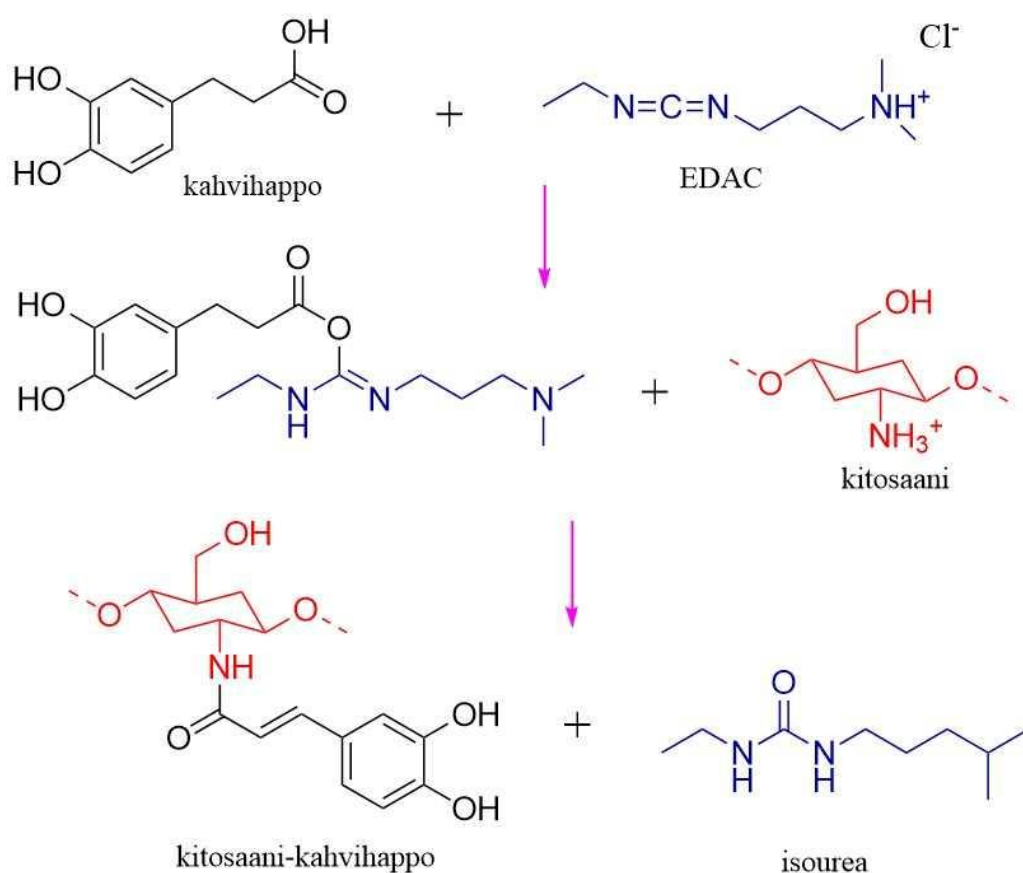
Myös parempia antioksidanttisia aktiivisuuksia havaittiin useista eri entsyymikatalysoiduista polyfenolisista polymeereistä kuten kversetiinin, taksifoliinin ja kemferolin polymeereistä niitä verrattaessa vastaaviin monomeereihin. Lisäksi HRP-katalysoitu polykatekiini demonstroi antimikrobisia ominaisuuksia. Myös tanniinihappoa yritettiin polymerisoida käyttäen lakkaasia katalyyttinä mutta tanniinihappopolymeerien sijaan tanniinihappo depolymerisoitui, muodostaen gallushappoa, gallushappodimeerejä, gallushappoesteröityä glukoosia ja glukoosia. [24]

Entsyymikatalysoidut polymerisaatiot ovat siis monipuolisia ja myrkyttömiä synteesejä, joissa myös tuotteen molekyylipainoa on suhteellisen helppo säädellä lisäämällä reaktioseoksiin haluttu määrä polymerisoitavaa polyfenolia [25]. Lisäksi polymeerit jälleen osoittivat potentiaalia lääketieteellisissä sovelluksissa.

