



Università degli Studi di
Palermo



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della
Ricerca

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia
Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche

DOTTORATO DI RICERCA
IN

Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive
XXII CICLO, A.A. 2007/2008

SSD CHIM/09

STUDIO DI SISTEMI DI INTERESSE
FARMACEUTICO MEDIANTE ANALISI
CALORIMETRICA E DI TENSIONE SUPERFICIALE

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca della

Dott.ssa Sara Ottimo

Tutor:

Ch.mo Prof. Francesco Castelli

INDICE

PREMESSA	pag. 1
INTRODUZIONE	pag. 2
Liposomi come modelli di membrana biologica	pag. 2
Tecniche impiegate per lo studio d'interazione con i modelli di biomembrana:	
a) Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)	pag. 9
b) Langmuir-Blodgett	pag. 12
CAPITOLO 1	
Caratterizzazione di nuovi sistemi per il Drug Delivery: idrogel e micelle polimeriche.	pag. 18
1.1. Rilascio di farmaci da un idrogel di inulina derivatizzata con anidride metacrilica e acido succinico	pag. 18
1.2. Micelle polimeriche come carrier di farmaci	pag. 21
1.3. R-Flurbiprofene	pag. 24
1.4. Materiali	pag. 25
1.5. Derivatizzazione dell'inulina con anidride metacrilica ed anidride succinica (INU-MA-SA)	pag. 26
1.6. Caratterizzazione del derivato INU-MA-SA	pag. 27
1.7. Preparazione dell'idrogel mediante irradiazione dell'INU-MA-SA con raggi UV	pag. 28
1.8. Studi di swelling	pag. 28
1.9. Studi di degradazione chimica "in vitro" dell'idrogel di INU-MA-SA	pag. 28
1.10. Studi di degradazione enzimatica "in vitro" del derivato INU-MA-SA o dell'idrogel in presenza di inulinasi	pag. 29
1.11. Analisi TLC	pag. 29
1.12. Metodo dell'antrone	pag. 29
1.13. Incorporazione del diflunisal nell'idrogel di INU-MA-SA	pag. 30
1.14. Determinazione della quantità di farmaco negli idrogeli di INU-MA-SA	pag. 30
1.15. Sintesi del PHEA-EDA, PHEA-EDA-PS ₈₀ , e del copolimero PHEA-EDA-PS ₈₀ -PLA	pag. 30
1.16. Preparazione delle micelle di PHEA-EDA-PS ₈₀ -PLA contenenti R-Flu	pag. 32

1.17. Interazione tra le biomembrane modello ed i farmaci	pag. 32
1.18. Cinetiche di rilascio	pag. 34
1.19. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 36
1.19.1. Derivatizzazione dell'INU e caratterizzazione dell'INU-MA-SA	pag. 36
1.19.2. Studi di swelling	pag. 40
1.19.3. Degradazione chimica	pag. 41
1.19.4. Degradazione enzimatica	pag. 42
1.19.5. Incorporazione del diflunisal nella matrice di INU-MA-SA	pag. 43
1.19.6. Interazione tra le biomembrane modello ed i farmaci	pag. 43
1.19.7. Cinetiche di rilascio.	pag. 48
1.20. CONCLUSIONI	pag. 61

CAPITOLO 2

Interazione ed assorbimento di derivati del resveratrolo con modelli di biomembrana: studio degli effetti di variazioni strutturali.	pag. 62
2.1. Il resveratrolo ed i suoi analoghi	pag. 62
2.2. Le ciclodestrine	pag. 64
2.3. Materiali	pag. 66
2.4. Sintesi del 3,5,4'-trimetilresveratrolo	pag. 67
2.5. Sintesi del 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1)	pag. 68
2.6. Sintesi del 3,5,3',4'-tetrametossistilbene (CT-D)	pag. 69
2.7. Interazione MLV DMPC/composti	pag. 70
2.8. Cinetiche di permeazione	pag. 71
2.9. Esperimenti di stabilità MLV DMPC/3,5,4'-trimetilresveratrolo	pag. 72
2.10. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)	pag. 73
2.11. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 74
2.11.1. Interazione MLV DMPC/composti	pag. 74
2.11.2. Cinetiche di permeazione	pag. 74
2.11.3. Esperimenti di stabilità MLV DMPC/3,5,4'-trimetilresveratrolo	pag. 81
2.11.4. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)	pag. 85
2.11.5. CONCLUSIONI	pag. 96

CAPITOLO 3

Analisi calorimetrica dell'interazione e dell'assorbimento di acidi grassi ω-3 con modelli di biomembrana.	pag. 98
3.1. Acidi grassi ω -3	pag. 98
3.2. Materiali	pag. 99
3.3. Interazione MLV DMPC/acidi grassi ω -3	pag. 100
3.4. Cinetiche di permeazione	pag. 101
3.5. Cinetiche di trasferimento transmembrana	pag. 101
3.6. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 102
3.6.1. Interazione MLV DMPC/ acidi grassi ω -3	pag. 102
3.6.2. Cinetiche di permeazione	pag. 105
3.6.3. Cinetiche di trasferimento transmembrana	pag. 108
3.7. CONCLUSIONI	pag. 110

CAPITOLO 4

Analisi di prodrug lipofili di farmaci ottenuti per coniugazione con lo Squalene: studi di Calorimetria a Scansione Differenziale e Langmuir-Blodgett.	pag. 111
4.1. L'Aciclovir	pag. 113
4.2. La Citosina Arabinoside	pag. 115
4.3. Il Paclitaxel	pag. 117
4.4. Materiali	pag. 118
4.5. Sintesi dello SqualeneCOOH	pag. 118
4.6. Sintesi dell'Aciclovir-Squalene	pag. 120
4.7. Sintesi dell'AraC-Squalene	pag. 122
4.8. Sintesi del Paclitaxel-Squalene	pag. 123
4.9. Interazione MLV DMPC/composti	pag. 124
4.10. Cinetiche di trasferimento transmembrana	pag. 125
4.11. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)	pag. 126
4.12. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 126
4.12.1. Interazione MLV DMPC/composti	pag. 126
4.12.2. Cinetiche di trasferimento transmembrana	pag. 136
4.12.3. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)	pag. 141

CAPITOLO 5

Assorbimento di idrocarburi policiclici aromatici nitrosostituiti attraverso modelli di biomembrana: effetto della lipofilia del mezzo.	pag. 169
5.1. Idrocarburi Policiclici Aromatici Nitrosostituiti (nitro-IPA)	pag. 169
5.2. Materiali	pag. 170
5.3. Interazione MLV di DMPC/nitro-IPA	pag. 170
5.4. Cinetiche di permeazione	pag. 171
5.5. Cinetiche di trasferimento transmembrana	pag. 171
5.6. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 172
5.6.1. Interazione MLV DMPC/nitro-IPA	pag. 172
5.6.2. Cinetiche di permeazione	pag. 175
5.6.3. Cinetiche di trasferimento transmembrana	pag. 177
5.7. CONCLUSIONI	pag. 181

CAPITOLO 6

Interazione di cumarine con biomembrane modello: studio mediante Calorimetria a Scansione Differenziale e Langmuir-Blodgett.	pag. 182
6.1. Le cumarine	pag. 182
6.2. Interazione MLV DMPC/cumarine	pag. 183
6.3. Cinetiche di permeazione	pag. 184
6.4. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)	pag. 184
6.5. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 185
6.5.1. Interazione MLV DMPC/cumarine	pag. 185
6.5.2. Cinetiche di permeazione	pag. 189
6.5.3. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)	pag. 192

RINGRAZIAMENTI	pag. 197
-----------------------	----------

BIBLIOGRAFIA	pag. 198
---------------------	----------

PREMESSA

La membrana biologica rappresenta un'importante interfaccia per le cellule, essa costituisce la matrice per le proteine e, inoltre, funge da barriera selettiva mantenendo le differenze tra il contenuto cellulare interno e l'ambiente esterno regolando la diffusione delle molecole. Anche i modelli sperimentali di biomembrana hanno le medesime caratteristiche, essi sono sistemi semplici e convenienti per riprodurre le proprietà delle membrane. I bilayer fosfolipidici, incluse le vescicole, sono stati ampiamente impiegati come modelli di biomembrana, infatti tra tutti i modelli sperimentali proposti è stato accettato quello secondo il quale i lipidi nelle membrane si trovano in una configurazione a doppio strato con le teste polari rivolte sulla superficie della membrana e le code idrocarburiche apolari verso l'interno. Vista l'importanza del bilayer lipidico, nel preservare la struttura e le funzioni della membrana, la ricerca si è dedicata sempre di più allo studio delle proprietà dei lipidi con diverse tecniche chimico-fisiche.

I fosfolipidi mostrano un mesomorfismo termotropico, perciò le loro proprietà possono essere studiate con la tecnica della calorimetria. Lo studio dei fosfolipidi ha riguardato lipidi puri, sintetici e la loro interazione con molecole biologicamente attive.

Qualsiasi sostanza biologicamente attiva, naturale, sintetica o anche un farmaco, per espletare un effetto deve attraversare le membrane cellulari. Per questo è importante riuscire a determinare sia l'entità dell'interazione con la membrana biologica che il profilo cinetico con cui questi composti interagiscono e quindi capire quali sono i fattori che influiscono su queste interazioni. Alcuni farmaci somministrati per via endovenosa sono facilmente e velocemente degradati nel plasma trasformandosi nei corrispondenti derivati inattivi. Per ovviare a tale inconveniente si ricorre all'uso di prodrug. I prodrug lipofili hanno la duplice funzione di rendere il farmaco maggiormente adatto all'inserimento nella vescicola lipidica, e di fornire una protezione chimica del gruppo funzionale. Inoltre, le forme farmaceutiche convenzionali presentano diversi inconvenienti tra cui una durata d'azione del principio attivo troppo breve, con conseguenti frequenti somministrazioni che possono dar vita a fenomeni di accumulo e quindi tossicità. Spesso sono necessarie dosi elevate a causa di una scarsa specificità d'organo ed a causa delle proprietà chimico-fisiche sfavorevoli del farmaco. Per evitare questi problemi è possibile impiegare i "*Drug Delivery Systems*".

INTRODUZIONE

Liposomi come modelli di membrana biologica

In tutti gli organismi viventi ogni cellula è circondata da un sottile rivestimento, detto membrana citoplasmatica, che ha la funzione di delimitare la cellula, di separarla dall'ambiente esterno con il quale regola gli scambi. La membrana è composta principalmente da fosfolipidi disposti a formare un doppio strato lipidico (Figura 1), secondo il "modello a mosaico fluido" proposto nel 1972 da Singer e Nicholson (*Singer S.J. and Nicholson G.L., 1972*). Nella componente lipidica si vanno a collocare proteine, una piccola percentuale di glucidi (glicoproteine e glicolipidi), e molecole di colesterolo.

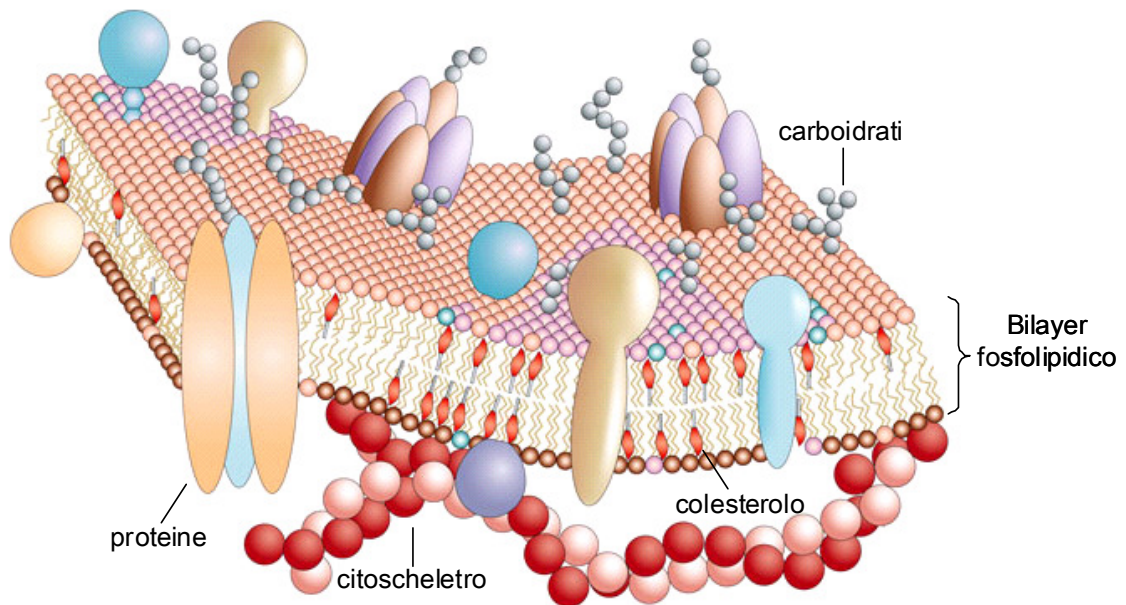


Figura 1. Rappresentazione in sezione longitudinale di una membrana plasmatica.

Il fosfolipide è costituito da una porzione idrofila (testa polare) e da una porzione idrofoba (catena idrocarburica), esiste una grande varietà di fosfolipidi, la cui struttura si differenzia in base alla natura delle teste polari e delle code idrofobiche.

Nella Figura 2 è riportata la diversa rappresentazione schematica della struttura chimica dei fosfolipidi: due catene idrocarburiche non polari sono esterificate con il glicerolo e con un gruppo fosfato, a sua volta legato ad un gruppo alcolico; se il gruppo

alcolico legato appartiene, per esempio, alla colina si ottiene la fosfatidilcolina (PC), uno tra i costituenti principali dei fosfolipidi nelle membrane cellulari.

Essa, a pH fisiologico esiste in forma zwitterionica, possedendo una carica negativa sul gruppo fosfato e una carica positiva sul gruppo ammonio quaternario. Se, invece, al gruppo fosfato è attaccata l'etanolammina, il risultante fosfolipide è chiamato fosfatidiletanolammina (PE), un altro costituente dei fosfolipidi di membrana che possiede una carica positiva sul gruppo amminico. Tale gruppo può essere deprotonato a pH 9-10 e dare un gruppo amminico non carico.

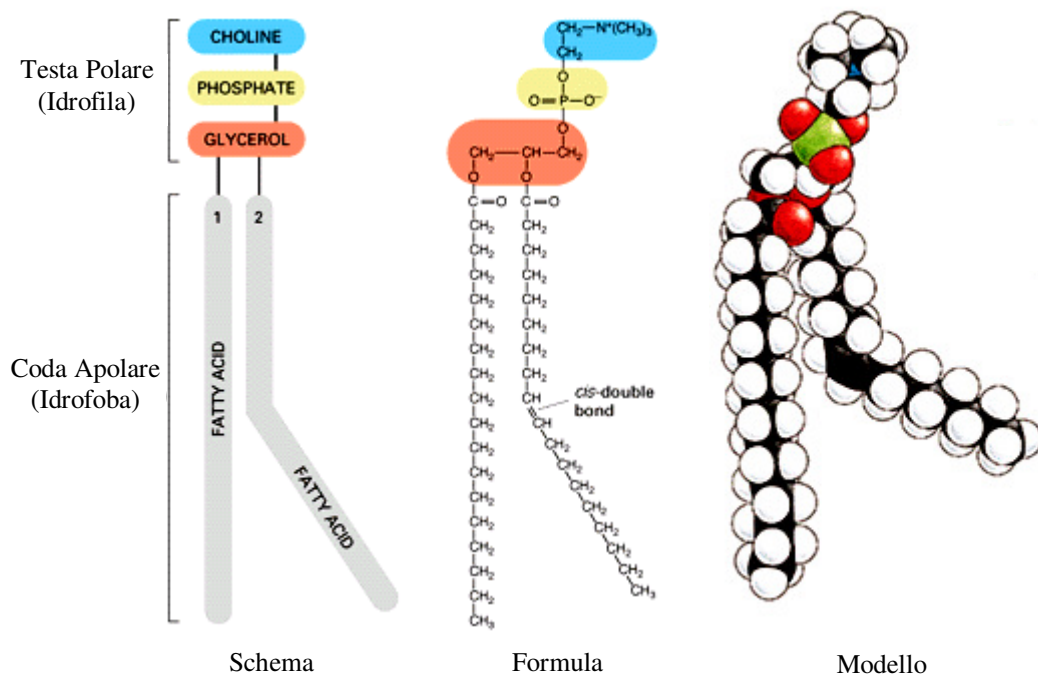


Figura 2. Rappresentazione grafica della struttura dei fosfolipidi.

La fosfatidilserina (PS) contiene, sul gruppo fosfato e sul gruppo carbossilico una carica negativa, mentre sul gruppo amminico è localizzata una carica positiva: questo lipide esibisce, perciò, a pH neutro una carica totale negativa. Essa è un fosfolipide acido perché contiene nella molecola un solo gruppo amminico, una funzione carbossilica acida dissociabile come anione ed un gruppo ossidrilico non esterificato dell'acido fosforico, anch'esso quindi dissociato in forma anionica. Quando i due ossidrili in posizione 1 e 2 del glicerolo sono esterificati con due acidi grassi e l'ossidrilico in posizione 3 con l'acido fosforico, il fosfolipide è chiamato acido fosfatidico (PA).

I fosfolipidi, nel formare il doppio strato lipidico della membrana, si dispongono in modo tale da orientare la coda apolare, costituita dalle catene idrocarburiche degli acidi grassi, verso la zona più interna del bilayer (strato idrofobico) e la testa polare, costituita da glicerolo e basi organiche, verso il mezzo acquoso all'esterno e all'interno della membrana. Questa disposizione determina la carica superficiale della membrana cellulare.

Nello studio delle proprietà delle membrane biologiche si ricorre spesso a sistemi modello (liposomi) preparati con fosfolipidi sia sintetici (dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC; dimiristoilfosfatidilcolina, DMPC; acido dimiristoilfosfatidico, DMPA; dilaurilfosfatidilcolina, DLPC) che naturali (fosfatidilcoline, PC; fosfatidilserine, PS; fosfatidilglicerolo, PG; etc.) (*Taylor K.M.G. et al., 1995*). In particolare, utilizzando opportune miscele di questi fosfolipidi è possibile creare un sistema modello che riproduca la carica superficiale negativa delle membrane cellulari.

Con il termine liposomi si indicava originariamente una dispersione acquosa di vescicole lipidiche multilamellari (MLV), prodotte per agitazione meccanica di un mezzo acquoso in presenza di un film di lipide disidratato. Nell'uso corrente, invece, con tale termine si descrivono sospensioni acquose di vescicole lipidiche indipendentemente dalle loro dimensioni o dalla loro natura.

La duttilità del sistema liposomiale, la cui composizione può essere variata in funzione delle esigenze sia terapeutiche sia formulative, ha reso possibile lo sviluppo di alcune linee di ricerca quali l'utilizzo dei liposomi come modelli di membrana per studiare i meccanismi e le cinetiche di trasporto di varie specie molecolari presentandosi strutturalmente simili alle membrane cellulari (Tabella 1).

Tabella 1. Confronto tra membrane cellulari e doppi strati lipidici artificiali.

	Spessore	Capacità	Resistenza	Potenziale di rottura	Permeabilità all'acqua
Membrana Cellulare	6-10 nm	0,5-1,3 $\mu\text{F cm}^{-2}$	10^2 - 10^5 $\Omega \text{ cm}^2$	>150 mV	$<10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$
Membrana Artificiale	4,5-8 nm	0,3-1,3 $\mu\text{F cm}^{-2}$	10^6 - 10^9 $\Omega \text{ cm}^2$	100-200 mV	$4 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$

I liposomi, inoltre, sono, già da tempo, largamente studiati come potenziali “carrier” per modificare il comportamento farmacocinetico di diversi farmaci (*Castelli F. et al., 1997; 1998; 2000a; 2000b; Raudino A. et al., 1998*).

I fosfolipidi le cui aree delle loro sezioni trasversali a livello delle code idrofobiche e delle teste polari sono circa uguali, se dispersi in un mezzo acquoso hanno la capacità di formare spontaneamente doppi strati, aggregandosi in modi differenti (Figura 3).

Le strutture vescicolari, cioè quelle sferoidali delimitate da uno o più doppi strati fosfolipidici, aventi un diametro compreso tra 20 nm e 20 µm sono dette "liposomi".

In queste strutture i fosfolipidi sono organizzati in modo tale da formare uno o più strati concentrici, detti *lamelle*, separati da uno o più strati acquosi (rispettivamente liposomi unilamellari e multilamellari), come in Figura 4.

In base al metodo di preparazione si possono ottenere diversi tipi di liposomi, che possono essere così classificati:

- Multilamellar Vesicles (MLV);
- Large Unilamellar Vesicles (LUV);
- Small Unilamellar Vesicles (SUV).

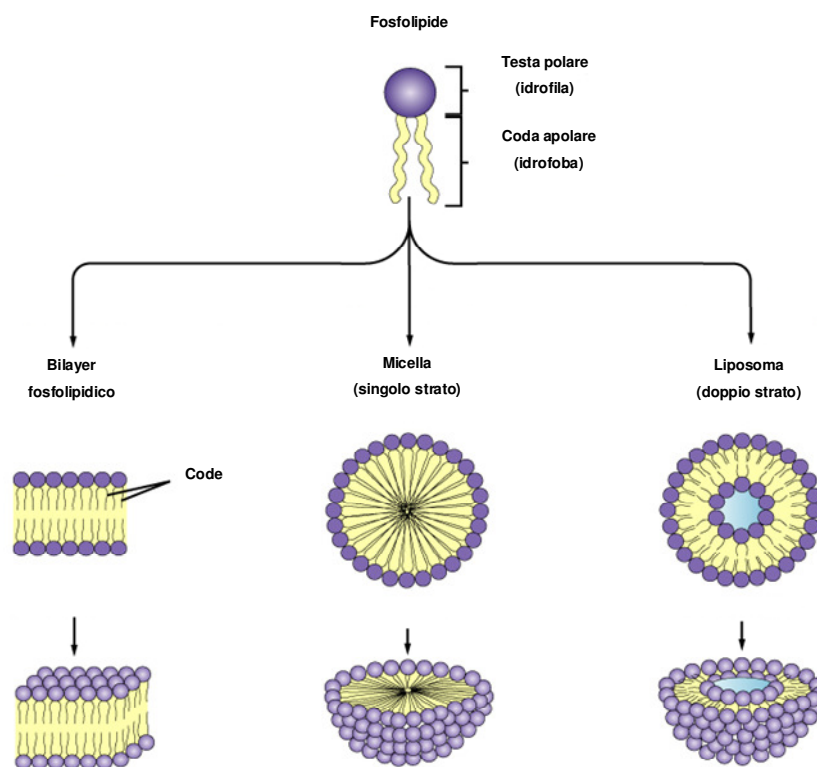


Figura 3. Fosfolipidi in ambiente acquoso: doppi strati, micelle e vescicole chiuse a doppi strati (liposomi).

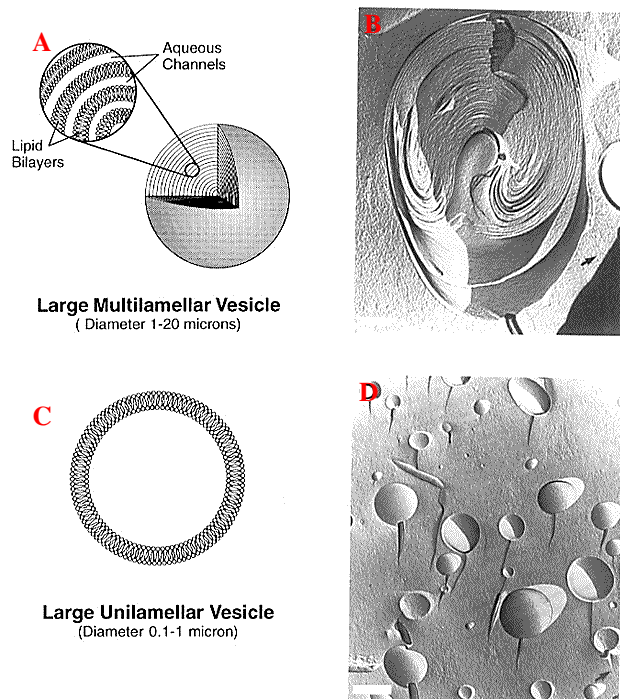


Figura 4. Vescicole Multilamellari (MLV): (A) rappresentazione schematica; (B) MLV al microscopio elettronico. Vescicole Unilamellari (LUV): (C) rappresentazione schematica; (D) LUV al microscopio elettronico. La tecnica utilizzata è la *freeze fracture electron microscopy*.

La natura anfifilica dei liposomi permette il loro uso come *drug delivery system*, dal momento che all'interno delle lamelle le sostanze si possono collocare in maniera differente in funzione della loro idrofilia, infatti:

- le sostanze idrosolubili sono intrappolate negli spazi acquosi tra le lamelle o nello spazio acquoso interno dei liposomi;
- le sostanze liposolubili trovano collocazione tra le catene idrofobiche degli acidi grassi;
- le sostanze anfotere si possono collocare con la parte idrofila all'esterno dei bilayer e con la parte idrofoba all'interno.

L'analisi termica, ed in particolare la Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) è stata largamente usata per studiare i sistemi liposomiali. I fosfolipidi, infatti, quando sono idratati presentano caratteristiche liotrope, cioè l'esistenza di differenti fasi, quali gel e cristallo liquido, in funzione della differente percentuale d'acqua e della temperatura (*Taylor K.M.G. et al., 1995*).

Come si può osservare dal diagramma di fase della DPPC riportato nella Figura 5, al variare della percentuale d'acqua si ha una transizione di fase gel-cristallo liquido,

caratterizzata sia da una temperatura di transizione, T_m , che da una variazione d'entalpia, ΔH .

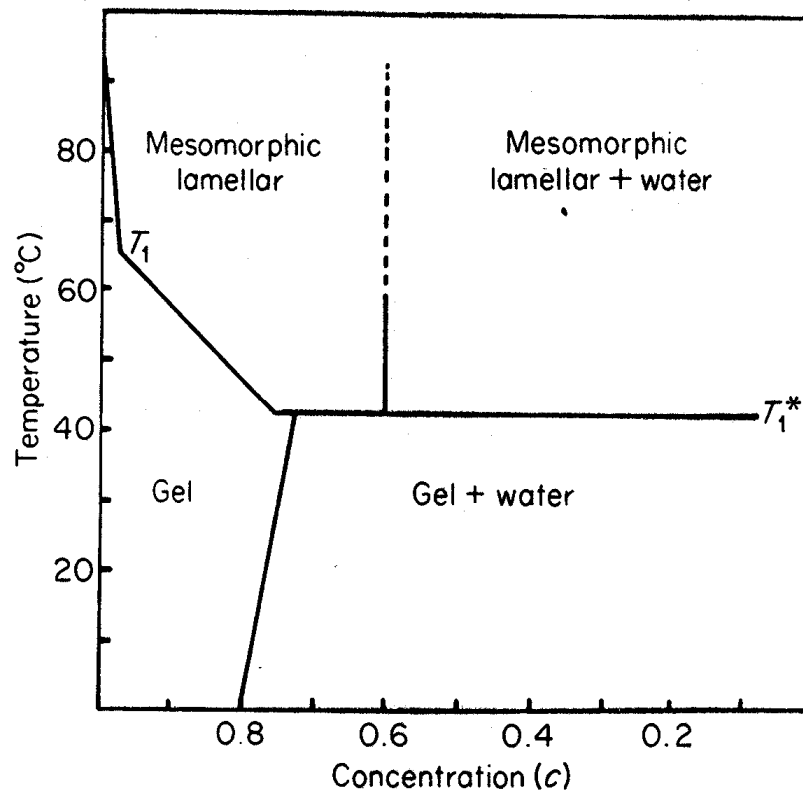


Figura 5. Diagramma di fase del sistema 1,2-dipalmitoil-L-fosfatidilcolina/H₂O.

Nei casi in cui la percentuale d'idratazione è superiore al 18 % in peso d'acqua si può osservare, per una temperatura inferiore alla temperatura di transizione della sostanza l'esistenza di una fase gel (solida-cristallina), dove le catene alifatiche dei fosfolipidi si orientano parallelamente le une alle altre, con i gruppi metilenici in configurazione "tutta trans", come si può osservare in Figura 6. In questa fase le catene sono impaccate saldamente e la loro libertà di movimento è ristretta (fase L_β). Al di sopra della temperatura di transizione, si osserva l'esistenza di una fase liquida cristallina (fase L_α), dove le catene alifatiche sono più mobili e presentano una conformazione "cis" causando la distruzione dell'orientamento ordinato del layer lipidico (fusione delle catene).

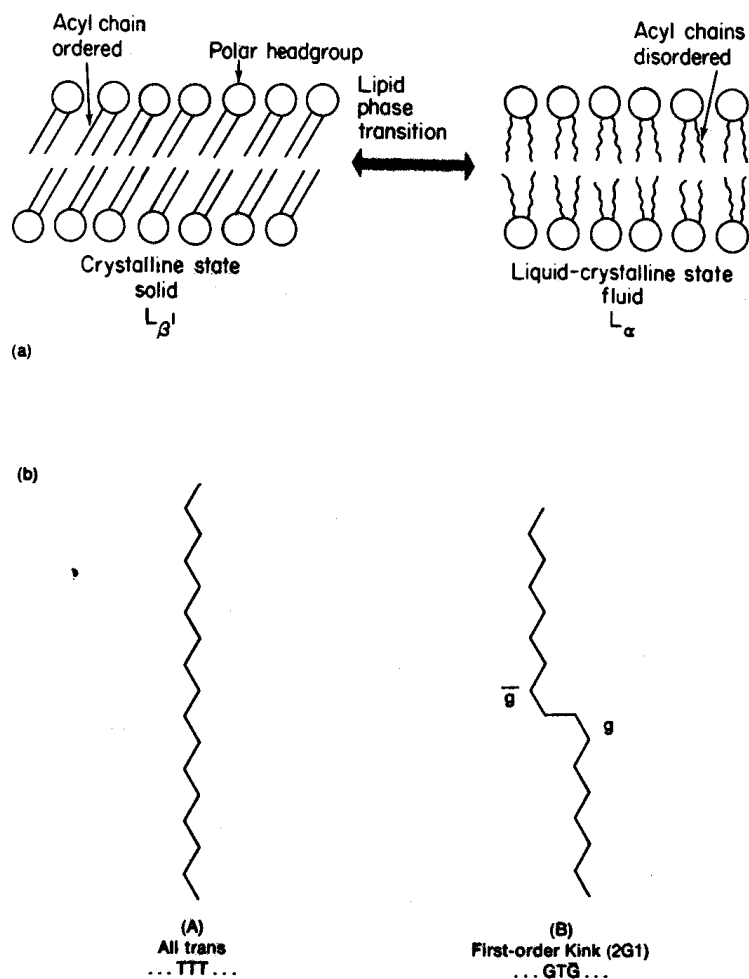


Figura 6. Transizione di fase di fosfolipidi.

La temperatura di transizione rappresenta un'importante caratteristica di tutte le membrane, costituite da fosfolipidi, ed é notevolmente influenzata dalla natura delle catene alifatiche e da quella del gruppo polare del fosfolipide. I parametri derivati dalle analisi DSC comprendono la temperatura di transizione, T_m , e la variazione di entalpia, ΔH . Nella Figura 7 è riportato il picco endotermico della transizione gel-cristallo liquido $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ dei liposomi di DMPC. L'interazione di una sostanza con il bilayer fosfolipidico può causare la depressione della temperatura di transizione, T_m , gel-cristallo liquido (rilevabile calorimetricamente), in accordo con il modello di Van't Hoff.

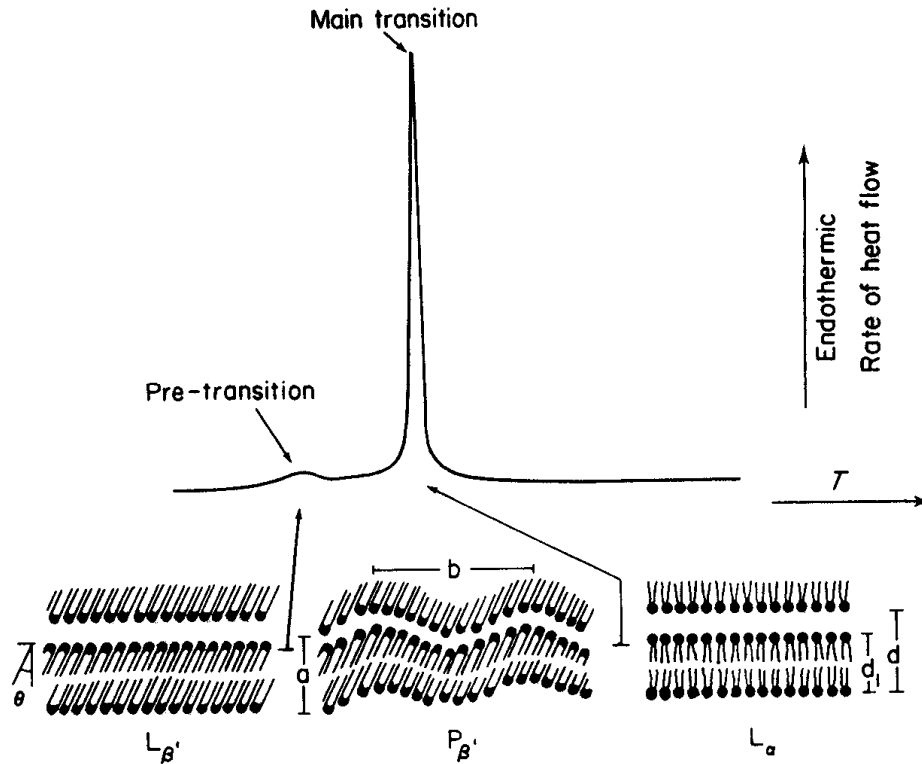


Figura 7. Tracciato calorimetrico della transizione di fase gel-cristallo liquido di liposomi di DMPC.

Tecniche impiegate per lo studio d'interazione con i modelli di biomembrana:

a) Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

Una sostanza quando subisce una modificazione fisica, ad esempio una fusione o una transizione da uno stato cristallino ad un altro, o quando reagisce chimicamente, assorbe o libera energia, generalmente sotto forma di calore.

La Calorimetria a Scansione Differenziale è una tecnica che consente di determinare, durante una scansione effettuata con incrementi lineari della temperatura, la variazione d'entalpia di processo mediante misura del flusso di calore necessario per mantenere il campione della sostanza in esame alla stessa temperatura di un campione di riferimento (inerte). La tecnica consente, altresì, di eseguire misure di capacità termica, d'emissività termica e di purezza di campioni solidi; inoltre essa consente lo studio di equilibri di fase e della cinetica dei processi (*Gao D. et al., 1997*).

Uno dei campi d'indagine della Calorimetria a Scansione Differenziale è costituito dallo studio del comportamento termotropico di dispersioni acquose di lipidi, in quanto permette il calcolo delle variazioni entalpiche (dall'integrazione dell'area

delle curve calorimetriche) ed entropiche (essendo il valore di T_m uguale al rapporto $\Delta H^\circ/\Delta S^\circ$) che accompagnano le transizioni di fase di tipo gel-cristallo liquido. Registrando il flusso di calore in funzione della temperatura, $\Delta H / \Delta T$, si ottiene un grafico caratteristico, termogramma, che indica la natura del processo (endotermico o esotermico) e la temperatura degli eventi termici, ma anche l'entità dei medesimi (Figura 8).

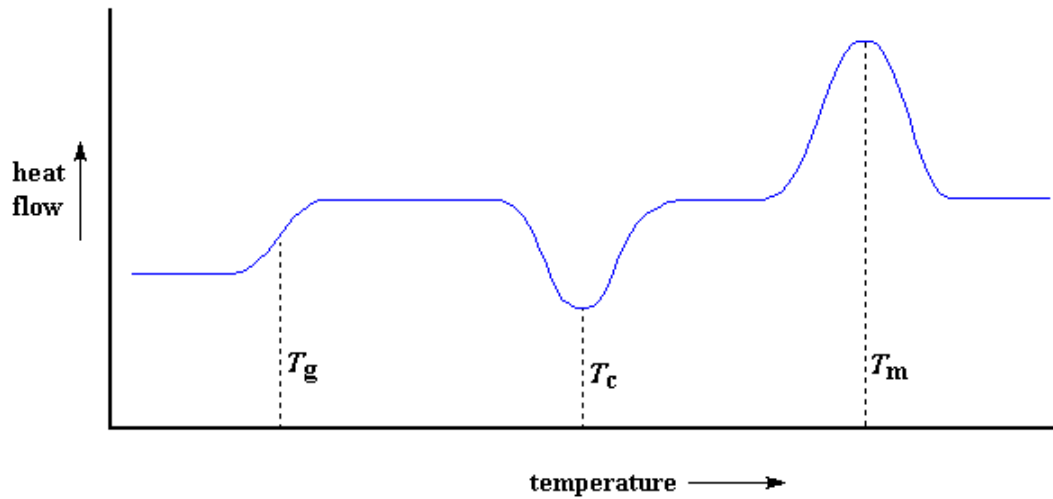


Figura 8. Tipico termogramma DSC che mostra i processi endotermici o esotermici della transizione vetrosa (T_g), della cristallizzazione (T_c), della fusione (T_m).

Nella Figura 9 sono riportati i picchi endotermici relativi alle transizioni gel-cristallo liquido di fosfolipidi con catene aciliche a diversa lunghezza.

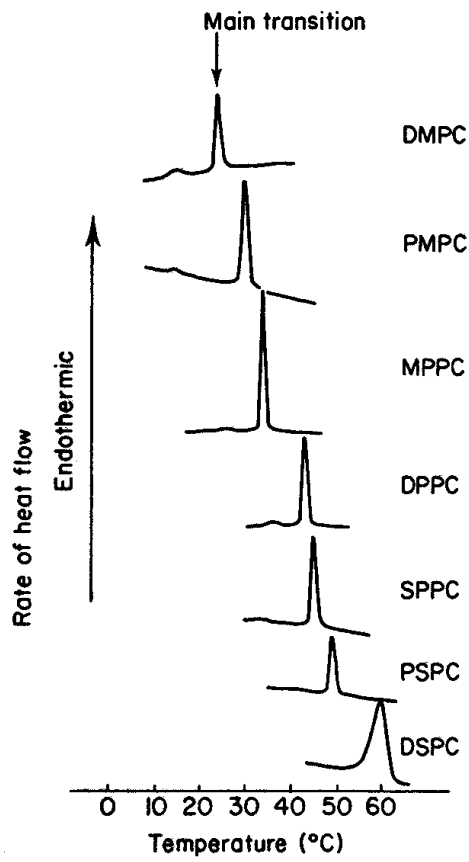


Figura 9. Curve DSC delle transizioni gel-cristallo liquido di fosfolipidi con differenti catene di acidi grassi.

Nella Figura 10 è riportato lo schema del Calorimetro a Scansione Differenziale utilizzato nella nostra ricerca.

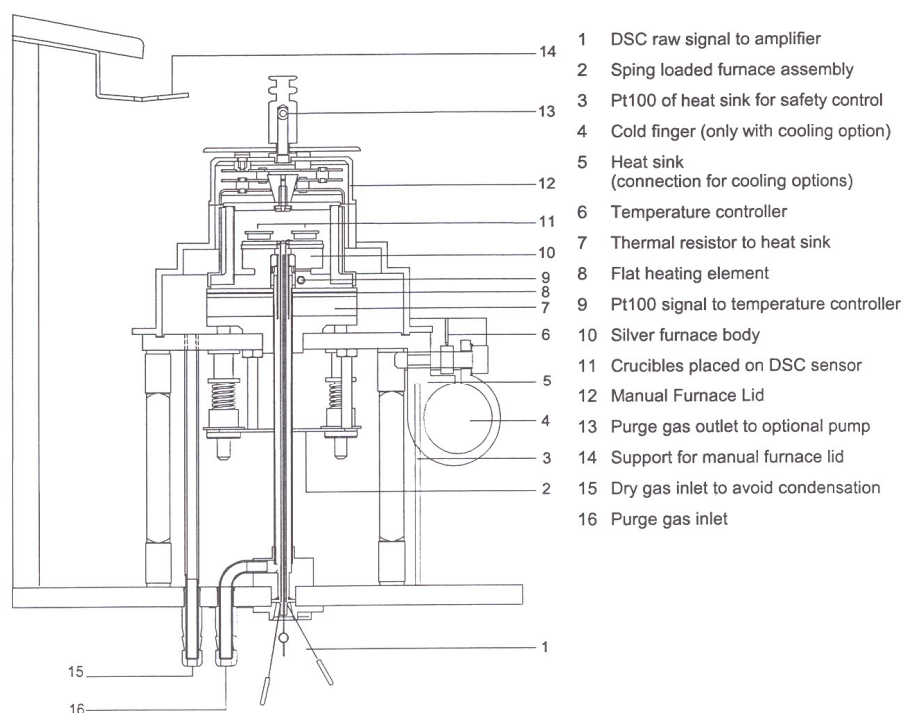


Figura 10. Rappresentazione schematica del sistema di Calorimetria Differenziale a Scansione, Mettler Toledo TA-STAR^e.

b) Langmuir-Blodgett

Nel 1917 Irving Langmuir osservò che le sostanze anfifiliche sono in grado di formare un monolayer, cioè un film di spessore monomolecolare, se adeguatamente deposte su una superficie acquosa (*Langmuir I., 1917*). Il monolayer è un sistema bidimensionale, generalmente studiato con il metodo del film-balance di Langmuir-Adam, (*Albrecht O. et al., 1978*) che in seguito a variazioni di pressione superficiale, area e temperatura, fornisce utili informazioni sulla distribuzione e sull'orientazione molecolare. Esso costituisce un valido strumento per lo studio dell'organizzazione dei fosfolipidi di membrana, che può essere affiancato alle notizie sulla permeabilità di membrana, documentate dai lavori sui liposomi (*Phillips M.C. and Chapman D., 1968*).

L'uso dei monolayer, come modello di membrana, deriva dal fatto che esso rappresenta la metà di un doppio strato lipidico (bilayer) e che possiede caratteristiche direttamente legate alle proprietà di quest'ultimo (*Cadenhead D.A., 1985*).

apparentemente più simile alle membrane naturali (Phillips M.C. and Chapman D., 1968). Il monolayer può essere considerato come un gas bidimensionale. Quando l'area disponibile al monolayer è tale che la distanza tra le molecole adiacenti è elevata, le interazioni sono deboli e in queste condizioni il monolayer ha un piccolo effetto sulla tensione superficiale dell'acqua. Se l'area disponibile al monolayer è ridotta da un sistema di barriere mobili, cominciano a manifestarsi effetti repulsivi tra le molecole del film. Quest'analogo bidimensionale di pressione è chiamata pressione di superficie (π) ed è data dalla seguente relazione (Gaines G.L., 1996):

$$\pi = \gamma^0 - \gamma$$

Dove γ^0 è la tensione di superficie del liquido puro e γ è la tensione di superficie del film.

Il metodo del film-balance permette quindi di ottenere diagrammi di fase dei fosfolipidi, rappresentabili generalmente con curve isoterme pressione superficiale/area per molecola ($\pi / \text{Å}^2$).

La Figura 11 mostra il sistema utilizzato per le misure di tensione superficiale.

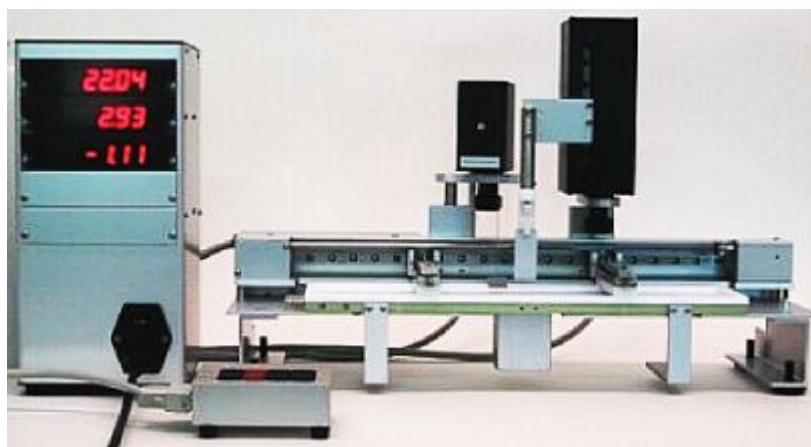


Figura 11. Strumento utilizzato per le misure su monolayers.

Lo strumento è formato da una vaschetta “minitrough” in Teflon[®], materiale idrofobico che permette di evitare eventuali perdite della subfase dai bordi. Il minitrough è termostato attraverso circolazione forzata di liquido refrigerante in canali posti sotto il bagno in teflon. L'area del bagno può essere variata attraverso delle barriere che si muovono sulla superficie della vasca.

Le barriere sono costituite da un materiale idrofilico, il Delrin (poliacetale). La tensione superficiale e la misura dell'area molecolare sono continuamente monitorate

durante la compressione. La pressione superficiale è misurata attraverso il metodo di Wilhelmy mediante una lamina molto sottile in platino.