4.3 Polyfenolien konjugointi amidaatiolla ja esteröinnillä

4.3.1 Polyfenolien konjugointi kitosaaniin

Karbodi-imidejä ($RN=C=NR'$) on pitkään käytetty käynnistämään karboksyylihappojen esteröinti- ja amidaatioreaktioita [26, 27]. Useat tutkimusryhmät ovat käyttäneet karbodi-imidejä konjugoimaan fenolisia happoja niiden karboksyyli-ryhmistä parantaen niiden antioksidanttisia ominaisuuksia. Esteri- ja amidikonjugoinnissa polyfenolipolymeerejä ei muodosteta liittämällä polyfenoleja toisiinsa niin kuin aiemmin esitetyissä menetelmissä, vaan polyfenolimonomeerit liitetään polymeeriketjuun, esimerkiksi kitosaaniin [28]. Kaaviossa 3 on esitetty tyypillinen karbodi-imidiavustettu fenolisen hapon (kahvihappo) konjugaatio kitosaaniin ensin kiinnittämällä 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi (EDAC) kahvihappoon esteröinnillä ja sen jälkeen konjugoimalla kahvihappo kitosaaniin amidaatiolla. Aytakin et al. [28] syntetisoivat alla esitetyn kitosaani-kahvihappopolymeerin tällä menetelmällä parantaakseen kahvihapon antioksidanttiaktiivisuutta.



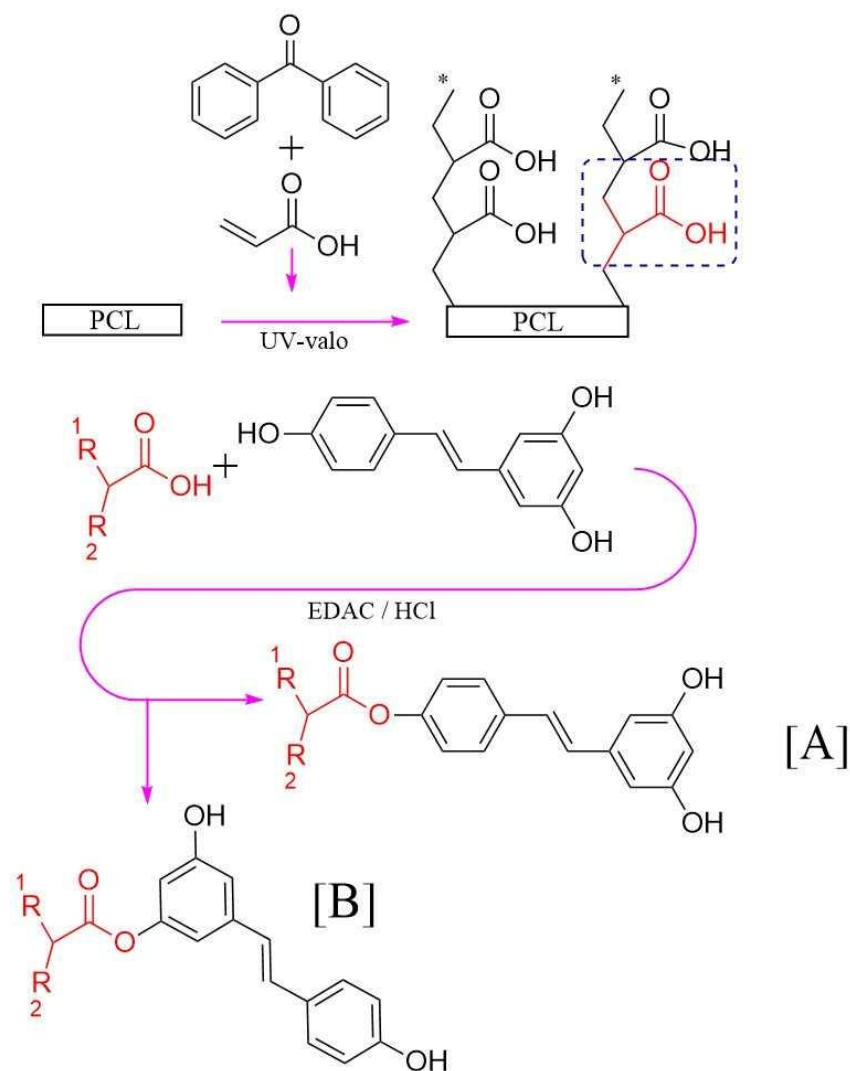
Kaavio 3. kitosaani-kahvihapon esteröidyn polymeerin reaktio EDACin avulla.[28] EDAC = 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi.