La lamina è montata su una elettrobilancia e misura la forza, dovuta alla tensione superficiale, applicata sulla lamina sospesa e parzialmente immersa nella subfase. La forza viene convertita in tensione superficiale (mN/m) in base alle dimensioni della lamina e la pressione superficiale è ottenuta misurando la variazione della forza tra la superficie liquida senza e con il monostrato flottante, tale forza è influenzata dalla forza di gravità, dalla tensione superficiale e dalla spinta idrostatica dell'acqua. La sensibilità della misura può essere aumentata usando una lamina molto sottile (Figura 12).

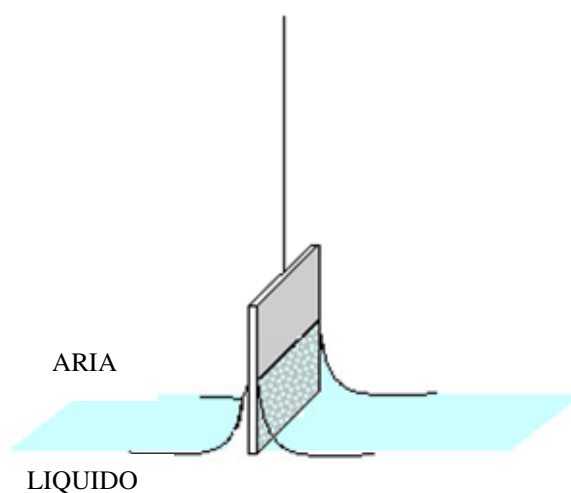


Figura 12. Rappresentazione della lamina usata nel metodo di Wilhelmy.

La tecnica prevede la deposizione del fosfolipide, mediante l'uso di un solvente adeguato, volatile ed immiscibile con l'acqua, su una subfase acquosa, in modo da permetterne una distribuzione monomolecolare ottimale ed una successiva variazione dell'area a disposizione. Il solvente deve essere in grado di portare totalmente in soluzione i composti, deve essere chimicamente inerte rispetto al materiale del film, deve essere facilmente purificabile per eliminare eventuali contaminanti grassi, che inficerebbero i risultati. Il trasferimento della soluzione, così ottenuta, sull'acqua è generalmente effettuata deponendo gocce con dimensioni dell'ordine dei micron sopra la superficie da coprire (mediante una siringa adatta). Si deve agire in modo da evitare la formazione di gocce troppo grosse che, per gravità, anziché restare sulla superficie dell'acqua, si disperderebbero all'interno della subfase alterando così il numero di

molecole che occupano l'area superficiale. Si lascia quindi riposare il film ottenuto, permettendo in questo modo l'evaporazione del solvente.

Tutte le molecole depositate restano sulla superficie acquosa, quindi si può ricavare direttamente il numero di molecole per unità di area di superficie, numero che può essere fatto aumentare eseguendo una riduzione dell'area a disposizione, come mostrato in Figura 13.

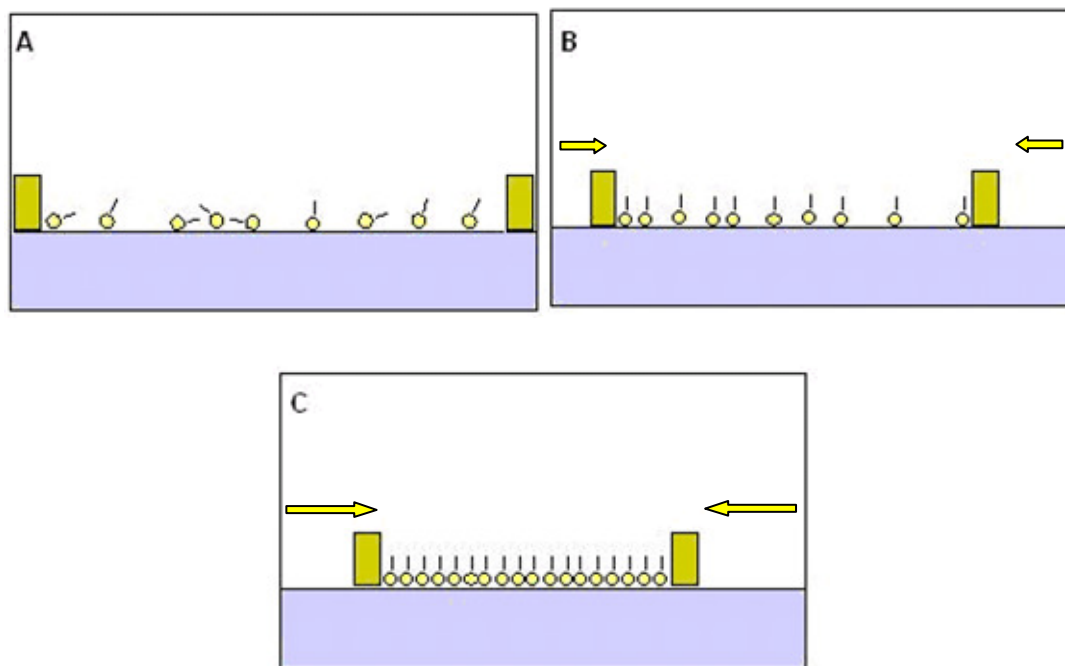


Figura 13. Rappresentazione della disposizione delle molecole sulla fase acquosa prima e dopo la compressione.

Applicando al monolayer compressioni maggiori, è modificata la distribuzione superficiale delle molecole, forzandole a passare da uno stato a bassa densità “gassoso”(G) o di “liquido espanso”(L₁), ad uno stato a maggiore densità, detto “liquido condensato”(L₂), e successivamente ad uno stato di “solido condensato” (S) (Figura 14). Ulteriori diminuzioni dell'area effettiva per molecola, in seguito a maggiori compressioni del monolayer, risultano in un collasso del film, che si manifesta con una rapida diminuzione della pressione superficiale o con un break orizzontale nell'isoterma, se il monolayer è in uno stato liquido. Fino al punto di collasso, le molecole fosfolipidiche sono stabilizzate da interazioni fra i gruppi metilenici delle catene idrofobiche e da interazioni elettrostatiche nelle zone dei gruppi polari (*Miñones*

J. et al., 1981). Al punto di collasso le repulsioni molecolari vincono sulle forze attrattive, creando una situazione energeticamente sfavorevole che porta i fosfolipidi ad uscire dal piano del monolayer ed a formare multilayer ed isole.

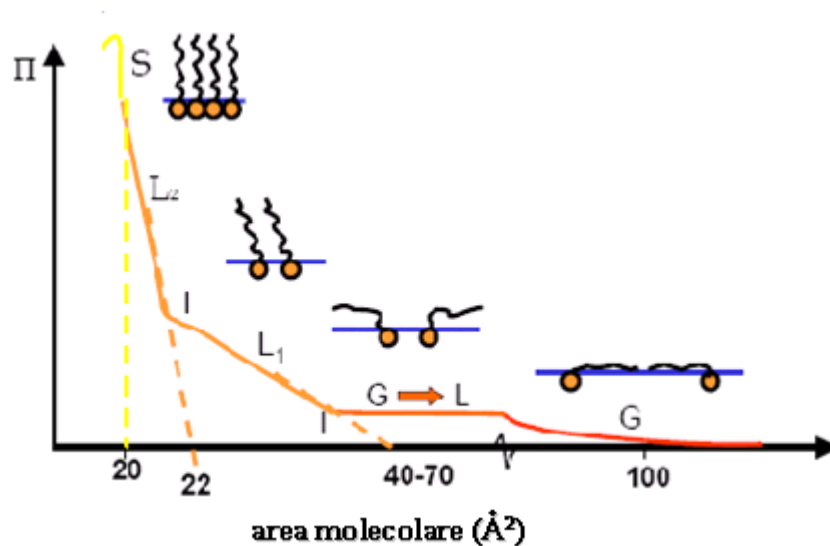


Figura 14. Curva isoterma *Tensione superficiale/Area per molecola*.

L'area molecolare misurata alla pressione di collasso è importante perché rappresenta la minore area di superficie che una molecola in un monolayer può occupare ed è pertanto detta "area limite". In effetti, però, si può incorrere in "super-compressioni" del monolayer. Le curve di compressione, infatti, possono sviluppare una pressione massima dopo che il collasso è iniziato, a causa di susseguenti processi di rilassamento. Per questo si raccolgono anche i dati relativi a stadi precedenti al punto di collasso (*Krull U.J. et al., 1985*). Ad ognuno dei passaggi di fase riscontrabili durante la compressione del monolayer, corrispondono variazioni strutturali correlabili a quelle che avvengono nei modelli di membrana biologica.

In letteratura, sono riportati molti studi sulle curve ottenute correlando l'area media per molecola (\AA^2) con la frazione molare (X) del composto in esame, che forniscono informazioni sull'impaccamento molecolare, sulla miscibilità, e sulle interazioni tra le molecole componenti monolayer misti (*Bader H. et al., 1985*).

L'area media per molecola di una miscela binaria può essere calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$A = A_1 X_1 + (1 - X_1) A_2$$

dove, A è l'area media per molecola, X_1 è la frazione molare di un componente, A_1 e A_2 sono le aree parziali dei due componenti puri, alla stessa pressione superficiale.

Riportando su un grafico A / X_1 (Figura 15) si ottiene una retta se i due componenti del monolayer sono completamente immiscibili o possiedono una miscibilità ideale.

Qualunque deviazione da questa relazione lineare indica interazione tra le molecole, cioè una miscibilità non ideale.

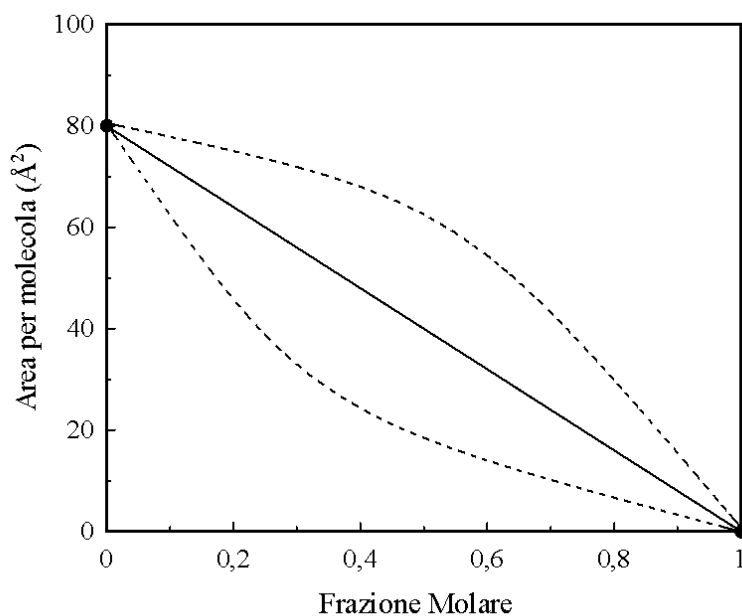


Figura 15. Grafico rappresentante l'andamento dell'area media per molecola rispetto alla frazione molare, a pressione costante, per monolayer completamente immiscibili o a miscibilità ideale (linea continua) e monolayer a comportamento non ideale (linea tratteggiata).

CAPITOLO 1

Caratterizzazione di nuovi sistemi per il drug delivery: idrogel e micelle polimeriche.

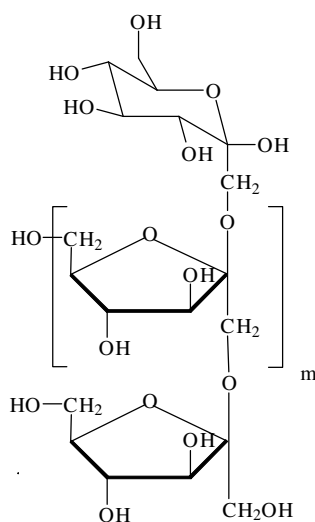
1.1. Rilascio di farmaci da un idrogel di inulina derivatizzata con anidride metacrilica e acido succinico

Gli idrogeli sono definiti come network di polimeri idrofili che possono assorbire una notevole quantità d'acqua (>20 % del loro peso secco) senza perdere la loro integrità strutturale o passare in soluzione. Il network è spesso formato da polimeri ramificati covalentemente; ma anche legami ionici, legami idrogeno o Forze di Van der Waals e possono dar luogo a materiali polimerici rigonfiabili in acqua (*Peppas N.A. and Mikos A.G., 1986; Vervoort L. et al., 1998*). Gli idrogeli di vari polimeri naturali (chitosano, alginato, fibrina, collagene, gelatina, acido ialuronico, destrano, etc) e di monomeri sintetici (alcool vinilico, vinil acetato, acido metacrilico, N-vinil-2-pirrolidone, idrossietilmetacrilato, etc) per la loro bassa tossicità, buona biocompatibilità e capacità di rilasciare i soluti in essi inseriti, se dispersi in un mezzo acquoso, sono stati studiati per varie applicazioni biomediche e farmaceutiche (come materiali per impianti e sistemi a rilascio prolungato e/o controllato di farmaci e, in alcuni casi, rilascio in uno specifico sito, così da prevenire l'accumulo di farmaco nei tessuti non-target, incrementando la sua biodisponibilità) (*Hovgaard L. and Brondsted H., 1995; Qiu Y. and Park K., 2001; Hahn S.K. et al., 2007*). Gli idrogeli sono considerati eccellenti 'carriers' per una varietà di agenti farmacologici che comprendono composti a basso peso molecolare fino alle macromolecole.

L'inulina (INU) è un polisaccaride naturale trovato in vari vegetali come l'aglio, la cipolla e la cicoria (*Van Loo J. et al., 1995*) e appartenente al gruppo dei glucofruttani. Essa consiste di molecole di fruttosio legate in β 2-1 e, molto spesso, contiene una molecola di glucosio ad una estremità della catena (*Roberfroid M.B., 1993; Stevens C.V. et al., 2001*).

Negli ultimi anni l'inulina ha avuto un crescente interesse grazie alle sue molteplici proprietà. Essa, infatti, non è tossica, è biocompatibile, solubile in acqua, biodegradabile e poco costosa (*Wang X. and Gibson G.R., 1993; Gibson G.R. and Roberfroid M.B., 1995; Biedrzycka E. and Bielecka M., 2004*). Un importante enzima implicato nella degradazione dell'inulina è l'inulinasi, una miscela di endo- ed eso-inulinasi, generalmente ottenuta da *Aspergillus Niger* (*Damian F. et al., 1999*).

L'inulina è anche usata in diagnostica per la determinazione della clearance renale ed è aggiunta ad alcuni prodotti alimentari come fibra alimentare (*Bach Knudsen K.E. and Hesson I., 1995*). In considerazione di queste caratteristiche, negli ultimi anni, l'interesse per l'inulina si è concentrato sulla sua derivatizzazione chimica per ottenere vari sistemi di rilascio (adatti a vari scopi) quali ad esempio, microsfere e idrogeli.



Inulina

In questo lavoro è stato sintetizzato un derivato dell'inulina che è stato successivamente polimerizzato per originare un idrogel con lo scopo di impiegarlo come sistema di rilascio di farmaci al colon; infatti, i legami β 2-1 glicosidici non sono significativamente idrolizzati dagli enzimi delle secrezioni gastriche, tuttavia i batteri del colon, in maniera specifica i *Bifidobacteria*, che costituiscono più del 25 % della normale flora intestinale dell'uomo, sono capaci di fermentare l'inulina (*Wang X. and Gibson G.R., 1993; Gibson G.R. and Roberfroid M.B., 1995*). Il rilascio di farmaci nel colon è importante per il trattamento di varie patologie quali il morbo di Chron, la colite ulcerosa, il carcinoma del colon ed altre patologie che possono beneficiare di una elevata concentrazione locale di farmaco, riducendo, allo stesso tempo, la dose somministrata e gli effetti indesiderati. Inoltre, il colon è anche una possibile via di somministrazione per molti peptidi e proteine o per farmaci che devono essere assorbiti per svolgere un'azione sistemica (*Sinha V.R. et al., 2007*). Allo scopo di ottenere tali idrogeli, l'inulina è stata derivatizzata con anidride metacrilica (MA) ottenendo così una serie di derivati da sottoporre a ramificazioni fotochimiche (photocrosslinking) per mezzo di irradiazione UV. In funzione della temperatura e del tempo di reazione sono

stati ottenuti quattro diversi derivati. Tra essi, uno (INU-MA) ha mostrato la più alta resa e un buon grado di derivatizzazione per cui è stato scelto per ottenere un idrogel. Il network ricavato da INU-MA ha mostrato buone capacità di swelling ma una bassa resistenza all'idrolisi acida. Questo svantaggio è generalmente mostrato dagli idrogeli di inulina e dipende dalla degradazione dell'INU nativa a bassi valori di pH (*Taufel K. and Steinbach K.J., 1959; Vervoot L. et al., 1998*).

Per superare questo problema l'INU-MA è stata derivatizzata con gruppi acidi lungo la struttura polimerica per ottenere un network contenente gruppi carbossilici. Infatti, la presenza di gruppi carbossilici causa, generalmente, un ridotto swelling in condizioni acide (ad es. i succhi gastrici) che potrebbe risultare in una ridotta degradazione in tale mezzo. Come mezzo derivatizzante è stata impiegata l'anidride succinica (SA), ottenendo così un derivato INU-MA-SA il quale è stato a sua volta sottoposto a crosslinking con radiazioni UV. L'idrogel ottenuto mostra un basso swelling ed una grande resistenza in fluidi gastrici simulati (pH 1,0). In accordo con queste proprietà, l'idrogel di INU-MA-SA è adatto per il rilascio nel tratto intestinale evitando o riducendo il rilascio nella regione gastrica. Questo è importante per quei farmaci che vengono degradati in condizioni acide e/o che possono causare effetti irritanti sulla mucosa gastrica, come ad esempio gli antinfiammatori non steroidei (NSAID). Per verificare tale capacità, l'idrogel è stato caricato con diflunisal (DFN), scelto come farmaco modello. Il diflunisal (Figura 1.1) è un derivato dell'acido salicilico, poco solubile in acqua, con una notevole attività analgesica e antinfiammatoria. Come gli altri NSAID, il diflunisal induce effetti collaterali gastrointestinali come emorragie ed ulcerazioni allo stomaco e all'intestino tenue (*Cotton M.L. and Hux R.A., 1985; Langman M.J.S. et al., 1994; Smith C.C. et al., 1994*).

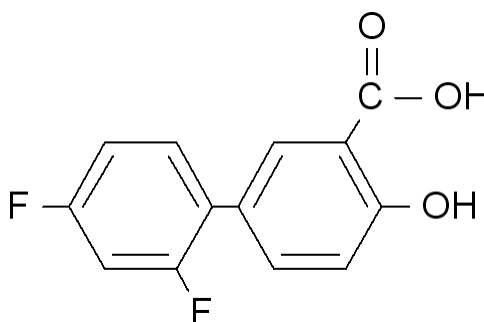


Figura 1.1. Formula di struttura del diflunisal.

Il rilascio di diflunisal è stato valutato mediante calorimetria a scansione differenziale misurando l'assorbimento dello stesso, da parte di modelli di membrana biologica, una volta rilasciato dall'idrogel. Le biomembrane modello sono costituite da vescicole unilamellari (LUV) di dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Gli studi sono stati effettuati usando idrogeli caricati con diverse quantità di diflunisal e a pH 7,4 e 4,0 con lo scopo di valutare se il rilascio di diflunisal è influenzato dalla quantità presente nell'idrogel e se il pH del mezzo può influenzare il rilascio stesso. La DSC è una tecnica particolarmente adatta per seguire la cinetica di trasferimento di un farmaco da un sistema a rilascio controllato a modelli di biomembrane, infatti è già stata precedentemente utilizzata per tale scopo (*Castelli F. et al., 2001; 2002; 2005*) Il diflunisal libero è capace di interagire con le vescicole unilamellari, scelte come modelli di biomembrana, causando un abbassamento della T_m ; tale molecola, infatti, si comporta come un'impurità destabilizzando la struttura lipidica ordinata e spostando la T_m verso valori più bassi in confronto a quelli del lipide da solo (*Guggenheim E.A., 1952; Jain M.K., 1988*). Poiché tale decremento della T_m dipende dalla quantità di farmaco presente all'interno del doppio strato lipidico, la quantità di diflunisal rilasciata dall'idrogel, ed interagente con le vescicole di DMPC, è stata quantificata comparando gli effetti osservati sui parametri termodinamici del bilayer con gli effetti causati dalla dispersione nelle vescicole di DMPC di frazioni molari note e crescenti di farmaco. Gli effetti sulle caratteristiche termotropiche delle vescicole di DMPC causati dal farmaco libero possono essere comparati con quelli causati dal diflunisal rilasciato dall'idrogel.

1.2. Micelle polimeriche come carrier di farmaci

Ogni terapia farmacologica, per essere efficace, deve garantire il raggiungimento della concentrazione efficace del principio attivo nel sito d'azione. Ciò non è semplice da ottenere, infatti, può dipendere da numerosi fattori, di tipo fisiologico (vascolarizzazione, flusso sanguigno, permeabilità, estensione della superficie, pH del mezzo), o relativi alle caratteristiche chimico-fisiche del farmaco e della forma farmaceutica che lo veicola. Se, inoltre il principio attivo deve agire a livello di distretti particolari, come il sistema nervoso centrale, deve superare un ulteriore ostacolo, rappresentato dalla barriera emato-encefalica. Per tali motivi la moderna tecnologia farmaceutica si dedica alla progettazione di nuovi sistemi carrier, quali nanoparticelle,

microcapsule, liposomi e micelle che consentano di superare questi problemi (*Cohen S. and Bernstein H., 1996*). Un carrier per esplicare la sua funzione dovrebbe:

- degradarsi lentamente;
- essere sensibile alle variazioni di temperatura e pH;
- avere un tempo di permanenza nel circolo sanguigno che consenta di mantenere a lungo la concentrazione terapeutica;
- accumularsi nel sito d'azione.