4.3.2 Resveratrolin konjugaatio polykaprolaktoniin

Li et al. [29] kiinnittivät kaasufaasireaktion avulla kovalenttisesti akryylihappoketjuja huokoiseen polykaprolaktoniketjuun (PCL). Tämän jälkeen EDACin avulla aktivoitiin resveratrolin fenoliryhmän parituminen akryylihapon karboksyyliiryhmän kanssa esteröitymällä. Alifaattinen esterilinkitys mahdollisti resveratroliosan vapautumisen *in vivo* sovelluksissa, kuljettaen runsaasti polyfenoleja kohdekudokseen.

Resveratrol-PCL-ketjua testattiin kymmenessä urosrotassa. Rotat olivat 12-viikkoisia, painoivat noin 500 g ja olivat numeroitu satunnaisesti 1–10. Rotat puudutettiin ja niiden kalloluihin tehtiin kaksi halkaisijoiltaan 5 mm:n murtumaa. Rottien 1–5 vasemmat murtumat täytettiin huokoisella PCL:llä ilman resveratrolia ja oikeat resveratrol-PCL:llä. Rotille 6-10 tehtiin sama, mutta toisin päin. PCL:ää ilman resveratrolia vasempaan ja resveratrol-PCL:ää oikeaan murtumaan. Kaikki rotat tapettiin kahdeksan viikon kuluttua ja niiden kalloluut kerättiin. Kaikki kokeessa käytetyt rotat pysyivät hyvässä kunnossa, eivätkä kärsineet

leikkauksen jälkeisistä haavoista. Kaikki murtumat, joihin oli laitettu resveratrol-PCL-implantti, demonstroivat huomattavasti korkeampia röntgensäteilytiheyksiä, osoittaen parempaa hoitoa murtumille. Resveratrol-PCL-ketjun synteesi on myös esitetty kaaviossa 4. [29]



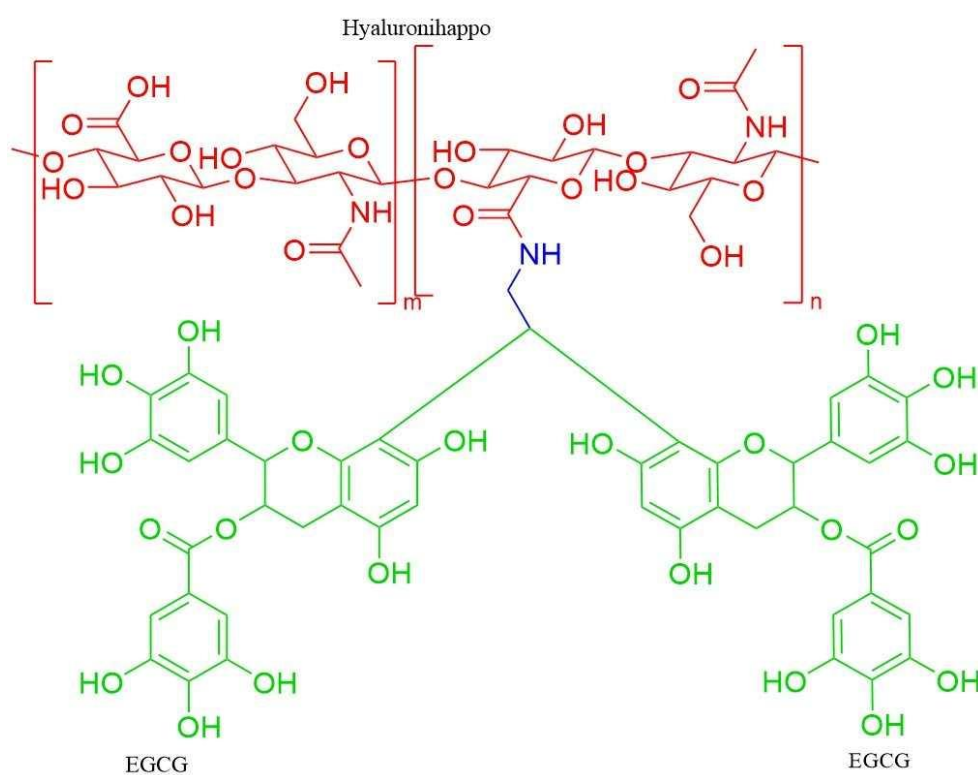
Kaavio 4. resveratrol-PCL-polymeeri [29]. EDAC = 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi, PCL = polykaprolaktoni.

Reaktiotuote B on epätodennäköisempi bentseenirenkaassa sijaitsevan toisen hydroksyyliiryhmän muodostaman steerisen esteen takia.

Polyfenolien konjugaatio orgaanisiin polymeereihin on myös lupaava ja monipuolinen tekniikka tehostaa polyfenolien lääketieteellistä potentiaalia. Polymeeri- ja polyfenolivaihtoehtoja on useita muodostaen useita erilaisia mahdollisuuksia erilaisille polymeereille. Lisäksi nämäkin tuotteet ovat osoittaneet parempaa stabiilisuutta vapaisiin monomeereihinsä verrattuna.

4.3.3 HA-EGCG-hydrogeelin valmistus amidaatiolla ja HRP-entsyymikatalysillä

Lee et al. [30] valmistivat etyliamiinilinkitetyn EGCG-dimeerin ja konjugoivat sen hyaluronihappoon (HA) amidaatiolla käyttäen EDACia ja N-hydroksisukkinimidia kondensoivina aineina. Tämän HA-EGCG-konjugaatin huomattiin auto-oksidoituvan, jolloin muodostuu vetyperoksidia, joka katalysoi HRP:n entsyymireaktiota. Tällöin reaktioon ei tarvinnut lisätä vetyperoksidia, sillä auto-oksidaatiossa muodostunut vetyperoksidi riitti hyvin HRP:n reaktion katalysoimiseen, jolloin muodostui hydrogeeli. Tuote on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. HA-EGCG-konjugaatti (hyaluronihappo-epigallokatekiinigallaatti-konjugaatti), jäljitelty lähteestä [30]. EGCG = epigallokatekiinigallaatti, HA = hyalyronihappo.

Tämän HRP-katalysoidun HA-EGCG-hydrogeelin stabiilisuutta testattiin *in vivo* tutkimuksessa. Peräti 42 päivän jälkeen tuotteen injektioista kohdesoluun, se oli säilyttänyt lähes 100 % massastaan, kun taas aiemmin tutkittu HA-EGCG-hydrogeeli ilman HRP-katalyysiä oli menettänyt massastaan 72 % tässä ajassa. [30]

Tämä tutkimus osoittaa jälleen polyfenolien stabiilisuuden parantumisen niitä polymerisoidessa ja sen, että mahdollisia tekniikoita valmistaa erilaisia polymeerejä on erittäin

monia. Lisäksi tässä tutkimuksessa yhdistettiin kaksi tässä tutkielmassa esittämääni tekniikkaa, amidaatio ja entsyymikatalyyysi.