I copolimeri anfifilici biodegradabili, per la loro capacità di auto-assemblarsi, in un mezzo acquoso, in seguito al raggiungimento di una certa concentrazione detta concentrazione di aggregazione critica (CAC), in strutture micellari con una buona capacità di loading (*Chen H. et al., 2005*), sono diventati oggetto di un interesse sempre maggiore per lo sviluppo di carrier per il rilascio di farmaci liposolubili. (*Béduneau A. et al., 2007; Torchilin V.P., 2007*). In queste strutture i segmenti idrofobici del copolimero formano un *core* che mostra di avere la capacità d'incorporare un farmaco e di permetterne un profilo di rilascio sostenuto. Mentre, i segmenti idrofilici formano una *corona* esterna che fornisce alle micelle una protezione sterica. La formazione delle micelle è da attribuire ad un decremento di energia libera del sistema, dovuto alla riduzione del numero di gruppi lipofili disposti all'interfaccia con il solvente acquoso, all'instaurarsi di legami idrogeno tra le molecole di acqua, alla formazione di interazioni tra la porzione idrofila del polimero e il solvente e, infine, ai legami di Van der Waals tra i gruppi idrofobi all'interno del sistema (*Jones M. and Leroux J., 1999*). Inoltre, legando alla superficie delle micelle delle specifiche molecole ligando, come residui del folato o il polisorbato 80 (PS₈₀), (*Sun W. et al., 2004; Sutton D. et al., 2007; Park J.H. et al., 2008*) è possibile raggiungere uno specifico target terapeutico. In particolare, i sistemi colloidali con in superficie le molecole di PS₈₀ dopo somministrazione endovenosa nei topi hanno la capacità di trasportare il farmaco oltre la barriera ematoencefalica (*Kreuter J. et al., 2003; Michaelis K. et al., 2006*). L'effetto target è probabilmente dovuto all'adsorbimento dell'apolipoproteina E sulla superficie delle particelle grazie all'interazione del PS₈₀ con i recettori per le lipoproteine, presenti sulle cellule endoteliali dei capillari del cervello, ed alla successiva endocitosi. Un altro possibile meccanismo è il semplice rilascio del farmaco all'interno delle cellule endoteliali e quindi la diffusione al cervello (*Kreuter J. et al., 2003; Kreuter J., 2004*).

Un sistema micellare ideale dovrebbe:

- formarsi spontaneamente e incorporare al suo interno molecole di principio attivo che devono poi essere rilasciate in forma libera al sito bersaglio;
- avere dimensioni di circa 10-20 nm affinché possa attraversare le membrane;
- essere stabile *in vivo*;
- non causare effetti indesiderati;
- essere formato da componenti che possano essere facilmente eliminati dall'organismo una volta completata la loro funzione (*Kabanov A.V. et al., 2002*).

Generalmente i copolimeri in grado di formare micelle sono formati da blocchi idrofobici, costituiti da poliesteri alifatici, come l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL), o fosfolipidi; mentre i blocchi idrofilici possono essere costituiti da polietilenglicoli, polivinilpirrolidone, chitosano o α,β -poliidrossietil-D,L-aspartammide.

In questo lavoro è stato studiato il rilascio, l'assorbimento e l'interazione di un farmaco, inglobato all'interno di micelle ottenute da un copolimero derivato dall' α,β -poliidrossietil-D,L-aspartammide (PHEA), con modelli di biomembrana, costituiti da liposomi multilamellari (MLV) ed unilamellari (LUV) di dimiristoilfosfatidilcolina, tramite la tecnica della calorimetria a scansione differenziale. Il PHEA è un polimero sintetico a struttura poliamminoacidica, biocompatibile, non tossico, non immunogenico e solubile in acqua (*Giammona G. et al., 1987*). Nella struttura del polimero sono presenti, in catena laterale, gruppi ossidrilici per cui è possibile legare covalentemente allo scheletro polimerico molecole di varia natura.

Per poter sintetizzare il copolimero anfifilico necessario per ottenere le micelle il PHEA è stato fatto reagire con etilendiammina (EDA), sostituendo così i gruppi ossidrilici con quelli amminici, più reattivi (*Licciardi M. et al., 2006*).

Successivamente il PHEA-EDA è stato derivatizzato con PS₈₀ e PLA per ottenere PHEA-EDA-PS₈₀-PLA (Figura 1.2). Il PLA è stato scelto poiché è un polimero sintetico lipofilo biocompatibile e già ampiamente utilizzato in campo biomedico. Le micelle polimeriche di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA sono state preparate con il metodo della dialisi.

Le micelle così ottenute sono state utilizzate come sistema carrier, il farmaco modello scelto è l'R-Flurbiprofene. Sia la sintesi del copolimero che la preparazione delle micelle sono state effettuate presso l'Università degli Studi di Palermo dal gruppo di ricerca del Prof. G. Giammona del Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche.

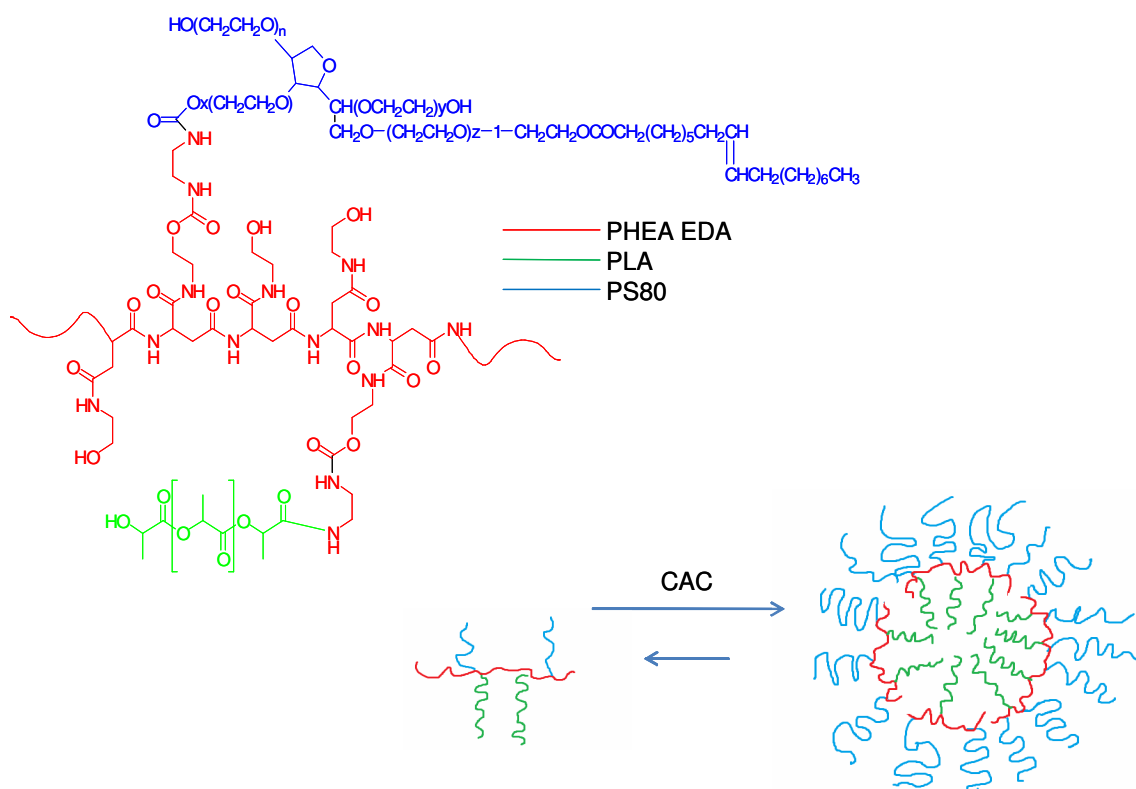


Figura 1.2. Struttura chimica del copolimero PHEA-EDA-PS₈₀-PLA (n = 44).

1.3. R-Flurbiprofene

Lo screening della classe degli antinfiammatori non steroidei (NSAID) ha portato all'identificazione di alcuni farmaci in grado di abbassare i livelli della proteina β -amiloide ($A\beta$) (Weggen S. et al., 2001; Eriksen J.L. et al 2003), in particolare la sua forma a 42 amminoacidi ($A\beta$ -42) implicata nella formazione di placche senili ed aggregati neurofibrillari nei vasi e nel parenchima cerebrale, caratteristiche principali della patogenesi del morbo di Alzheimer (Blennow K. et al., 2006). Inoltre la deposizione delle placche è associata ad una innata risposta immunitaria che include l'attivazione del complemento (Rogers J. et al., 1992), la secrezione di elementi pro-infiammatori come citochine e chemochine, e la produzione di ossido nitrico che media l'apoptosi (Griffin W.S. et al., 1989; Dickson D.W. et al., 1993). Un NSAID riduce i segnali pro-infiammatori, la risposta della microglia e degli astrociti abbassando il rischio di sviluppare l'Alzheimer (McGeer P.L. and McGeer E.G., 2004).

E' stato provato che l'enantiomero R del Flurbiprofene (Figura 1.3), noto anche come Tarenflurbil, ha la capacità di abbassare i livelli di $A\beta$ -42 in colture cellulari (Moriyama T. et al., 2002; Eriksen J.L. et al., 2003) esso non agisce come un classico

inibitore di proteasi ma tramite una modulazione allosterica della presenilina-1, il principale componente del complesso della γ -secretasi, l'enzima di clivaggio che a partire dal precursore della proteina amiloide (APP) produce le varie forme di A β (Eriksen J.L. et al., 2003; Lleò et al., 2004).

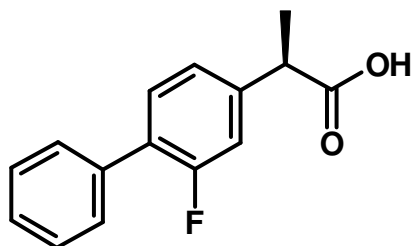


Figura 1.3. Formula di struttura dell'R-Flurbiprofene (Tarenflurbil).

Inoltre l'R-Flurbiprofene si è dimostrato sicuro e ben tollerato, tuttavia gli studi clinici di fase III sono stati interrotti poiché il trattamento non ha influito positivamente sull'attività cognitiva (Rafii M.S. and Aisen P.S., 2009). Una spiegazione plausibile per tale fallimento è che la somministrazione orale produce concentrazioni di farmaco insufficienti a ridurre i livelli della proteina A β , infatti studi preliminari su soggetti sani hanno dimostrato una penetrazione dose dipendente del farmaco dal plasma al fluido cerebrospinale variabile da 0,5 a 1 % (Galasko D.R. et al., 2007).

Per questi motivi l'utilizzo di un carrier, come le micelle polimeriche, che permetta la protezione del farmaco ed il direccionamento specifico verso il sito d'azione può rappresentare un mezzo efficace per il superamento di tutti gli inconvenienti descritti.

1.4. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata fornita dalla Genzyme Pharmaceuticals, Liestal, Svizzera (purezza del 99,9 %). Per formare i liposomi è stata utilizzata una soluzione di tris (hydroxymethyl-aminomethane) 50 mM, portata a pH = 7,4 (tamponata) o 4,0 mediante acido cloridrico.

L'anidride metacrilica (MA), l'anidride succinica (SA), l'inulina (INU) (Mw ~ 5000 Da) da Dahlia Tubers, l'inulinase da *Aspergillus niger* (INU-ase), il butanolo, l'acido acetico glaciale e la trietilamina (TEA) sono stati ottenuti dalla Fluka

(Italia). La N,N-dimetilformamide anidra 99,9 % (DMF), il diflunisal (DFN), l'etanolo 96 %, l'antrone e il D₂O (purezza 99,9 %) sono stati forniti dalla Aldrich Chemical Co. (Italia). Il dietil etere, l'acetone, il metanolo, l'acetonitrile, l'acido acetico e il 2-propanolo sono stati forniti dalla Merck (Germania).

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) utilizzato per la preparazione del copolimero è stato sintetizzato e purificato secondo una procedura già descritta (Giammona G. et al., 1987). Il Polisorbato 80 (PS₈₀), N-idrossisuccinimide sale sodico (NHS), bis(4-nitrofenil)carbonato (PNPC), N,N-dimetilacetammide anidra (DMA), D₂O e DMSO-*d*₆ (purezza 99,9 %), sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Italy). R-Flurbiprofene (R-Flu), etilendiammine (EDA), dietilammine (DEA) e dimetilsolfossido (DMSO) sono stati forniti da Fluka (Italy); RESOMER R 202 (l'acido D,L-polilattico, PLA: 8000 Da) è stato fornito da Bidachem-Boeringher Ingelheim (Italy).

1.5. Derivatizzazione dell'inulina con anidride metacrilica ed anidride succinica (INU-MA-SA)

Prima dell'uso, l'inulina è stata essiccata in stufa a 70 °C per 24 ore. Un grammo di inulina è stato solubilizzato sotto argon in 14 mL di DMF anidra per circa 3 ore. A solubilizzazione completa, sono state aggiunte opportune quantità di TEA, come catalizzatore, e di MA con X = 0,4 e Y = 0,2, dove:

$$X = \frac{\text{moli di MA}}{\text{moli di Unità Ripetitive di Inulina}}$$

$$Y = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli di Unità Ripetitive di Inulina}}$$

La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione, sotto argon, per 24 ore a 25 °C in un bagno d'acqua termostato; dopo tale periodo, è stata aggiunta una opportuna quantità di TEA e di anidride succinica con X¹ = 0,3 e Y¹ = 0,15 dove:

$$X' = \frac{\text{moli di SA}}{\text{moli di Unità Ripetitive di Inulina}}$$

$$Y' = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli di Unità Ripetitive di Inulina}}$$

La miscela di reazione è stata nuovamente mantenuta sotto agitazione e sotto argon per 24 ore a 25 °C. Dopo questo tempo, il prodotto di reazione è stato precipitato in 140 mL di una miscela etere/acetone (2:1, V/V) e centrifugata a 4 °C per 15 min a 10000 rpm.

Il prodotto è stato così recuperato e lavato diverse volte nella stessa miscela di solventi. Dopo l'ultimo lavaggio è stato seccato sotto vuoto fino a peso costante. Un grammo del prodotto ottenuto, disciolto in 60 mL di acqua bi-distillata, è stato passato attraverso una resina a scambio cationico Dowex 50W x 8 e la soluzione risultante è stata liofilizzata. Il prodotto finale è stato ottenuto con una resa del 99 % in peso in base all'inulina di partenza.

1.6. Caratterizzazione del derivato INU-MA-SA

Lo spettro FT-IR (KBr) mostra una larga banda a 3437 cm⁻¹ (ν_{as} OH); e bande a 1737 cm⁻¹ (ν C=O del gruppo estereo), a 1290 cm⁻¹ (scissoring del gruppo -C=C-H₂).

Lo spettro ¹H-NMR (D₂O) mostra: δ 1,96 (3H, s, -CO-C(CH₃)=CH₂) 2,74 (4H, s, -CH₂CH₂), 3,50-4,0 (5H, m: CH₂-OH; CH-CH₂-OH; -CH₂-CH₂-O-), 4,14 (1H, t: CH-OH), 4,25 (1H, d: CH-OH), 5,79 e 6,22 (2H, 2s: -CO-C(CH₃)=CH₂).

Il grado di derivatizzazione (DD %) è stato determinato mediante ¹H-NMR. Il contenuto in residuo metacrilico legato all'inulina è stato calcolato comparando l'integrale del picco a δ 5,79 e 6,22 (2H, 2s: CH₂=CR-), relativo ai protoni del doppio legame del residuo metacrilico, con l'integrale del picco tra δ 3,5-4,25, relativo ai protoni (7H) dell'unità di fruttosio dell'inulina. Il valore di DD è risultato essere 22 mol %. La quantità di residui succinici legati all'inulina è stata calcolata comparando l'integrale del picco a δ 2,74 (4H, s, CH₂CH₂), relativo ai protoni del gruppo succinico, con il picco tra δ 3,5-4,25, relativo ai protoni (7H) dell'unità di fruttosio dell'inulina. Il valore di DD è risultato del 30 mol %.

1.7. Preparazione dell'idrogel mediante irradiazione dell'INU-MA-SA con raggi UV

100 mg di INU-MA-SA sono stati inseriti in una fiala di quarzo e disciolti in 1 mL di etanolo 96 %; dopo la completa dispersione, il campione è stato degassato sotto vuoto e un pistone di quarzo è stato inserito nella fiala allo scopo di formare uno strato sottile (circa 2 mm) nello spazio tra il pistone e la fiala. Il campione è stato irradiato a 254 nm per 1 ora. Dopo il tempo di irradiazione, l'idrogel insolubile è stato purificato usando prima etanolo quindi acqua bidistillata. Dopo l'ultima purificazione, l'idrogel è stato recuperato e liofilizzato. La resa ottenuta è stata del 90 % rispetto all'INU-MA-SA iniziale.

1.8. Studi di swelling

Gli studi di swelling sono stati effettuati in acqua bidistillata, in HCl 0,1 N (pH 1,0) per simulare i succhi gastrici, e in soluzione tampone fosfato (PBS) pH 6,8 o 7,4 (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) per simulare rispettivamente i succhi intestinali o la soluzione fisiologica. La quantità di idrogel di INU-MA-SA esattamente pesata è stata posta in filtro sinterizzato tarato per 5 mL, immersa in un beaker contenente il mezzo di swelling e lasciata a rigonfiare a $37 \pm 0,1$ °C per 24 ore. Dopo questo tempo, l'eccesso di liquido è stato rimosso per percolazione a pressione atmosferica. Quindi, ogni filtro è stato messo in un tubo da centrifuga e centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti, il centrifugato è stato pesato insieme al filtro e lo swelling è stato calcolato come:

$$q = W_s/W_d$$

dove W_s e W_d sono i pesi del campione rigonfiato e di quello secco, rispettivamente.

La tara del filtro è stata previamente stabilita bagnando il filtro in acqua e pesandolo dopo centrifugazione. Ogni esperimento è stato effettuato per tre volte e i risultati sono in accordo con un errore standard del ± 3 %.

1.9. Studi di degradazione chimica “in vitro” dell'idrogel INU-MA-SA

50 mg di idrogel di INU-MA-SA in 25 mL di solvente di degradazione, (costituito da HCl 0,1 N, pH 1,0, o soluzione tampone fosfato pH 7,4; 6,8 o 4,7) sono stati incubati a $37 \pm 0,1$ °C sotto continua agitazione (100 rpm). Dopo 24 ore i campioni sono stati neutralizzati, centrifugati a 10000 rpm a 4 °C per 10 minuti, ed è stato eliminato il surnatante. Quando l'idrolisi è stata effettuata in HCl 0,1 N sono stati anche provati

tempi di incubazione di 1 e 2 ore. Per ogni campione, l'idrogel rimanente è stato lavato per cinque volte con acqua bidistillata sotto continua agitazione per 1 ora. Infine, l'idrogel è stato liofilizzato, pesato e caratterizzato con studi di swelling in acqua bidistillata, lo swelling è stato espresso come rapporto (q) tra il peso dell'idrogel rigonfiato (W_s) e secco (W_d). Inoltre, è stata calcolata la resa dell'idrogel recuperato.

Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte e i risultati sono in accordo con un errore standard del ± 3 %.

1.10. Studi di degradazione enzimatica “in vitro” del derivato INU-MA-SA o dell'idrogel in presenza di inulinasi

Aliquote (50 mg) del derivato INU-MA-SA o dell'idrogel sono state incubate in 25 mL di tampone fosfato a pH 4,7 in assenza o in presenza di inulinasi (concentrazione finale dell'enzima 10 U/mL), sotto continua agitazione (100 rpm) a $37 \pm 0,1$ °C per 24 ore. La soluzione dell'enzima è stata preparata immediatamente prima dell'esperimento. La degradazione del campione è stata valutata utilizzando due diversi metodi:

- 1) analisi TLC con orcinolo come rivelatore, usata per il derivato solubile INU-MA-SA
- 2) il metodo con antrone usato per l'idrogel INU-MA-SA.

1.11. Analisi TLC

Il mezzo di degradazione dell'INU-MA-SA è stato sottoposto ad analisi cromatografica su strato sottile mediante una lastrina in silicagel 60 per 1 ora usando come fase mobile una miscela di butanolo/acido acetico/acqua (3:3:2 v/v/v) e 0,5 mg/mL di soluzione fruttosio come riferimento. Dopo il tempo di sviluppo del campione, la lastrina è stata asciugata con aria calda, spruzzata con orcinolo e nuovamente asciugata su una piastra calda.

1.12. Metodo dell'antrone

50 mg di antrone sono stati solubilizzati in 100 mL di una miscela acido solforico/acqua (2,5:1 v/v); 200 μ l di questa soluzione sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 700 μ l di acqua e 100 μ l del mezzo di degradazione di INU-MA-SA, la miscela è stata tenuta a 100 °C in acqua calda per 10 minuti. Trascorso questo tempo, la soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e analizzata a

$\lambda = 625$ nm. La curva di calibrazione è stata ottenuta con una soluzione di fruttosio in acqua, a differente concentrazione ($R^2 = 0,9998$). Ogni esperimento è stato ripetuto per tre volte e i risultati sono in accordo con un errore standard del ± 2 %.

1.13. Incorporazione del diflunisal nell'idrogel di INU-MA-SA

Il diflunisal è stato caricato nell'idrogel di INU-MA-SA durante l'irradiazione UV. Studi preliminari hanno dimostrato che il farmaco non subisce degradazione nelle condizioni d'irradiazione utilizzate. In particolare, il farmaco è stato solubilizzato in etanolo (in quantità variabili tra 10-50 mg/ml) ed irradiato a 254 nm per 1 h; quindi i campioni sono stati analizzati mediante HPLC rilevando l'assenza di prodotti di degradazione. Per cui, il farmaco è stato solubilizzato in etanolo insieme all'INU-MA-SA (concentrazione finale di INU-MA-SA 100 mg/mL) allo scopo di avere tre differenti quantità di farmaco rispetto al polimero (concentrazione finale di farmaco: 14, 25 e 43 mg/ml, per ottenere un drug loading rispettivamente del 12, 20 e 30 % in peso). Le soluzioni farmaco-polimero sono state irradiate a 254 nm per 1 ora. In questo modo, sono stati ottenuti tre differenti campioni di idrogel a base di INU-MA-SA, contenenti al loro interno una diversa quantità di farmaco. Essi sono stati velocemente lavati con etanolo, acqua bidistillata e quindi liofilizzati.

1.14. Determinazione della quantità di farmaco negli idrogeli di INU-MA-SA

Poiché una certa aliquota di farmaco caricato nell'idrogel è stata rimossa durante la fase di lavaggio, è stato necessario valutare la reale quantità di farmaco caricata in ogni campione. Per tale motivo, 50 mg di ogni idrogel di INU-MA-SA caricato col farmaco, sono stati sottoposti ad estrazione a temperatura ambiente in metanolo. Quindi, la quantità di farmaco estratto è stata quantitativamente determinata con HPLC. La quantità di farmaco inclusa negli idrogeli di INU-MA-SA risulta essere del 10,4; 17; 24 % in peso.

1.15. Sintesi del PHEA-EDA, PHEA-EDA-PS₈₀, e del copolimero PHEA-EDA-PS₈₀-PLA

La derivatizzazione del PHEA con EDA per ottenere il PHEA-EDA e la sua successiva caratterizzazione sono state effettuate in accordo con una procedura già

descritta (Licciardi M. et al., 2006). Il prodotto è stato ottenuto con una resa percentuale del 95 %, rispetto alla quantità di PHEA utilizzata. Il grado di derivatizzazione in EDA (DD_{EDA}) determinato con la spettroscopia 1H NMR in D_2O è risultato del $30,0 \pm 0,5$ mol %.