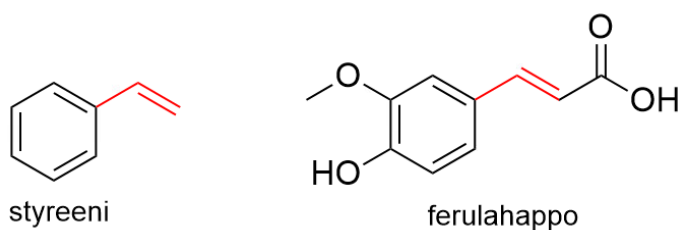
4.4 Vapaa radikaalipolymerisaatio

Kahta perinteistä polymerisaation käynnistäjää, atsobisisobutyronitriiliä (AIBN) ja askorbiinihapon sekä vetyperoksidin liuosta, on käytetty kopolymerisoimaan polyfenoleja muiden monomeerien kanssa [7]. Kopolymeerillä tarkoitetaan sellaista polymeeriä, jossa kahta tai useampaa erilaista monomeeriä on kiinnittynyt toisiinsa ketjuksi. Tässä tapauksessa valmistetaan siis polyfenolisia polymeerejä yhdistämällä niitä monomeereihin, jotka eivät ole polyfenoleja. Esimerkiksi metakryylihappoa (MAA) käytetään usein yhtenä komonomeerinä muiden komonomeerien, kuten etyleeni-glykoli-dimetakrylaatin (EGDMA) ja N-isopropyyliakryyliamidin (NIPAAm) kanssa [31]. Nämä komonomeerit lisäävät ristositoutumista. Taulukossa 2 on listattu polymeerejä, joita on syntetisoitu vapaalla radikaalipolymerisaatiolla.

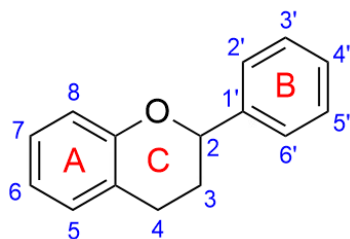
Taulukko 2. Vapaalla radikaalipolymerisaatiolla syntetisoidut kopolymeerit [31–35]. AIBN = atsobisisobutyronitriili, EGDMA = etyleeni-glykoli-dimetakrylaatti, MAA = metakryylihappo, NIPAAm = propyyliakryyliamidi.

Polyfenoli	Komonomeeri	Käynnistäjä	Molekyylipaino (Da)	Lääketieteellinen sovellus	Viite
Kversetiini	MAA	AIBN	71 000	Syöpää ehkäisevä	35
Ferulahappo	MAA/EGDMA	AIBN	-	Antioksidantti	34
Katekiini, kversetiini	MAA/NIPAAm/EGDMA	AIBN	-	Antioksidantti, hydrogeeli	31
Ferulahappo	MAA	Askorbiinihappo/H ₂ O ₂	-	Antioksidantti, antimykootinen	32
Kversetiini	MAA	Askorbiinihappo/H ₂ O ₂	-	Syöpää ehkäisevä	33

Ensimmäisiä polyfenolien polymerisaatioita vapaalla radikaalipolymerisaatiolla suoritettiin ferulahapolla, jolla on polymerisoitava styreeninen sidos (esimerkki kuvassa 3) [32]. Myöhemmin kuitenkin on alettu hyödyntämään polyfenoleita, joilla ei ole kaksoissidoksia, erityisesti flavonoideja, katekiiniä ja kversetiiniä. Uskotaan, että flavonoidit kiinnitetään kasvaviin polymeeriketjuihin flavonoidien A-renkaan aseisiin 6 ja 8 (vertaa kuva 4) [7].



Kuva 3. Styreenin ja ferulahapon rakenteet. Styreeninen sidos korostettu punaisella värillä.



Kuva 4. Flavonoidien numerointijärjestelmä.

Myös kolmitoiminen nanokomposiitti on valmistettu kversetiin ja MAA:n vapaalla radikaalipolymerisaatiolla hiilinanoputkien ympärillä [33]. Komposiitti säilytti kversetiinin antioksidanttiset ominaisuudet. Samalla se myös osoitti parempia syöpää ehkäiseviä ominaisuuksia kversetiinimonomeeriin ja oli myrkytön terveille soluille.

Vapaalla radikaalipolymerisaatiolla on valmistettu myös polyfenolikonjugaatteja. Myös näissä vapaaradikaalipolymerisaatioreaktioissa useimmiten käytetään askorbiinihappo/vetyperoksidia reaktion käynnistäjänä. Tällä tekniikalla polyfenolien kiinnittäminen polysakkaridiin on kaksivaiheinen prosessi [36]: aluksi polymeeriketjun pinnalle muodostuu radikaaleja, kun vetyjä irtoaa hydroksyyli-ryhmistä. Seuraavaksi polyfenoli reagoi radikaalin kanssa muodostaen kovalenttisen sidoksen polysakkaridin ja polyfenolin välillä. Polyfenoleja on kiinnitetty eri polysakkarideihin hyödyntäen askorbiinihappo/vetyperoksidikiinnitystä. Muun muassa inuliiniin [36], alginaattiin [36], kitosaaniin [37], dekstraaniin [38] ja tärkkelykseen [39] on konjugoitu polyfenoleja. Kaikki konjugaatit demonstroivat antioksidanttisia vaikutuksia ja osa osoitti hoitavia vaikutuksia diabetekseen, Alzheimeriin, syöpään, bakteeri-infektioihin ja ihonhoitoon.

5 Tiivistelmä ja johtopäätökset

Polyfenolit ovat erittäin laaja kaikissa kasvilajeissa esiintyvä, paljon lääketieteellistä ja terveyttä edistävää potentiaalia sisältävä luokka orgaanisia molekyyliä. Polyfenolien on tutkittu omaavan antibakteerillista ja antiviraalia aktiivisuutta. Lisäksi niiden on osoitettu ehkäisevän syöpää, sydän- ja verisuonitauteja sekä hermostollisia pitkäaikaissairauksia, kuten Alzheimeria. Bentseenirenkaissa kiinni olevien hydroksyyliyhmiä takia ne ovat erittäin reaktiivisia, mikä johtaa valitettavasti myös niiden heikkoon stabiilisuuteen. Polyfenolit pilaantuvat herkästi altistuessaan esimerkiksi valolle, lämmölle ja korkealle pH:lle.

Polyfenoleja on viimeisten vuosikymmenten aikana tutkittu paljon ja niiden lääketieteellisiä ominaisuuksia on pyritty parantamaan samalla tehden niistä stabiilimpia. Yleisimpiä tekniikoita tämän saavuttamiseen ovat kondensaatioreaktiot, yleensä aldehydiä käyttäen linkkerinä, polymerisaation katalysoiminen entsymaattisesti, pääosin oksidoreduktaasilla, polyfenolien konjugointi orgaanisiin polymeereihin amidaatiolla ja esteröinnillä sekä polymerisaatio vapaalla radikalisaatiolla.

Vaihtoehtoja polyfenolisten polymeerien valmistukseen on merkittävän paljon. Polyfenoleja voidaan kiinnittää toisiinsa step-growth-polymerisaatiolla tai niistä voidaan tehdä kopolymeerejä jonkun toisen monomeerin kanssa. Lisäksi polyfenoleja voidaan myös konjugoida orgaanisiin polymeereihin. Polymerisaatiotekniikoita voi myös yhdistää ja täten tutkimusmahdollisuuksia on äärimmäisen paljon. Polyfenolimonomeerin valinnasta mahdolliseen komonomeeriin tai polymeeriketjuun ja siitä polymerisaatiotekniikkaan.

Tässä tutkielmassa esitettiin näillä tekniikoilla syntesoituja polyfenolisia polymeerejä ja niiden tutkimustuloksia. Melkein jokainen polyfenolipolymeeri osoittautui tehokkaammaksi lääketieteellisessä aktiivisuudessa verrattaessa vapaaseen monomeeriinsa. Useat polymeerit osoittautuivat myös kestävämmiksi esimerkiksi korkeille lämpötiloille altistuessaan. Vain yksi esitetyistä entsyymikatalysoiduista synteeseistä ei tuottanut polymeerejä.

Polyfenolien polymerisaatiota on siis kehitetty viime vuosikymmenten aikana ja tulokset ovat osoittaneet paljon potentiaalia. Tulevaisuudessa näitä polymeerejä voitaisiin soveltaa lääketieteessä hoitamaan ja ennaltaehkäisemään useita sairauksia kestävästi kuluttamatta uusiutumattomia luonnonvaroja ja siksi näiden tekniikoiden kehittäminen tulee myös jatkossa olemaan tutkimuksen mielenkiinnon kohteena.