La derivatizzazione del PHEA-EDA con il PS_{80} per ottenere il PHEA-EDA- PS_{80} è stata effettuata con la seguente procedura: i gruppi idrossilici del PS_{80} sono stati attivati in una soluzione di DMA anidro con PNPC a $10\text{ }^\circ C$ per 3 ore. Dopo tale tempo di attivazione, è stata aggiunta una soluzione di PHEA-EDA e la miscela di reazione finale è stata lasciata a reagire a $25\text{ }^\circ C$ per 3 ore e, in seguito a $20\text{ }^\circ C$ per tutta la notte, in continua agitazione. Le quantità di PS_{80} e PNPC sono state aggiunte secondo le proporzioni $X = 1$ e $Y = 1$, dove

$$X = \frac{\text{moli di PNPC}}{\text{moli di } PS_{80}}$$

$$Y = \frac{\text{moli di } PS_{80}}{\text{moli di gruppi amminici liberi nel PHEA-EDA}}$$

Il prodotto è stato ottenuto con una resa dell'85 %, rispetto alla quantità di PHEA-EDA iniziale. Il grado di derivatizzazione di PS_{80} ($DD_{PS_{80}}$), determinato con la spettroscopia 1H NMR in D_2O è risultato $1,2 \pm 0,03$ mol %.

La derivatizzazione del PHEA-EDA- PS_{80} con l'acido polilattico (PLA) per ottenere il copolimero anfifilico PHEA-EDA- PS_{80} -PLA è stata effettuata come segue: $27,5\text{ mg ml}^{-1}$ di PHEA-EDA- PS_{80} sono stati solubilizzati in 2 ml di DMSO anidro a $40\text{ }^\circ C$, quindi è stata aggiunta un'appropriata quantità di DEA, usata come catalizzatore. NHS-derivato del PLA (PLA-NHS), ottenuto secondo una procedura riportata in letteratura (Palumbo F. et al., 2006), è stato aggiunto alla soluzione di PHEA-EDA- PS_{80} per 1 ora. La reazione è stata effettuata sotto flusso di argon a $40\text{ }^\circ C$ per 4 ore e, in seguito, a $25\text{ }^\circ C$ per tutta la notte. Le quantità di PLA-NHS e DEA sono state calcolate per $X^1 = 0,035$ and $Y^1 = 1,2$, dove:

$$X^1 = \frac{\text{moli di PLA-NHS}}{\text{moli di gruppi amminici liberi nel PHEA-EDA-} PS_{80}}$$

$$Y^1 = \frac{\text{moli di EDA}}{\text{moli di gruppi amminici liberi nel PHEA-EDA-} PS_{80}\text{-PLA}}$$

Il PHEA-EDA-PS₈₀-PLA è stato ottenuto con una resa del 100 % rispetto al polimero PHEA-EDA-PS₈₀ iniziale. Il grado di derivatizzazione in PLA (DD_{PLA}), determinato con la spettroscopia ¹H NMR in DMSO-*d*₆, è risultato 0,54 ± 0,05 mol %.

1.16. Preparazione delle micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA contenenti R-Flu

Le micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA contenenti il farmaco sono state preparate semplicemente miscelando, con l'uso di mortaio e pestello, appropriate quantità di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA e di R-Flu, secondo una procedura già descritta in letteratura (Craparo E. *et al.*, 2009).

Il rapporto in peso finale copolimero/farmaco è uguale a 1:1; è stato aggiunto al prodotto 1 ml di etanolo, per solubilizzare l'R-Flu, quindi, sono state aggiunte aliquote di 500 µl di acqua fino al raggiungimento di un volume di 8 ml. La dispersione ottenuta è stata agitata per 1 ora, quindi per 5 minuti con un Ultraturrax, sottoposta ad ultrasuoni per 1 ora e, infine, centrifugata a 11800 rpm a 25 °C per 20 minuti, quindi è stata fatta passare attraverso un filtro di acetato di cellulosa (0,2 µm) e liofilizzata.

Per valutare la quantità di R-Flu incorporata dalle micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA è stata effettuata un'analisi HPLC, usando una colonna µBondpack (5 µm, 250 x 46 mm d.i., Waters), la fase mobile è composta da una miscela di metanolo e acido fosforico (1 % v/v) 80:20 v/v con una velocità di flusso di 1 ml/min., leggendo a λ = 247 nm.

L'analisi è stata eseguita sciogliendo 5 mg di micelle caricate con R-Flu in 10 ml di acqua bidistillata, quindi la soluzione è stata filtrata, attraverso una membrana di cellulosa con pori di 0,2 µm, e analizzata con HPLC. La quantità di R-Flu incorporata nelle micelle è stata determinata per mezzo di una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni standard di R-Flu in etanolo, in un range di concentrazione compreso tra 5-100 µg/ml, e i risultati sono stati espressi come rapporto percentuale in peso tra il farmaco incorporato e il sistema secco (copolimero + farmaco).

1.17. Interazione tra le biomembrane modello ed i farmaci

Per studiare il rilascio del diflunisal dall'idrogel sono state usate come biomembrane modello vescicole unilamellari (LUV) di dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) ottenute per estrusione delle vescicole multilamellari (MLV).

Le vescicole multilamellari sono state preparate nel seguente modo: una determinata quantità di DMPC (7 mg, 0,010325 mmol) è stata solubilizzata in cloroformio:metanolo (1:1); i solventi sono stati evaporati sotto flusso di azoto, a 37 °C (temperatura superiore alla temperatura di transizione del lipide), per ottenere dei film lipidici i quali sono stati liofilizzati per 60 minuti per allontanare eventuali tracce di solvente; i film sono stati idratati con 168 µl di Tris 50 mM a pH 7,4 o 4,0, posti a 37 °C un minuto e agitati un minuto per tre volte, quindi, lasciati a 37 °C per 60 minuti.

Per ottenere le vescicole unilamellari, gli MLV sono stati estrusi per 19 volte attraverso una membrana in polycarbonato (pori 100 nm) in un sistema per estrusione Liposofast™ Basic (Avestin Inc.) (Figura 1.4) (Hope M.J. et al., 1985; MacDonald R.C. et al., 1991). I pori della membrana sono quasi cilindrici e le vescicole che sono più larghe del diametro dei pori, durante il passaggio attraverso i pori, sono ridotte sia nelle dimensioni che nella lamellarità (Mayer L.D. et al., 1986; Hope M.J. et al., 1993). Il contenuto di fosforo fosfolipidico è stato determinato mediante un saggio per il fosfato (Rouser G. et al., 1970).

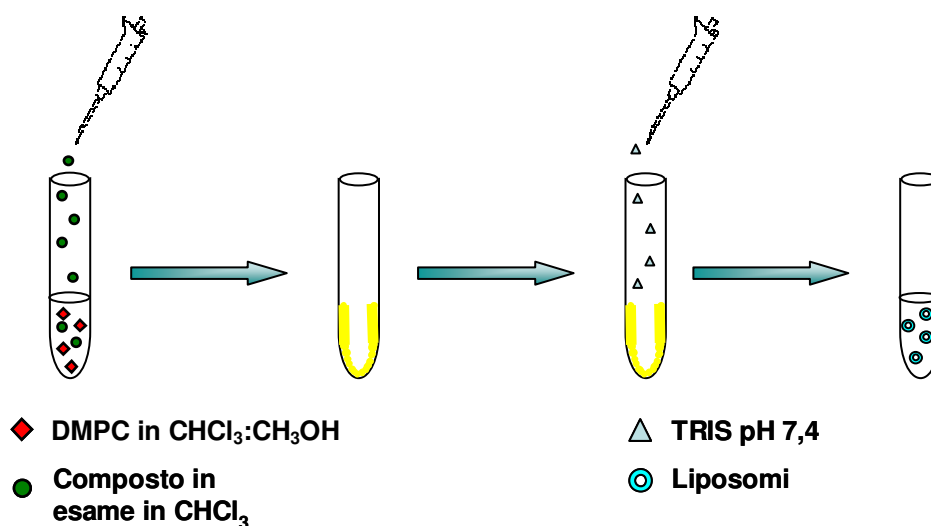


Figura 1.4. Mini-estrusore LiposoFast™ (Avestin).

Inoltre, per valutare l'interazione tra il farmaco ed i LUV, un'esatta quantità di diflunisal (in modo da avere le frazioni molari 0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09 e 0,12 rispetto al fosfolipide) è stata pesata sul fondo del crogiolo di alluminio da 160 µl e quindi sono stati aggiunti 120 µl (0,007375 mmoli di DMPC) della dispersione acquosa liposomiale appena preparata. Il crogiolo è stato chiuso ermeticamente ed incubato a 37 °C, sotto agitazione, per 60 minuti per permettere al diflunisal di ripartirsi tra la fase acquosa e quella lipidica, quindi sottoposto ad una scansione in riscaldamento da 5 a 37 °C a 2 °C/min e ad una scansione in raffreddamento da 37 a 5 °C a 4 °C/min. Il ciclo è stato ripetuto per almeno tre volte, per verificare la riproducibilità dei risultati. I valori di T_m (rispetto a quello del fosfolipide puro) che si ottengono sono i parametri di

riferimento per indicare l'effetto che una determinata frazione molare di composto causa sui liposomi di DMPC.

Per quanto riguarda l'R-Flurbiprofene allo scopo di valutare l'interazione tra il farmaco e le biomembrane modello sono stati preparati liposomi multilamellari miscelando una quantità fissa di DMPC (7 mg, 0,010325 mmol) solubilizzata in cloroformio:metanolo (1:1) con aliquote di una soluzione di R-Flu in cloroformio, in modo da avere le opportune frazioni molari (0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12) di farmaco rispetto al fosfolipide. In seguito, sono stati ottenuti i film con la medesima procedura descritta prima, i quali sono stati idratati con 168 μ l di Tris 50 mM a pH 7,4, mediante questa tecnica si ottengono liposomi multilamellari di DMPC in cui il farmaco è omogeneamente disperso nei bilayers (Schema 1.1).



Schema 1.1. Preparazione dei liposomi.

Anche in questo caso per le frazioni molari $X = 0,00$ ed $X = 0,09$, sono stati ottenuti liposomi unilamellari per estrusione degli MLV

120 μ l delle sospensioni liposomiali così preparate, sia in presenza che in assenza di R-Flu, sono stati posti in un crogiolo di alluminio da 160 μ l e sottoposti allo stesso ciclo di analisi termica descritto prima.

1.18. Cinetiche di rilascio

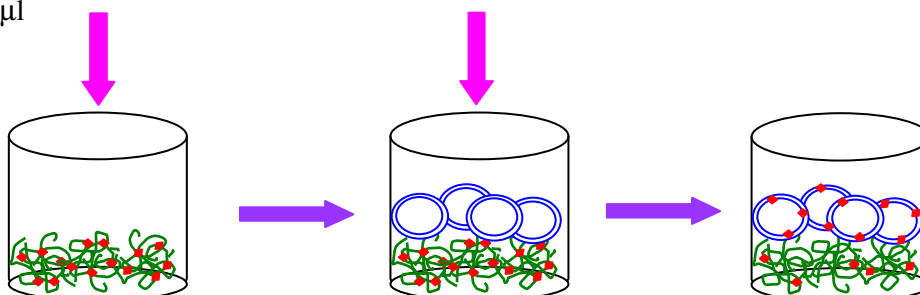
Queste misure sono state effettuate per verificare la capacità del diflunisal di essere rilasciato dall'idrogel, attraversare il mezzo acquoso, interagire con le membrane

modello ed eventualmente penetrare nelle stesse. Tali esperienze sono state eseguite pesando, in crogioli di alluminio da 160 μ l, un'esatta quantità di idrogel caricato con diflunisal (in modo da avere sempre la frazione molare 0,09 di diflunisal rispetto al fosfolipide) ed aggiungendo aliquote di 120 μ l di sospensione liposomiale (0,007375 mmoli di DMPC) in Tris 50 mM a pH = 7,4 o 4,0. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a cicli calorimetrici consistenti di tre fasi:

- 1) una scansione calorimetrica da 5 °C a 37 °C con un incremento di temperatura di 2 °C/min al fine di investigare l'interazione fra il composto e il modello di membrana, durante una prima fase di riscaldamento che porta i campioni ad una temperatura superiore alla T_m (37 °C);
- 2) un periodo d'incubazione di 60 minuti a 37 °C per permettere al composto, eventualmente rilasciato, di essere idratato, dissolversi nel mezzo acquoso e di permeare il bilayer lipidico che, a questa temperatura, si trova in uno stato di disordine;
- 3) una fase di raffreddamento del campione dalla temperatura d'incubazione (37 °C) alla temperatura di 5 °C, ad una velocità di 4 °C/min, per riportare il bilayer in uno stato ordinato prima di ripetere il ciclo dalla prima fase. Questa procedura è stata ripetuta almeno otto volte.

Una esatta quantità di idrogel caricato con diflunisal è pesata in un crogiolo d'alluminio da 160 μ l

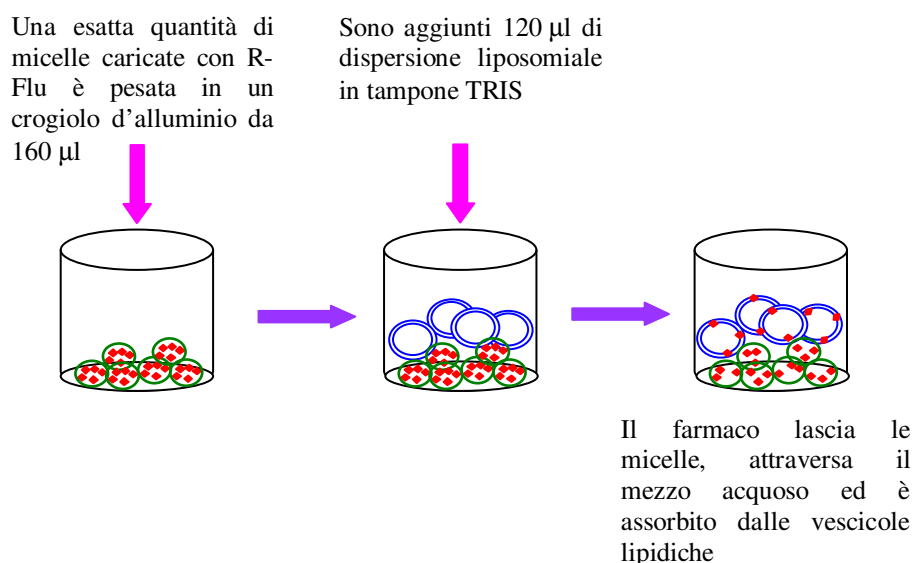
Sono aggiunti 120 μ l di dispersione liposomiale in tampone TRIS



Il farmaco lascia l'idrogel, attraversa il mezzo acquoso ed è assorbito dalle vescicole lipidiche

Allo stesso modo, per verificare la capacità delle micelle di rilasciare l'R-Flu sono state eseguite esperienze simili a quelle appena descritte. Infatti, è stata pesata, in crogioli di alluminio da 160 μ l, un'esatta quantità di micelle caricate con R-Flu, in

modo da avere sempre la frazione molare 0,09 di farmaco rispetto al fosfolipide, ed aggiungendo aliquote di 120 μl di sospensione liposomiale (0,007375 mmoli di DMPC) in tampone Tris a $\text{pH} = 7,4$. La frazione molare $X = 0,09$ è stata scelta poiché la curva calorimetrica, sia degli MLV che dei LUV, preparati in presenza di tale quantità di R-Flu, è estremamente modificata rispetto a quella delle vescicole di pura DMPC ma il picco della transizione ha ancora una forma ben definita, senza separazione di fase. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a cicli di analisi calorimetrica consistente nelle tre fasi descritte prima.



Inoltre, per essere certi che le modificazioni della curva calorimetrica delle vescicole di DMPC siano dovute solo al R-Flu e non alle micelle sono state effettuate delle prove in cui le sole micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA (alla stessa quantità utilizzata nelle prove effettuate con quelle caricate con il farmaco) sono state incubate con la stessa quantità di liposomi di DMPC.

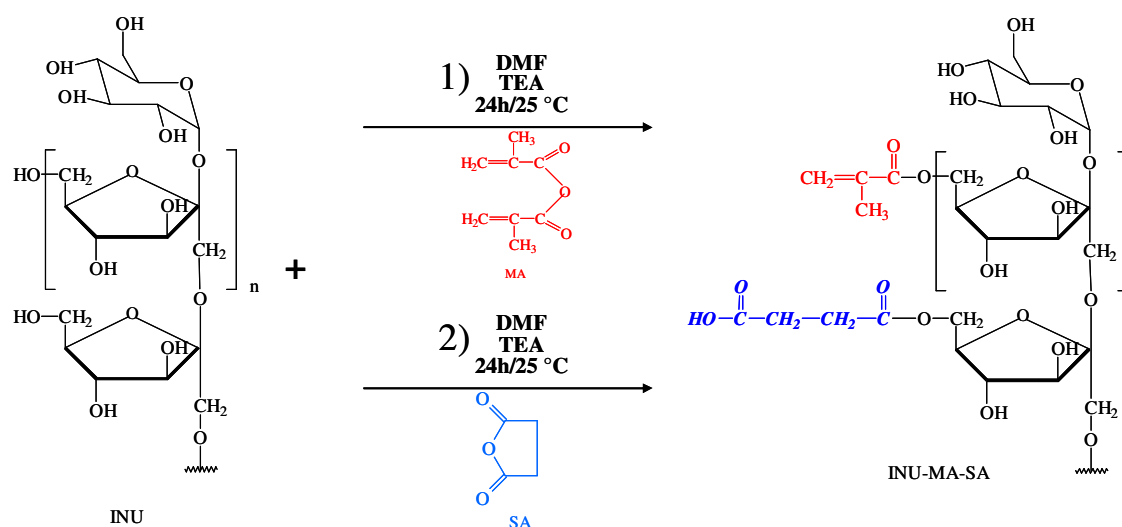
Infine, è stato fatto un esperimento in cui il solo R-Flu è stato incubato con gli MLV ed i LUV di DMPC. In tutti gli esperimenti la quantità di farmaco è stata mantenuta costante (frazione molare 0,09).

1.19. RISULTATI E DISCUSSIONE

1.19.1. Derivatizzazione dell'INU e caratterizzazione dell'INU-MA-SA

La derivatizzazione dell'inulina (INU) con l'anidride metacrilica (MA) e l'anidride succinica (SA) è stata effettuata in due fasi distinte e consecutive in DMF

come solvente, TEA come catalizzatore, senza l'isolamento di prodotti intermedi (Schema 1.2).



Schema 1.2. Schema di reazione tra INU, MA e SA.

Il derivato INU-MA-SA ottenuto è stato caratterizzato con spettrofotometria FT-IR, spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC), studi di degradazione chimica ed enzimatica con inulinasi.

In Figura 1.5 sono mostrati gli spettri FT-IR dell'INU-MA-SA e dell'inulina. Lo spettro del derivato INU-MA-SA, comparato con quello dell'inulina, ha mostrato nuove bande relative all'introduzione dei residui di MA e SA nella struttura dell'inulina. In particolare, la banda a 1737 cm^{-1} relativa alla nuova formazione di legami esterei tra SA o MA e l'inulina e la banda a 1290 cm^{-1} relativa allo scissoring del doppio legame della MA.

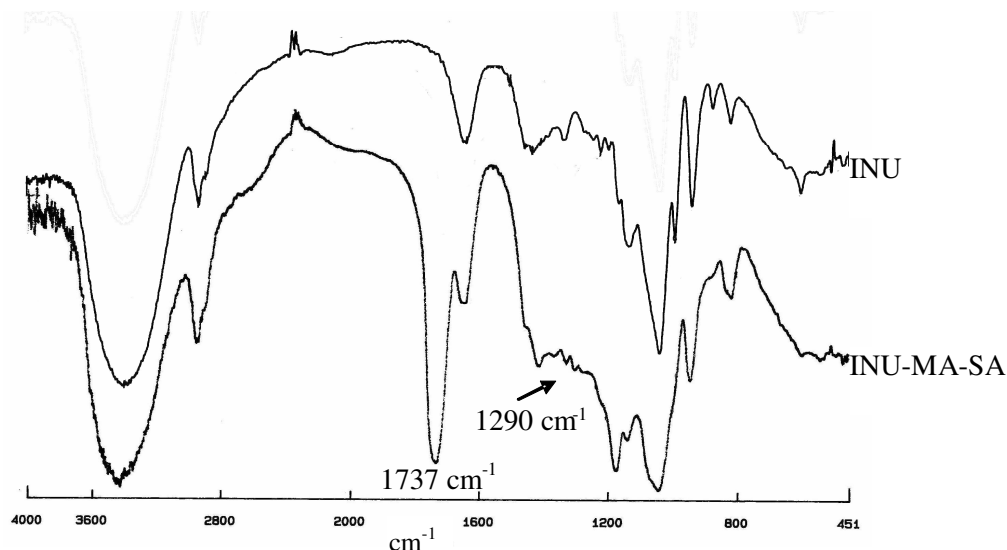


Figura 1.5. Spettro FT-IR dell'inulina e del derivato INU-MA-SA.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ conferma l'introduzione dei gruppi MA e SA nella struttura dell'inulina; in particolare, mostra i picchi a δ 1,96, 5,79 e 6,22 relativi al residuo MA e quello a δ 2,74 relativo al residuo di SA, come mostrato in Figura 1.6.

Il grado di derivatizzazione in MA e SA, calcolato con $^1\text{H-NMR}$ è risultato, rispettivamente, del 22 e del 30 % in moli rispetto alle unità ripetitive di inulina. La resa della reazione si è rivelata quantitativa.

Il derivato INU-MA-SA ha una buona solubilità in acqua a 25 °C se comparata con l'inulina pura che, a questa temperatura, mostra, invece, una bassa solubilità. Inoltre, il peso molecolare di INU-MA-SA è risultato essere, dall'analisi SEC, 9000 Da, quindi più alto di quello dell'inulina pura (5000 Da), confermando così che le delicate condizioni di reazione usate non influiscono sull'integrità strutturale dell'inulina di partenza.