6 Lähteet

- [1] K. B. Pandey ja S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human," *Landes Bioscience*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
- [2] H. Cao *et al.*, "Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing," *Food Frontiers*, vol. 2, no. 2. John Wiley and Sons Inc, pp. 109–139, Jun. 01, 2021. doi: 10.1002/fft2.65.
- [3] L. Bravo, "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance," *Nutr Rev*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333, 1998.
- [4] B. Uttara, A. V Singh, P. Zamboni, ja R. T. Mahajan, "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options," 2009.
- [5] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, ja D. Offen, "Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier," 2001. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/neuropharm
- [6] J. Xiao, "Recent advances on the stability of dietary polyphenols," *eFood*, vol. 3, no. 3. John Wiley and Sons Inc, Jun. 01, 2022. doi: 10.1002/efd2.21.
- [7] S. Oliver, O. Vittorio, G. Cirillo, ja C. Boyer, "Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules," *Polymer Chemistry*, vol. 7, no. 8. Royal Society of Chemistry, pp. 1529–1544, Feb. 28, 2016. doi: 10.1039/c5py01912e.
- [8] T. Doco, N.-E. Es-Safi, ja V. Cheynler Michel Moutounet, "Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry," 1996.
- [9] Y. J. Kim, J. E. Chung, M. Kurisawa, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Regioselective synthesis and structures of (+)-catechin-aldehyde polycondensates," *Macromol Chem Phys*, vol. 204, no. 15, pp. 1863–1868, Oct. 2003, doi: 10.1002/macp.200350041.
- [10] Y. J. Kim, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 320, no. 1, pp. 256–261, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.163.
- [11] N. Sahiner, "One step poly(quercetin) particle preparation as biocolloid and its characterization," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 452, no. 1, pp. 173–180, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.03.097.
- [12] N. Sahiner, "One step poly(rutin) particle preparation as biocolloid and its characterization," *Materials Science and Engineering C*, vol. 44, pp. 9–16, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.08.009.
- [13] N. Sahiner, S. Sagbas, ja N. Aktas, "Single step natural poly(tannic acid) particle preparation as multitalented biomaterial," *Materials Science and Engineering C*, vol. 49, pp. 824–834, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.01.076.
- [14] S. Kobayashi, H. Uyama, ja S. Kimura, "Enzymatic polymerization," *Chemical Reviews*, vol. 101, no. 12, pp. 3793–3818, Dec. 2001. doi: 10.1021/cr9901211.
- [15] M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. J. Kim, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Amplification of antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition of catechin by enzymatic polymerization," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 3, pp. 469–471, May 2003, doi: 10.1021/bm034012z.
- [16] M. E. Khlupova *et al.*, "Enzymatic polymerization of dihydroquercetin using bilirubin oxidase," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 80, no. 2, pp. 233–241, 2015, doi: 10.1134/S0006297915020108.
- [17] R. M. Desentis-Mendoza *et al.*, "Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 6, pp. 1845–1854, Jun. 2006, doi: 10.1021/bm060159p.
- [18] M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin)," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 5, pp. 1394–1399, Sep. 2003, doi: 10.1021/bm034136b.
- [19] F. F. Bruno *et al.*, "Enzymatic synthesis and characterization of polyquercetin," *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 1191–1196, Dec. 2010, doi: 10.1080/10601325.2010.518839.