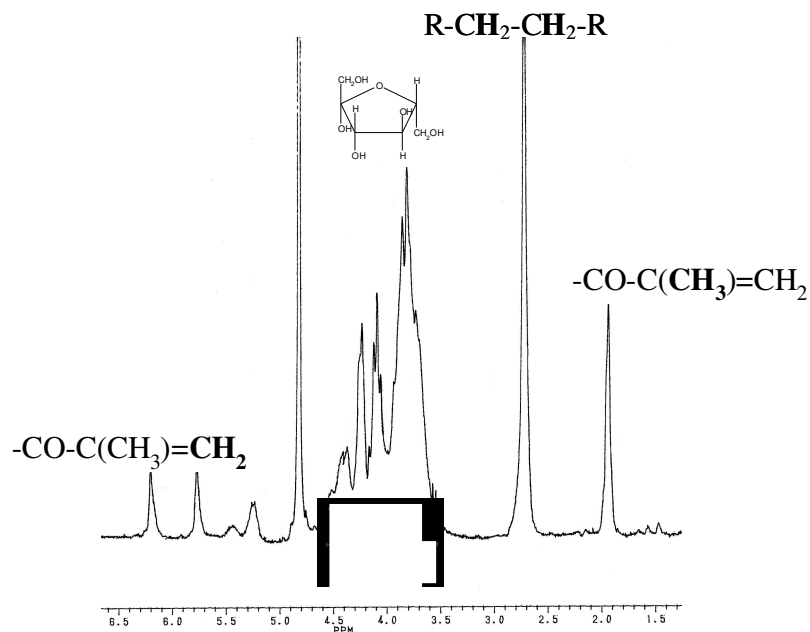


Figura 1.6. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato INU-MA-SA.

Allo scopo di ottenere l'idrogel, il derivato INU-MA-SA è stato irradiato usando un reattore UV Rayonet dotato di sedici lampade UV emettenti a 254 nm. 100 mg/ml della soluzione etanolica di INU-MA-SA sono stati irradiati per 1 ora. L'idrogel ottenuto, risultato insolubile in solventi organici ed acqua, è stato seccato e caratterizzato con FT-IR come mostrato in Figura 1.7.

Come si vede in figura, lo spettro FT-IR dell'idrogel di INU-MA-SA confrontato con quello del derivato INU-MA-SA mostra la scomparsa della banda a 1290 cm^{-1} , confermando così la riduzione del doppio legame di MA durante la reazione di crosslinking. Questo suggerisce che il crosslinking indotto dai raggi UV implica l'apertura dei doppi legami, probabilmente attraverso la formazione di radicali liberi che danno origine alla formazione di legami crociati inter/intrapolimerici.

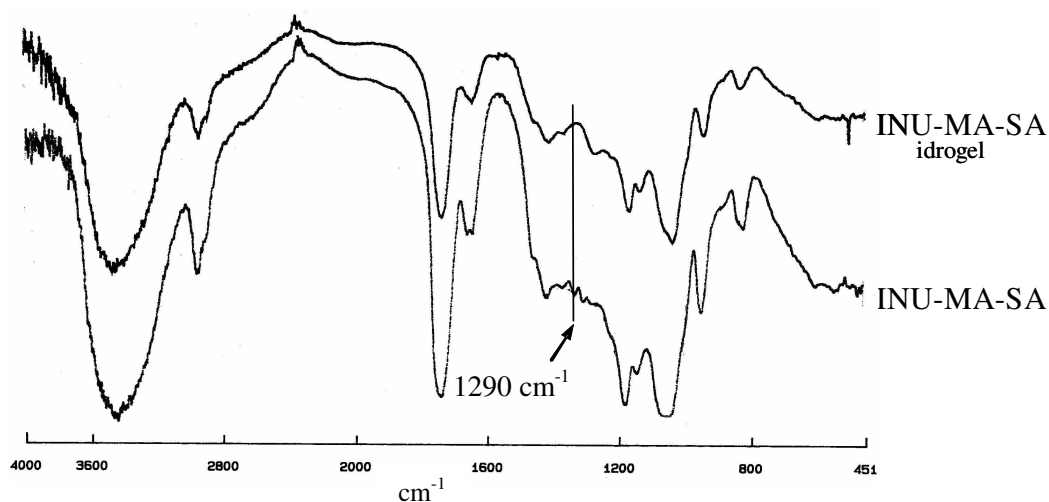


Figura 1.7. Spettro FT-IR dell'idrogel di INU-MA-SA e del derivato.

1.19.2. Studi di swelling

La capacità di swelling dell'idrogel di INU-MA-SA è stata valutata per mezzo di studi di swelling in vari mezzi acquosi, riproducenti alcuni fluidi fisiologici come la soluzione di HCl 0,1 N (pH 1,0, che simula i succhi gastrici), soluzione tampone fosfato pH 6,8 (che simula il fluido intestinale) e soluzione tampone fosfato pH 7,4 (fluido fisiologico) oltre all'acqua bidistillata.

I dati di swelling in termini di q ($q = W_s/W_d$ dove W_s e W_d sono i pesi del campione rigonfiato e di quello secco, rispettivamente) sono riportati in Figura 1.8. Tutti i risultati hanno evidenziato una buona affinità dell'idrogel INU-MA-SA verso il mezzo acquoso in dipendenza del pH del mezzo. È evidente, come aspettato, che a pH 1,0 c'è un abbassamento del valore di q dovuto alla presenza di gruppi acidi, indissociati a questo valore di pH. Quando il pH è 6,8 o 7,4, l'acqua riassorbita è maggiore, e quindi il valore di q cresce, come conseguenza della repulsione elettrostatica tra le catene polimeriche, dovuta all'incremento dei gruppi dissociati a questo valore di pH. Tuttavia, il valore di q a pH 6,8 o 7,4 è più basso di quello trovato in acqua bidistillata dovuto alla forza ionica e alla pressione osmotica del mezzo PBS.

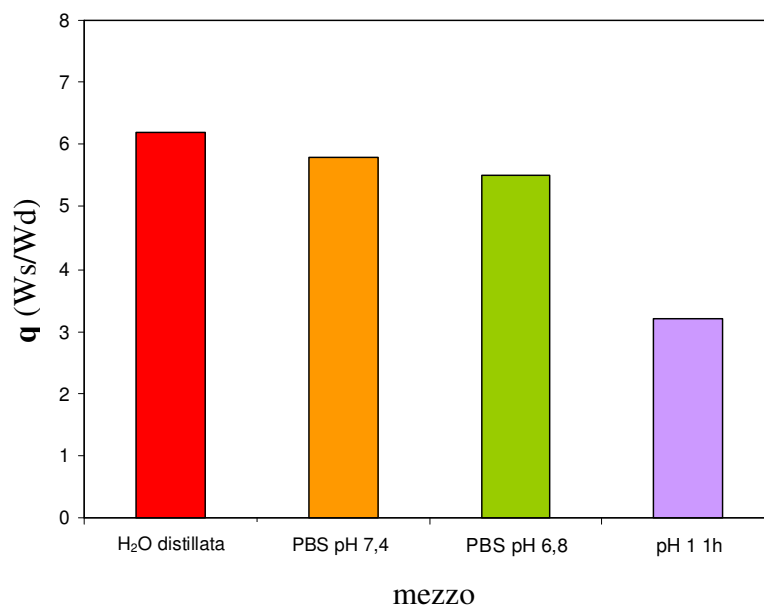


Figura 1.8. Studi di swelling in diversi mezzi per l'idrogel di INU-MA-SA.

1.19.3. Degradazione chimica

Con l'obiettivo di valutare il profilo di degradazione chimica dell'idrogel di INU-MA-SA, la degradazione dell'idrogel è stata misurata in differenti mezzi, prendendo in considerazione anche la degradazione acida dell'inulina pura. Le prove di degradazione chimica sono state effettuate in PBS a pH 4,7, 6,8, 7,4 per 24 ore e in HCl 0,1 N per 1, 2 o 24 ore. I risultati sono mostrati in Figura 1.9. Dopo il periodo di incubazione, sono state determinate la resa del campione recuperato ed il suo valore di q (riferito alle 24 ore), in acqua bidistillata.

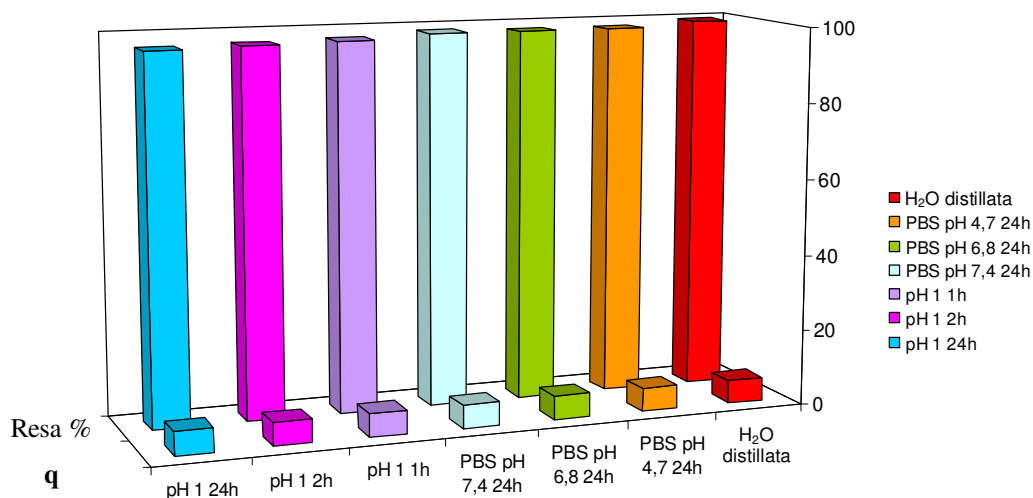


Figura 1.9. Resa % (W/W) e valore di q dopo idrolisi chimica dell'idrogel INU-MA-SA.

Come mostrato in figura, quasi tutto l'idrogel è stato recuperato dopo gli studi di idrolisi chimica; infatti, la resa dell'idrogel recuperato è simile a quella dei campioni trattati in acqua distillata. Un'ulteriore conferma si ha dal valore di q dell'idrogel trattato, che rimane approssimativamente invariato, provando così che non si ha alcuna degradazione quando gli studi di idrolisi chimica sono effettuati sia in PBS a differenti valori di pH che in HCl 0,1 N fino a 24 ore. Questo è un risultato eccellente considerando la bassa resistenza dell'inulina pura in mezzo acido (*Taufel K. and Steinbach K.J., 1959; Vervoot L. et al., 1998*).

1.19.4. Degradazione enzimatica

Con lo scopo di studiare la degradazione enzimatica del derivato INU-MA-SA e dell'idrogel, entrambi i composti sono stati sottoposti alla degradazione dell'inulinasi. L'inulinasi è una β -fruttosidasi e rimuove le unità di fruttosio dall'estremità non riducente della molecola di inulina o di certi zuccheri aventi un'unità di fruttosio all'estremità in posizione β 2,1: questi enzimi possono essere definiti come 2,1 β -D frutto-fruttano idrolasi. Inulinasi con attività β -fruttosidasica sono contenute in piante e microrganismi, inclusi funghi, lieviti, e batteri.

Sono stati effettuati sia studi enzimatici qualitativi che quantitativi, rispettivamente per il derivato solubile INU-MA-SA e per l'idrogel reticolato insolubile. In particolare, le analisi qualitative sono state effettuate con cromatografia su strato sottile usando orcinolo come rivelatore di fruttosio, il prodotto finale della degradazione enzimatica dell'inulina. Dopo 24 ore di incubazione del derivato INU-MA-SA la soluzione di degradazione è stata analizzata con TLC; la macchia relativa alla degradazione polimerica è apparsa, indicando così che il derivato è specificamente degradato dalla inulinasi. Il saggio quantitativo del fruttosio, liberato dalla degradazione enzimatica dell'idrogel INU-MA-SA, è stato effettuato usando il metodo colorimetrico dell'antrone. In questo caso la degradazione dell'idrogel è risultata del 53 ± 3 % in peso rispetto al peso del campione iniziale. Questi risultati sono molto interessanti poiché confermano che sia il derivato INU-MA-SA che l'idrogel sono degradabili dalla inulinasi. Questo consente di utilizzare tale idrogel nella formulazione di sistemi di rilascio di farmaci specifici per il colon, tenendo anche conto della buona affinità in acqua e dell'assenza di idrolisi chimica in condizioni gastriche simulate.

1.19.5. Incorporazione del diflunisal nella matrice di INU-MA-SA

Con l'obiettivo di verificare l'abilità dell'idrogel di INU-MA-SA di incorporare e rilasciare i farmaci, è stato scelto, come farmaco modello, il diflunisal. L'incorporazione del diflunisal nell'idrogel di INU-MA-SA è stata ottenuta durante la reazione di crosslinking ottenendo tre differenti concentrazioni di farmaco, 10,4, 17 e 24 % in peso, rispetto al polimero di partenza.

La determinazione dello stato di dispersione del farmaco nell'idrogel di INU-MA-SA è stata ottenuta con analisi ai raggi X. Il diflunisal puro è in uno stato cristallino, mentre quando è inserito nell'idrogel di INU-MA-SA è in uno stato amorfo. Anche l'idrogel non caricato con il farmaco risulta avere una struttura amorfa differentemente dall'inulina, che mostra uno stato cristallino (*Ronkart S. et al., 2006*). I dati ottenuti dimostrano che, durante la reazione di crosslinking, non si forma nessuna regione cristallina e che il farmaco è molecolarmente intrappolato all'interno del reticolo, in uno stato fisico prontamente disponibile per il processo di dissoluzione nel mezzo di rilascio.

1.19.6. Interazione tra le biomembrane modello ed i farmaci

Interazione LUV/Diflunisal

L'interazione del diflunisal con lo strato fosfolipidico dei LUV è stata valutata comparando le curve calorimetriche delle dispersioni liposomiali di DMPC contenenti differenti frazioni molari di diflunisal con la curva calorimetrica della dispersione liposomiale di DMPC pura come mostrato in Figura 1.10. La curva calorimetrica dei LUV di DMPC è caratterizzata da un picco di pretransizione, a circa 16,5 °C, relativo al ripiegamento delle code idrofobiche, e da un picco, a circa 25 °C, relativo alla transizione del fosfolipide da uno stato ordinato, o di gel, a uno disordinato, o di cristallo liquido, e ogni cambiamento in questa curva indica che il diflunisal interagisce con il doppio strato fosfolipidico.

Per valutare l'influenza del pH sull'interazione diflunisal/LUV le prove sono state effettuate a pH 7,4 e 4,0.

A pH 7,4 (Figura 1.10), il diflunisal, con l'incremento della sua frazione molare, causa la scomparsa del picco di pretransizione, un graduale spostamento verso temperature più basse e un allargamento del picco calorimetrico principale. Alla frazione molare 0,12 si osserva una separazione di fase che indica che il diflunisal non

si distribuisce uniformemente nel doppio strato fosfolipidico, ma si formano zone più ricche e zone più povere di diflunisal. Quindi, per monitorare il rilascio è stata utilizzata la frazione molare 0,09 che influenza notevolmente il doppio strato fosfolipidico ma è associata ad un picco calorimetrico ben definito.

A pH 4,0 (Figura 1.11), all'aumentare della frazione molare di farmaco presente, si osserva una diminuzione della T_m e un allargamento del picco.

La Figura 1.12 mostra la variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici dei LUV di DMPC, riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$; dove T_m è la temperatura di transizione dei LUV che contengono il diflunisal e T_m^0 è la temperatura di transizione dei LUV di DMPC pura), in funzione della frazione molare di diflunisal presente nella dispersione liposomiale. Si osserva un notevole decremento della temperatura di transizione; inoltre tale decremento è proporzionale all'aumento della frazione molare di diflunisal, ed è maggiore a pH 4,0, come ci si poteva aspettare, considerata la natura acida del diflunisal.

Questi risultati indicano che il diflunisal interagisce con i LUV di DMPC aumentando la fluidità del doppio strato fosfolipidico. Inoltre l'interazione è proporzionale alla quantità di diflunisal presente nella dispersione liposomiale.

I risultati di tali esperimenti rappresentano la massima interazione fra il diflunisal e i LUV e saranno utilizzati come riferimento per le prove di rilascio.

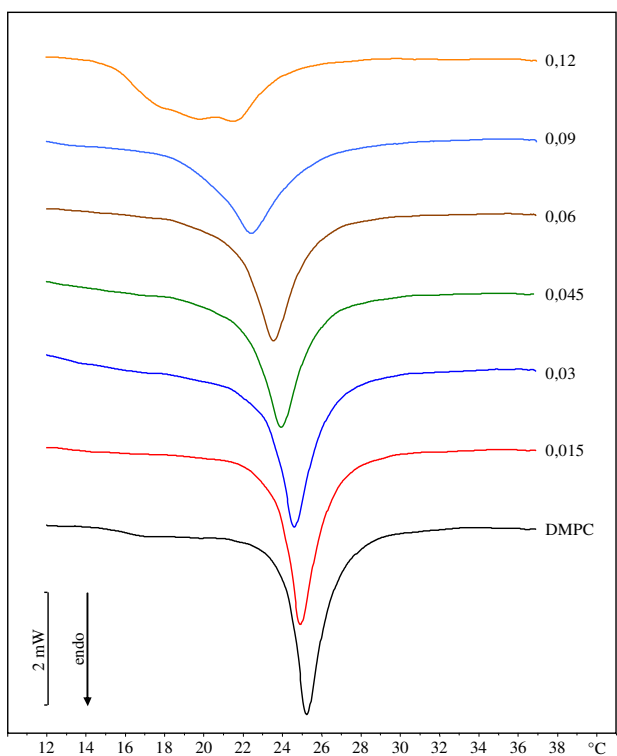


Figura 1.10. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei LUV di DMPC contenenti frazioni molar crescenti di diflunisal preparati a pH 7,4.

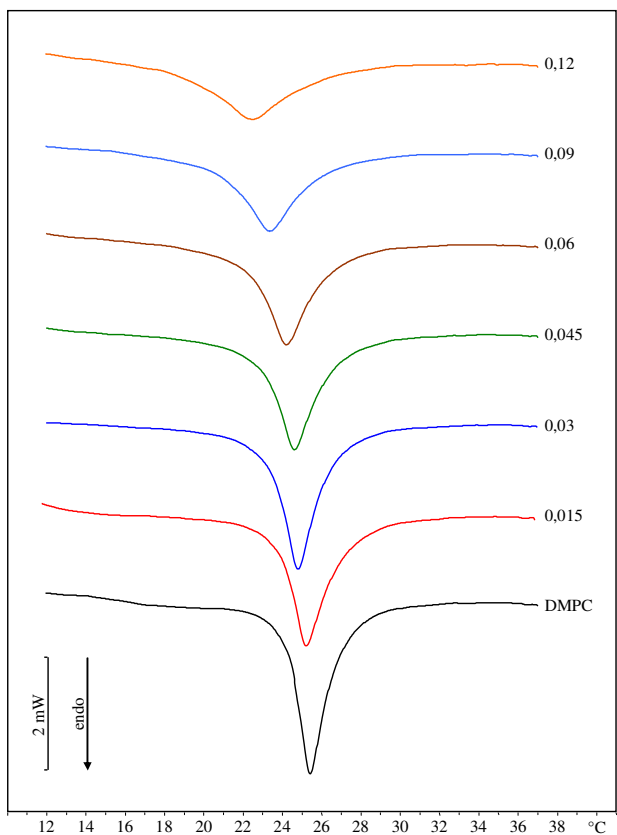


Figura 1.11. Curve calorimetriche, in riscaldamento, di LUV di DMPC contenenti frazioni molar crescenti di diflunisal preparati a pH 4,0.

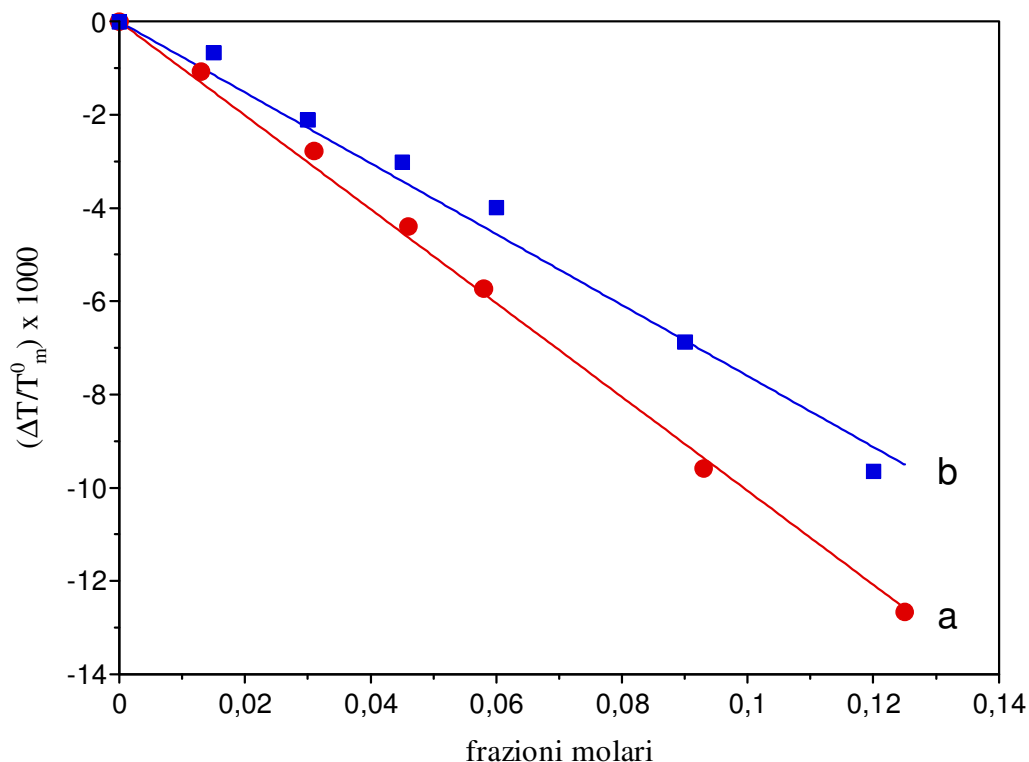


Figura 1.12. Temperatura di transizione dei LUV di DMPC, riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$; dove T_m è la temperatura di transizione dei LUV che contengono il diflunisal e T_m^0 è la temperatura di transizione dei LUV di DMPC pura), in funzione della frazione molare di diflunisal presente nella dispersione liposomiale, determinata a pH 4,0 (a) e pH 7,4 (b).

Interazione MLV/R-Flu

È stato studiato l'effetto del R-Flu sul comportamento termotropico degli MLV, le curve DSC delle vescicole di DMPC pura sono state confrontate con le curve delle vescicole preparate in presenza di differenti frazioni molari di R-Flu, come mostrato in Figura 1.13. Il picco di pretransizione scompare già alla più bassa frazione molare di farmaco ($X = 0,015$), ed il picco di transizione all'aumentare della frazione molare di R-Flu all'interno dei liposomi si sposta a temperature più basse diventando, inoltre, via via più slargato. Nella curva calorimetrica della frazione molare $X = 0,12$ è possibile evidenziare la presenza di una separazione di fase, che può essere spiegata con una distribuzione non omogenea del farmaco all'interno del bilayer lipidico ovvero con la formazione di zone più ricche e più povere di farmaco.