- [20] M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin)," *Macromol Biosci*, vol. 3, no. 12, pp. 758–764, Dec. 2003, doi: 10.1002/mabi.200300038.
- [21] L. Mejias, M. H. Reihmann, S. Sepulveda-Boza, ja H. Ritter, "New polymers from natural phenols using horseradish or soybean peroxidase," *Macromol Biosci*, vol. 2, no. 1, pp. 24–32, 2002, doi: 10.1002/1616-5195(20020101)2:1<24::AID-MABI24>3.0.CO;2-6.
- [22] M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Oxidative coupling of epigallocatechin gallate amplifies antioxidant activity and inhibits xanthine oxidase activity," *Chemical Communications*, vol. 4, no. 3, pp. 294–295, 2004, doi: 10.1039/b312311a.
- [23] S. Hamada *et al.*, "Peroxidase-catalyzed generation of catechin oligomers that inhibit glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 143, no. 1, pp. 35–40, Sep. 1996, doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08458.x.
- [24] M. Božič, S. Gorgieva, ja V. Kokol, "Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin," *Carbohydr Polym*, vol. 89, no. 3, pp. 854–864, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.04.021.
- [25] N. Mita, S.-I. Tawaki, H. Uyama, ja S. Kobayashi, "Molecular weight control of polyphenols by enzymatic copolymerization of phenols," 2001.
- [26] B. Neises ja W. Steglich, "Simple method for the esterification of carboxylic acids," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 17, no. 7, pp. 522–524, 1978, doi: 10.1002/anie.197805221.
- [27] N. Nakajima ja Y. Ikada, "Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media," 1995. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [28] A. O. Aytakin, S. Morimura, ja K. Kida, "Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities," *J Biosci Bioeng*, vol. 111, no. 2, pp. 212–216, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.09.018.
- [29] Y. Li *et al.*, "Resveratrol-conjugated poly - Caprolactone facilitates in vitro mineralization and in vivo bone regeneration," *Acta Biomater*, vol. 7, no. 2, pp. 751–758, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.09.008.
- [30] F. Lee, J. E. Chung, K. Xu, ja M. Kurisawa, "Injectable degradation-resistant hyaluronic acid hydrogels cross-linked via the oxidative coupling of green tea catechin," *ACS Macro Lett*, vol. 4, no. 9, pp. 957–960, Sep. 2015, doi: 10.1021/acsmacrolett.5b00544.
- [31] M. Curcio, U. G. Spizzirri, G. Cirillo, T. Spataro, N. Picci, ja F. Iemma, "Tailoring flavonoids antioxidant properties through covalent immobilization into dual stimuli responsive polymers," *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 64, no. 11, pp. 587–596, Oct. 2015, doi: 10.1080/00914037.2014.996708.
- [32] F. Iemma *et al.*, "Ferulic acid as a comonomer in the synthesis of a novel polymeric chain with biological properties," *J Appl Polym Sci*, vol. 115, no. 2, pp. 784–789, Jan. 2010, doi: 10.1002/app.31067.
- [33] G. Cirillo *et al.*, "Quercetin nanocomposite as novel anticancer therapeutic: Improved efficiency and reduced toxicity," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 49, no. 3, pp. 359–365, 2013, doi: 10.1016/j.ejps.2013.04.008.
- [34] F. Puoci *et al.*, "Anticancer activity of a quercetin-based polymer towards HeLa cancer cells," *Anticancer Res*, vol. 32, pp. 2843–2848, 2012.
- [35] O. I. Parisi *et al.*, "Antioxidant and spectroscopic studies of crosslinked polymers synthesized by grafting polymerization of ferulic acid," *Polym Adv Technol*, vol. 21, no. 11, pp. 774–779, Nov. 2010, doi: 10.1002/pat.1499.
- [36] U. G. Spizzirri *et al.*, "Antioxidant-polysaccharide conjugates for food application by eco-friendly grafting procedure," *Carbohydr Polym*, vol. 79, no. 2, pp. 333–340, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.08.010.
- [37] J. Liu, J. feng Lu, J. Kan, Y. qing Tang, ja C. hai Jin, "Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan," *Int J Biol Macromol*, vol. 62, pp. 85–93, 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.08.040.
- [38] O. Vittorio *et al.*, "Dextran-catechin conjugate: A potential treatment against the pancreatic ductal adenocarcinoma," *Pharm Res*, vol. 29, no. 9, pp. 2601–2614, Sep. 2012, doi: 10.1007/s11095-012-0790-9.

- [39] G. Cirillo *et al.*, “Starch-quercetin conjugate by radical grafting: Synthesis and biological characterization,” *Pharm Dev Technol*, vol. 17, no. 4, pp. 466–476, Jul. 2012, doi: 10.3109/10837450.2010.546413.