La Figura 1.14 mostra l'andamento delle temperature di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di R-Flu in funzione della frazione molare presente nella dispersione lipidica acquosa. La variazione della temperatura di transizione è riportata

come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza del farmaco esaminato e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura). Si osserva un notevole decremento della temperatura di transizione, proporzionale all'aumento della frazione molare di R-Flu.

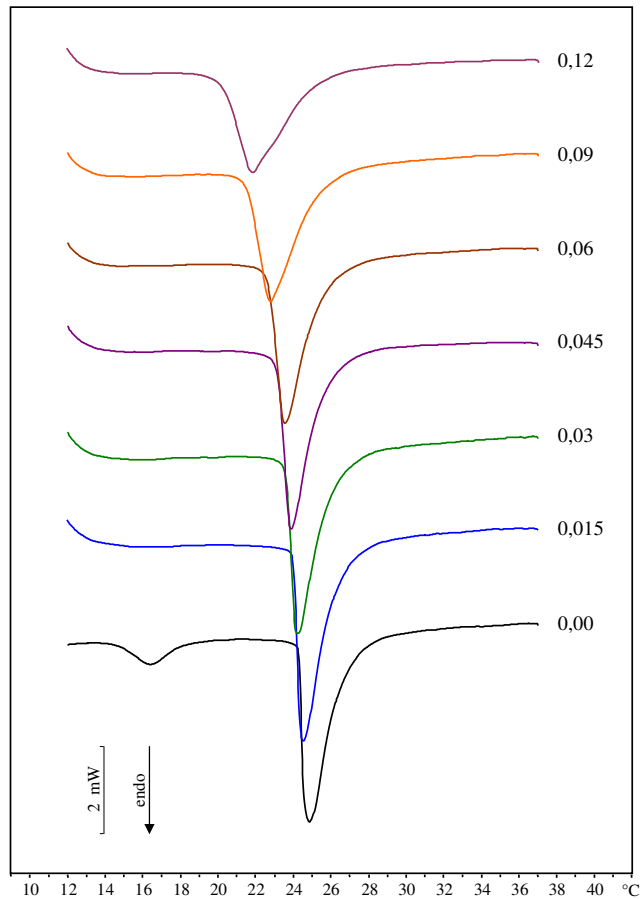


Figura 1.13. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV di DMPC pura ed in presenza di differenti frazioni molari di R-Flu.

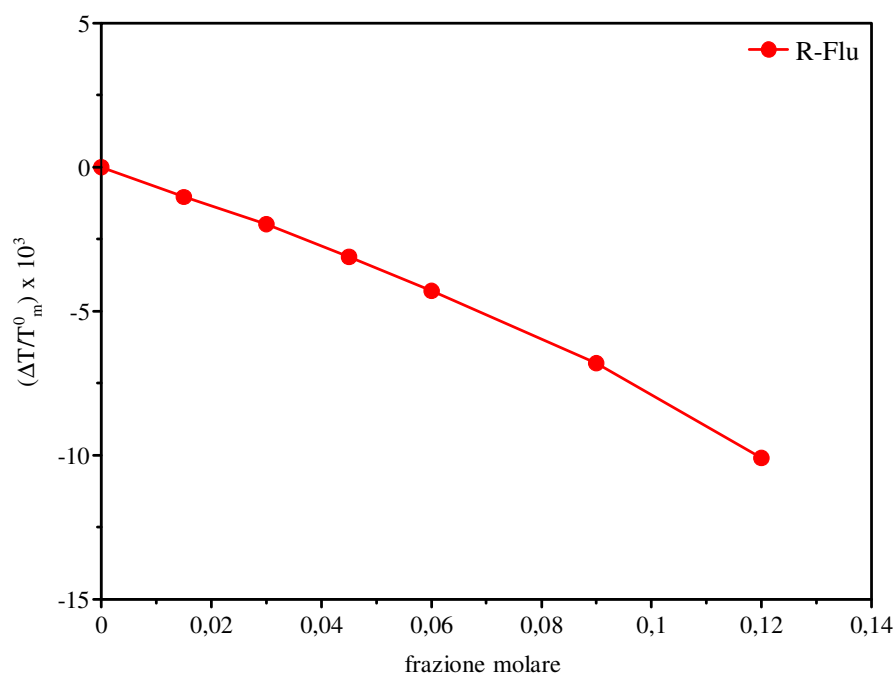


Figura 1.14. Temperatura di transizione riportata come $\Delta T/T_m^0$ dei picchi calorimetrici di liposomi di DMPC in funzione di differenti frazioni molari di R-Flu nella dispersione liposomiale.

1.19.7. Cinetiche di rilascio

Rilascio del diflunisal dall'idrogel

Il rilascio del diflunisal dall'idrogel è stato seguito valutando la variazione del picco calorimetrico dei LUV di DMPC dovuta all'interazione del farmaco con il bilayer fosfolipidico. Per tale motivo, un'aliquota dell'idrogel, caricato con diverse quantità di diflunisal (10,4 %, 17 % e 24 %), in modo da avere sempre la frazione molare 0,09 di diflunisal rispetto al fosfolipide, è stata incubata con una determinata quantità della dispersione acquosa di LUV di DMPC.

Per essere certi che le modificazioni della curva calorimetrica dei LUV fossero dovute solo al diflunisal e non all'idrogel sono state effettuate delle prove in cui il solo idrogel (alla stessa quantità delle prove effettuate con l'idrogel caricato con il diflunisal) è stato incubato con la stessa quantità di LUV di DMPC.

Inoltre, è stato condotto un esperimento in cui il solo diflunisal è stato incubato con i LUV di DMPC. In tutti gli esperimenti la quantità di farmaco è stata mantenuta costante (frazione molare 0,09).

Per determinare l'influenza del pH sul processo di rilascio, tutti gli esperimenti sono stati effettuati a pH 7,4 (che simula il pH intestinale) e 4,0 (che simula il pH gastrico).

Misure eseguite a pH 7,4

La Figura 1.15 mostra le curve calorimetriche dell'esperimento relativo all'idrogel. Tali curve sono confrontate con quella dei LUV di DMPC pura. Non si osservano variazioni delle curve calorimetriche neanche dopo 22 ore di incubazione sia per il picco di pretransizione sia per quello di transizione. Ciò indica che il solo idrogel non influenza la transizione di fase gel-cristallo liquido del doppio strato fosfolipidico dei LUV.

La Figura 1.16 mostra le curve calorimetriche dell'esperimento effettuato con il diflunisal. Le curve sono confrontate con quella dei LUV di DMPC e con quella dei LUV di DMPC contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09 e rappresentante la massima interazione fra il doppio strato fosfolipidico e il diflunisal (curva **r**). Il picco di pretransizione scompare dopo un'ora di incubazione. Il picco calorimetrico principale, con l'aumentare del tempo di incubazione, si sposta verso temperature più basse e si allarga notevolmente sovrapponendosi alla curva **r**.

La Figura 1.17 (A-C) mostra le curve calorimetriche dei LUV di DMPC posti a contatto con l'idrogel caricato con il diflunisal. Le curve sono confrontate con la curva calorimetrica della dispersione acquosa di LUV di DMPC pura e di LUV contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09 (curva **r**). Nelle curve relative all'idrogel con un drug loading del 10,4 % (Figura 1.17 A) si osserva un allargamento ed uno spostamento del picco verso temperature minori durante le prime tre ore d'incubazione. Dopo sei ore si evince un evidente cambiamento, infatti la velocità di rilascio aumenta e la curva **r** viene raggiunta. Per quanto riguarda le curve calorimetriche relative all'idrogel con un drug loading del 17 % (Figura 1.17 B), si osserva che la pretransizione diminuisce durante le prime quattro ore di contatto e che il picco calorimetrico principale si allarga e si sposta verso temperature più basse fino a raggiungere il picco della curva **r**. Le curve calorimetriche dell'idrogel con un drug loading del 24 % sono mostrate in Figura 1.17 C. Il picco di pretransizione scompare nelle prime ore di contatto il picco calorimetrico principale si allarga e si sposta verso temperature più basse senza però raggiungere quello della curva **r**.

I valori della variazione della temperatura di transizione delle curve calorimetriche di tali esperimenti sono mostrati in Figura 1.18, come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$; dove T_m è la temperatura di transizione dei LUV che contengono il diflunisal e T_m^0 è la temperatura di transizione dei LUV di DMPC pura), in funzione del tempo di incubazione. (Il valore **r** è relativo alla curva **r** delle Figure 1.17 A-C e rappresenta il

massimo decremento di temperatura dei LUV in presenza di diflunisal alla frazione molare 0,09). Il solo idrogel non determina alcuna variazione della temperatura di transizione. Poiché il decremento della temperatura di transizione dei LUV di DMPC è proporzionale alla quantità di diflunisal che interagisce con il doppio strato fosfolipidico, la misura di tale valore ci consente di determinare la quantità di diflunisal che è rilasciato dall'idrogel ed è assorbito dai LUV. Il diflunisal non caricato nell'idrogel causa un rapido decremento della temperatura di transizione che raggiunge dopo solo 3 ore il valore r indicando che esso è velocemente assorbito dal doppio strato fosfolipidico. Il rilascio del diflunisal dall'idrogel e la conseguente interazione con il bilayer fosfolipidico è molto diversa in base al drug loading. Per l'idrogel con un drug loading del 10,4 % durante le prime cinque ore d'incubazione si osserva un rilascio minimo, quindi la velocità cresce e l'effetto finale è simile a quello osservato per l'interazione tra LUV e diflunisal preparati in fase organica (valore r). L'idrogel con un drug loading del 17 % ha un rilascio un po' più lento di quello osservato con il diflunisal libero, ed il rilascio è completo dopo cinque ore d'incubazione. Anche l'idrogel con un drug loading del 24 % rilascia una buona quantità di diflunisal determinando un rapido ed elevato decremento della temperatura di transizione che, tuttavia, non raggiunge il valore r . Con riferimento al drug loading del 17 % e del 24 %, nei primi minuti il rilascio di diflunisal è più veloce rispetto a quello ottenuto dal diflunisal libero probabilmente perché nell'idrogel il diflunisal è soprattutto molecularmente disperso. Il maggiore rilascio ottenuto con un drug loading del 17 % rispetto a quello ottenuto con il 24 % potrebbe essere dovuto al fatto che nel primo caso il diflunisal si trova molecularmente disperso nell'idrogel mentre, nel secondo caso, a causa della maggiore quantità, forma anche degli aggregati che, seppur amorfi, ne limitano il completo rilascio.

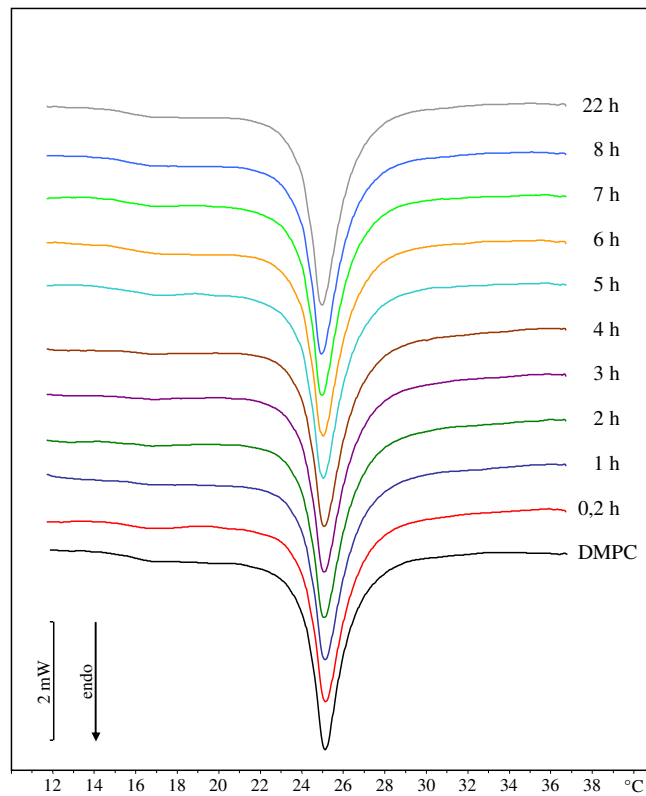


Figura 1.15. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con l'idrogel di INU-MA-SA a tempi di incubazione crescenti.

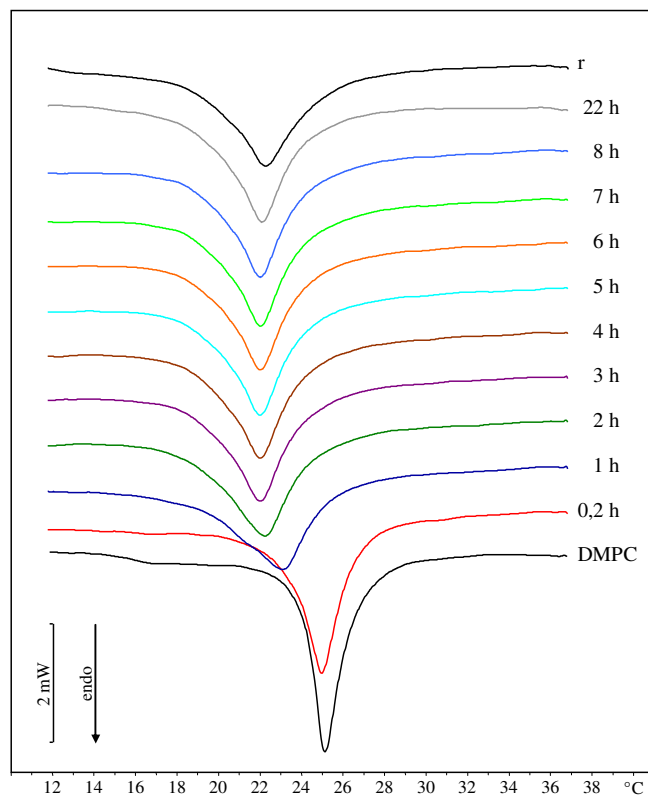


Figura 1.16. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con il diflunisal alla frazione molare 0,09 a tempi di incubazione crescenti. La curva r è relativa ai LUV di DMPC contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09.

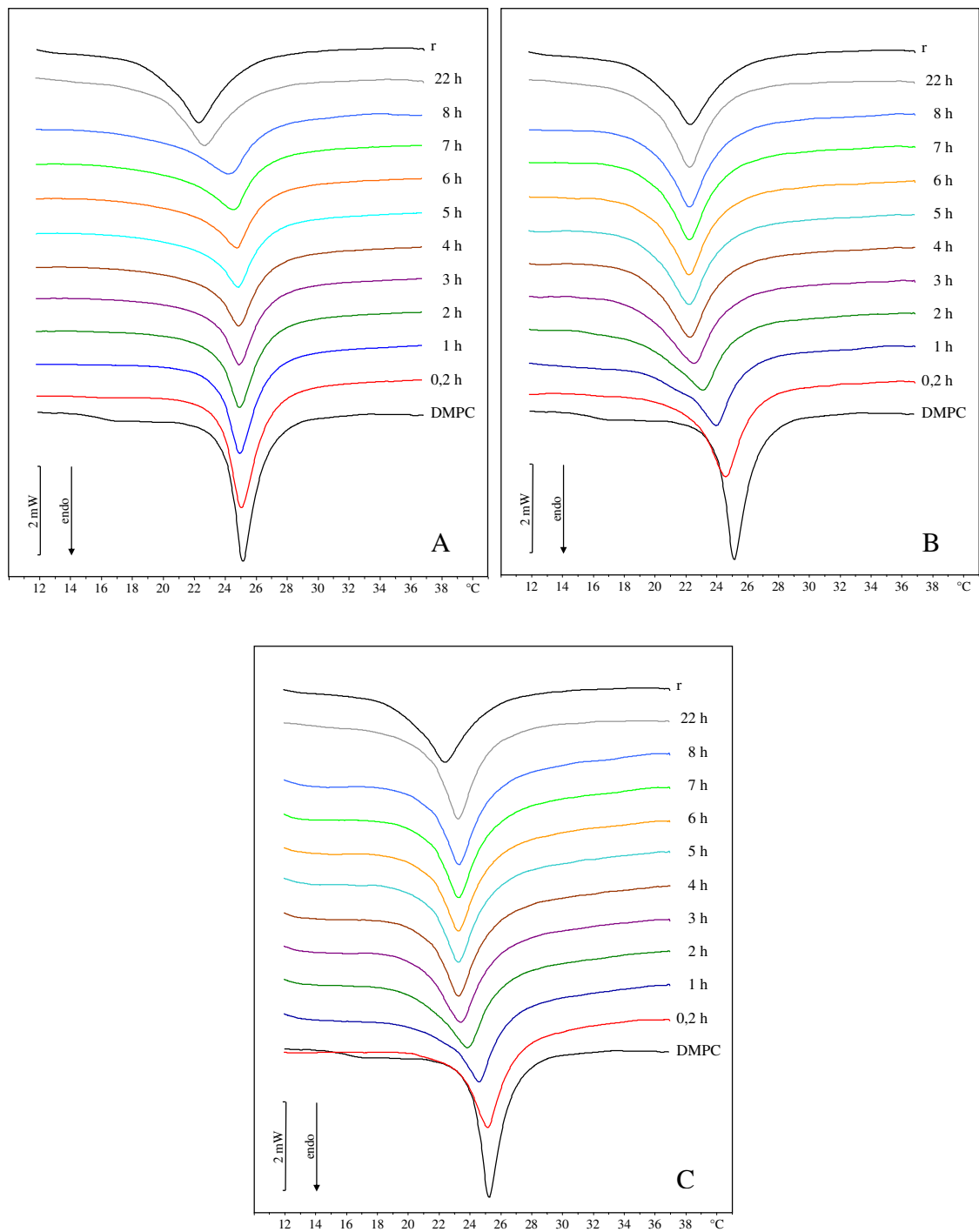


Figura 1.17. Curve calorimetriche, in riscaldamento, di LUV di DMPC lasciati in contatto con l'idrogel di INU-MA-SA contenente diflunisal (A: drug loading 10,4 %; B: drug loading 17 %; C: drug loading 24 %) a tempi di incubazione crescenti. La curva r è relativa ai LUV di DMPC contenenti diflunisal alla frazione molare 0,09.

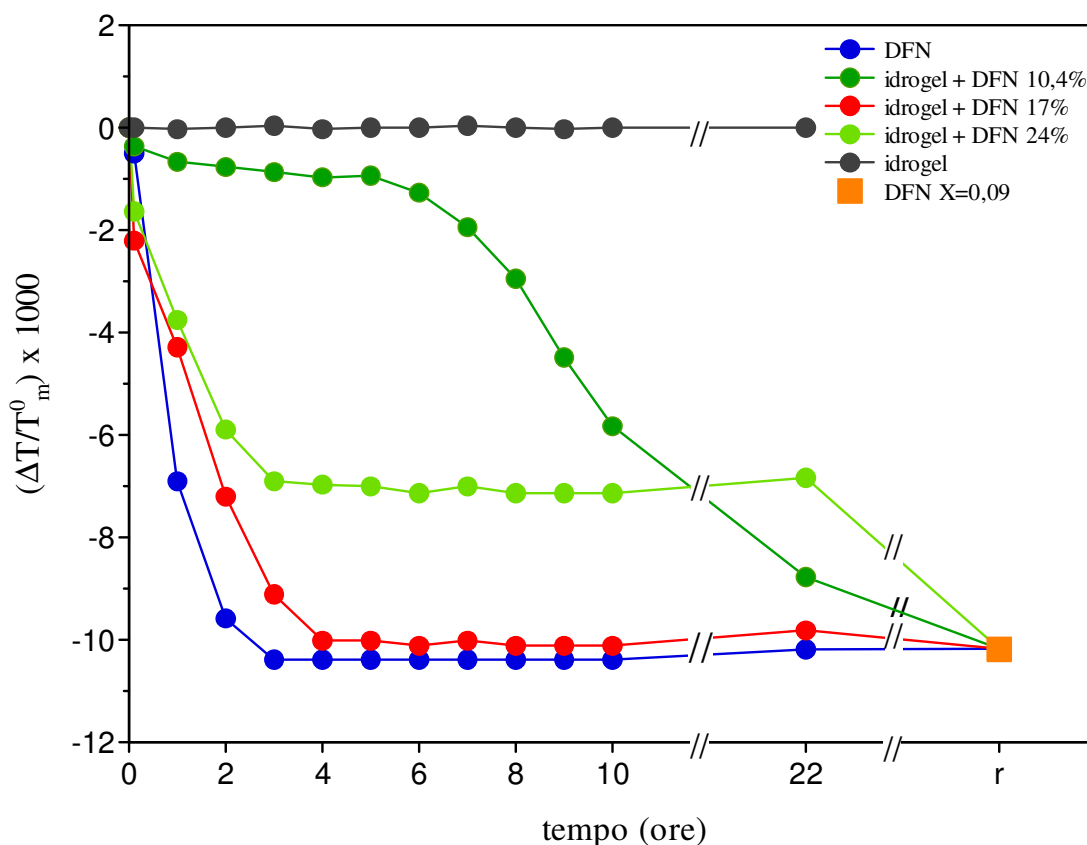


Figura 1.18. Temperatura di transizione, come $\Delta T/T_m^0$ dei LUV di DMPC lasciati in contatto con l'idrogel, il diflunisal e l'idrogel caricato con il diflunisal, in funzione del tempo di incubazione. ($\Delta T = T_m - T_m^0$; dove T_m è la temperatura di transizione dei LUV contenenti il diflunisal e T_m^0 è la temperatura di transizione dei LUV di DMPC pura). Il valore **r** rappresenta il massimo decremento di temperatura di transizione del doppio strato fosfolipidico in presenza di diflunisal alla frazione molare 0,09.

Misure eseguite a pH 4,0

La Figura 1.19 mostra le curve calorimetriche dei LUV di DMPC messi a contatto con l'idrogel, esse sono comparate con quella dei LUV di DMPC pura. Si osserva un piccolo spostamento del picco calorimetrico principale verso temperature più alte, ciò è indicativo di un effetto stabilizzante sul bilayer fosfolipidico da parte dell'idrogel.

La Figura 1.20 mostra le curve calorimetriche dei LUV di DMPC posti in contatto con il diflunisal alla frazione molare 0,09 e la curva **r** della dispersione acquosa dei LUV contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09. Il picco di transizione si allarga e si sposta verso temperature più basse con l'aumentare del tempo di contatto fino a sovrapporsi alla curva **r**.

In Figura 1.21 (A-C) sono mostrate le curve calorimetriche dei LUV di DMPC posti a contatto con l'idrogel caricato con il diflunisal. Le curve sono confrontate con la curva calorimetrica della dispersione acquosa dei LUV di DMPC pura e dei LUV

contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09 (curva **r**). Con riferimento all'idrogel con un drug loading del 10,4 %, (Figura 1.21 A) si osserva l'allargamento del picco, mentre la temperatura di transizione rimane pressoché invariata, non raggiungendo la curva **r**. Il diflunisal rilasciato dall'idrogel con un drug loading del 17 % (Figura 1.21 B) determina l'allargamento del picco calorimetrico principale che, inoltre si sposta verso temperature più basse fino a sovrapporsi alla curva **r**. Per quanto riguarda la cinetica eseguita con l'idrogel con un drug loading del 24 % (Figura 1.21 C), mostra un andamento simile a quello osservato per il campione con un drug loading del 17 %, ma la curva di riferimento non viene raggiunta e l'allargamento del picco è meno evidente.

I valori della variazione della temperatura di transizione sono mostrati in Figura 1.22, come $\Delta T/T_m^0$, in funzione del tempo di incubazione. Il solo idrogel causa un aumento della temperatura di transizione per le prime sei ore d'incubazione, quindi rimane pressoché costante, indicando l'instaurarsi, a pH 4,0 di una piccola interazione con lo strato fosfolipidico dei LUV. L'interazione dell'inulina con il doppio strato fosfolipidico è stata mostrata anche da *Demel R.A. et al., 1998*. Il diflunisal non incorporato nell'idrogel provoca un graduale abbassamento della temperatura di transizione fino a raggiungere il valore **r** indicando che esso è gradualmente e completamente assorbito dal doppio strato fosfolipidico. La quantità di diflunisal rilasciata dall'idrogel con un drug loading del 10,4 % è molto bassa, ciò è dovuto sia alla minore quantità di farmaco caricata nell'idrogel, che al minore swelling, a questo valore di pH, dell'idrogel ed alla bassa solubilità del farmaco nel mezzo acquoso. Anche a pH 4,0, così come già detto per il pH 7,4, il rilascio di diflunisal dall'idrogel con drug loading 24 % è più lento di quello dell'idrogel caricato al 17 %, ed il valore **r** non viene raggiunto indicando la formazione di aggregati che ostacolano, insieme alla migrazione attraverso la rete polimerica, la dissoluzione del farmaco. La miglior percentuale di loading risulta essere il 17 %, infatti le caratteristiche del rilascio sono molto simili a quelle del farmaco libero, permettendo un completo rilascio ed un trasferimento del diflunisal alle biomembrane modello.

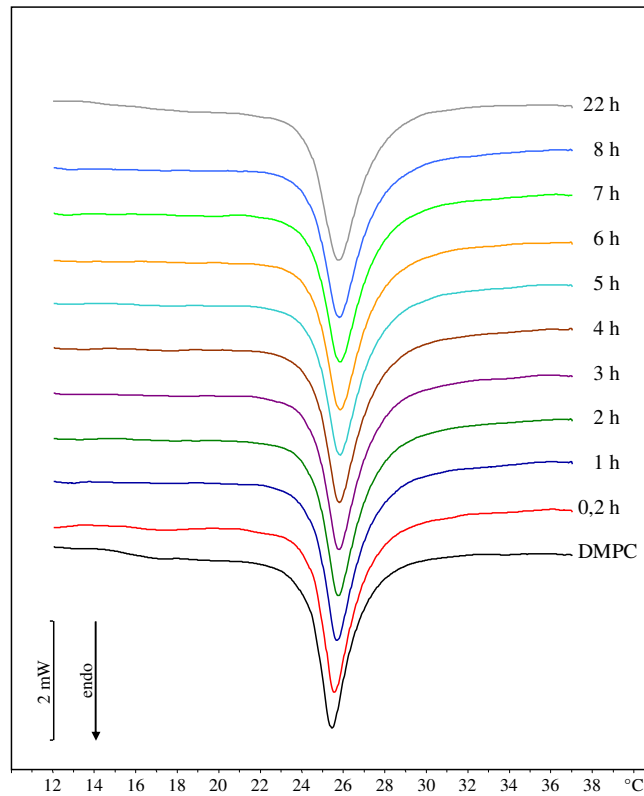


Figura 1.19. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con l'idrogel di INU-MA-SA.

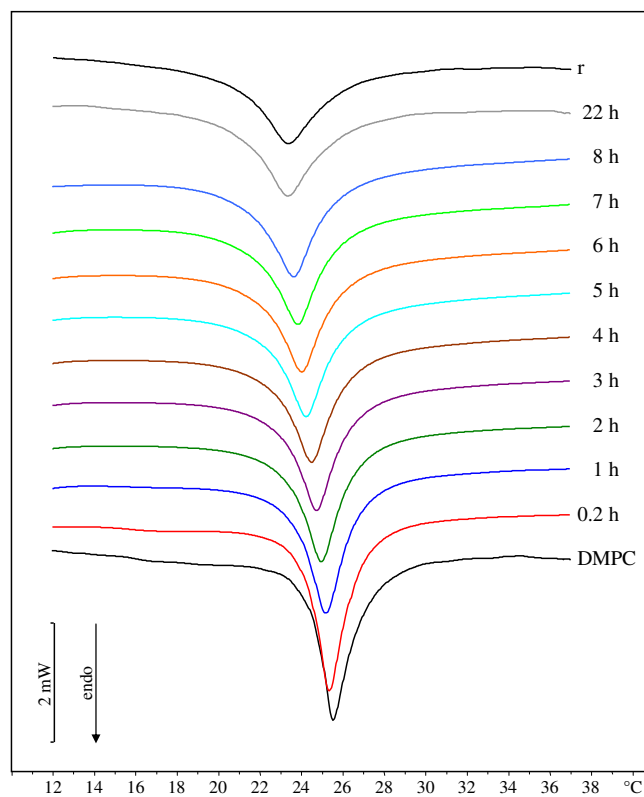


Figura 1.20. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con il diflunisal alla frazione molare 0,09 a tempi di incubazione crescenti. La curva r è relativa ai LUV di DMPC contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09.

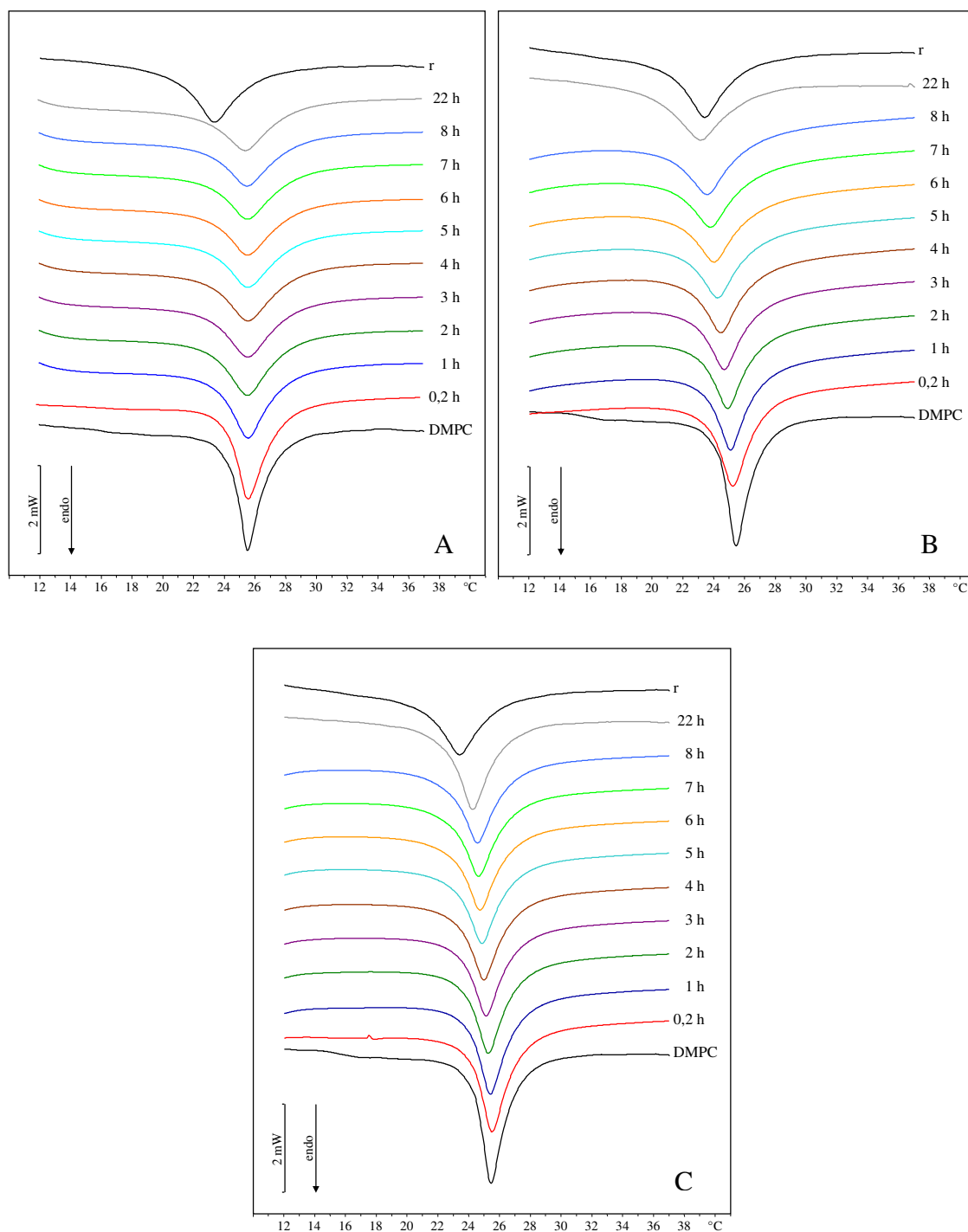


Figura 1.21. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con l'idrogel di INU-MA-SA contenente il diflunisal (A: drug loading 10,4 %; B: drug loading 17 %; C: drug loading 24 %) a tempi di incubazione crescenti. La curva **r** è relativa ai LUV di DMPC contenenti il diflunisal alla frazione molare 0,09.

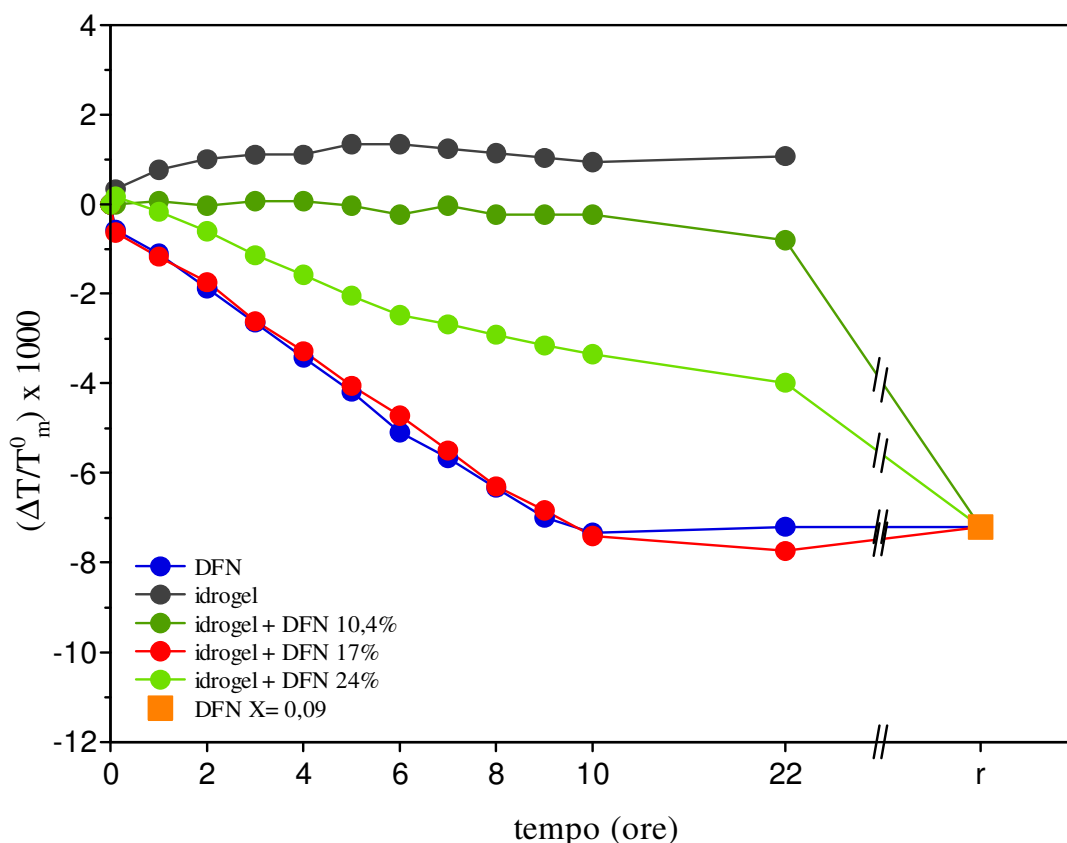


Figura 1.22. Temperatura di transizione, come $\Delta T/T_m^0$, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con l'idrogel, il diflunisal e l'idrogel caricato con il diflunisal, in funzione del tempo di incubazione. Il valore r rappresenta il massimo decremento di temperatura di transizione del doppio strato fosfolipidico in presenza di diflunisal alla frazione molare 0,09.

Rilascio di R-Flu dalle micelle polimeriche

La Figura 1.23 mostra le curve calorimetriche dell'esperimento relativo alle micelle vuote (la quantità necessaria per avere la frazione molare 0,09 di farmaco negli esperimenti di rilascio eseguiti con le micelle cariche) lasciate in contatto con MLV e LUV di DMPC pura. Le curve, ottenute per scansioni successive, al crescere del tempo d'incubazione, non mostrano alcuna variazione rispetto alle curve degli MLV e dei LUV di DMPC. Ciò indica che le micelle non influenzano la transizione di fase gel-cristallo liquido del fosfolipide, quindi le variazioni dei parametri termotropici di MLV e LUV osservate negli esperimenti effettuati con le micelle cariche con il farmaco sono da attribuire esclusivamente all'interazione tra il farmaco stesso ed i modelli di biomembrana.

La Figura 1.24 mostra le curve calorimetriche dell'esperimento in cui il farmaco libero (frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide) è stato lasciato in contatto con gli

MLV o i LUV di DMPC. In entrambi i casi, già alla prima scansione, il picco di pretransizione scompare ed il picco principale si sposta a temperature più basse diventando più slargato, all'aumentare del tempo d'incubazione la curva diventa sovrapponibile a quella delle vescicole preparate in fase organica contenenti la frazione molare di R-Flu 0,09 (curva r).

La Figura 1.25 mostra le curve calorimetriche delle micelle caricate con R-Flu (la quantità necessaria per avere la frazione molare 0,09 di farmaco rispetto al fosfolipide) lasciate in contatto con MLV e LUV di DMPC pura. Dalle curve calorimetriche riportate nelle figure si nota che dalla prima scansione il picco di pretransizione scompare ed, all'aumentare del tempo d'incubazione, il picco di transizione si allarga e si sposta a temperature inferiori pressoché raggiungendo la temperatura di riferimento (costituita dalla T_m dei liposomi di DMPC, preparati in fase organica e contenenti la frazione molare 0,09 di R-Flu, che rappresenta la massima interazione).

La Figura 1.26 mostra la temperatura di transizione, $\Delta T/T_m^0$ degli MLV/LUV di DMPC lasciati in contatto con le micelle vuote, con R-FLu e con le micelle caricate con il farmaco, in funzione delle scansioni successive ottenute all'aumentare del tempo d'incubazione. In tutti gli esperimenti è stata tenuta costante la quantità di farmaco (frazione molare 0,09). Nella figura i valori r si riferiscono alla temperatura di transizione delle vescicole di DMPC preparate in presenza di R-Flu alla frazione molare 0,09. Le micelle vuote non causano alcuna variazione della temperatura di transizione delle vescicole di DMPC, neanche dopo nove scansioni successive. Il farmaco libero si solubilizza rapidamente nel mezzo acquoso ed è assorbito dalle vescicole lipidiche, raggiungendo il valore di riferimento già alla terza scansione. Quando il farmaco è incorporato all'interno delle micelle polimeriche viene gradualmente rilasciato dal sistema e, quindi, assorbito dai modelli di biomembrana; se questi sono costituiti da LUV la cinetica di rilascio ha un andamento più veloce.

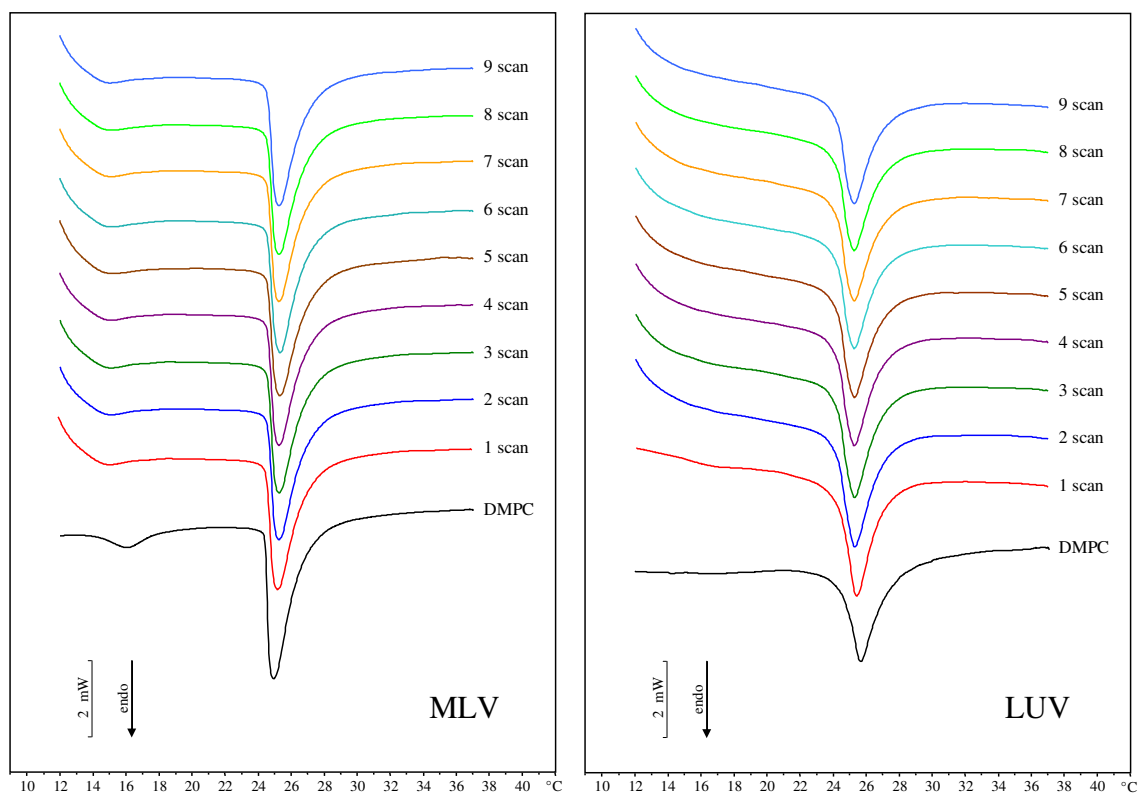


Figura 1.23. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV e LUV di DMPC lasciati in contatto con le micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA a tempi d'incubazione crescenti.

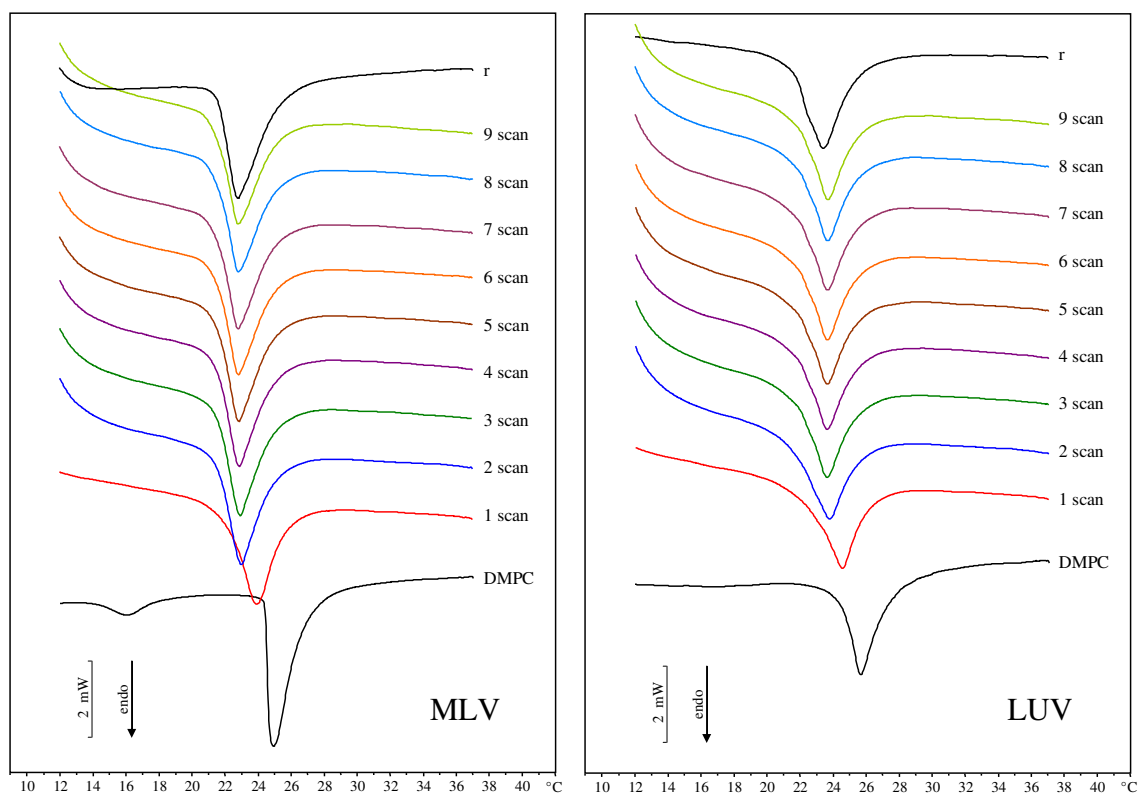


Figura 1.24. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV e LUV di DMPC lasciati in contatto con R-Flu ($X = 0,09$) a tempi d'incubazione crescenti.

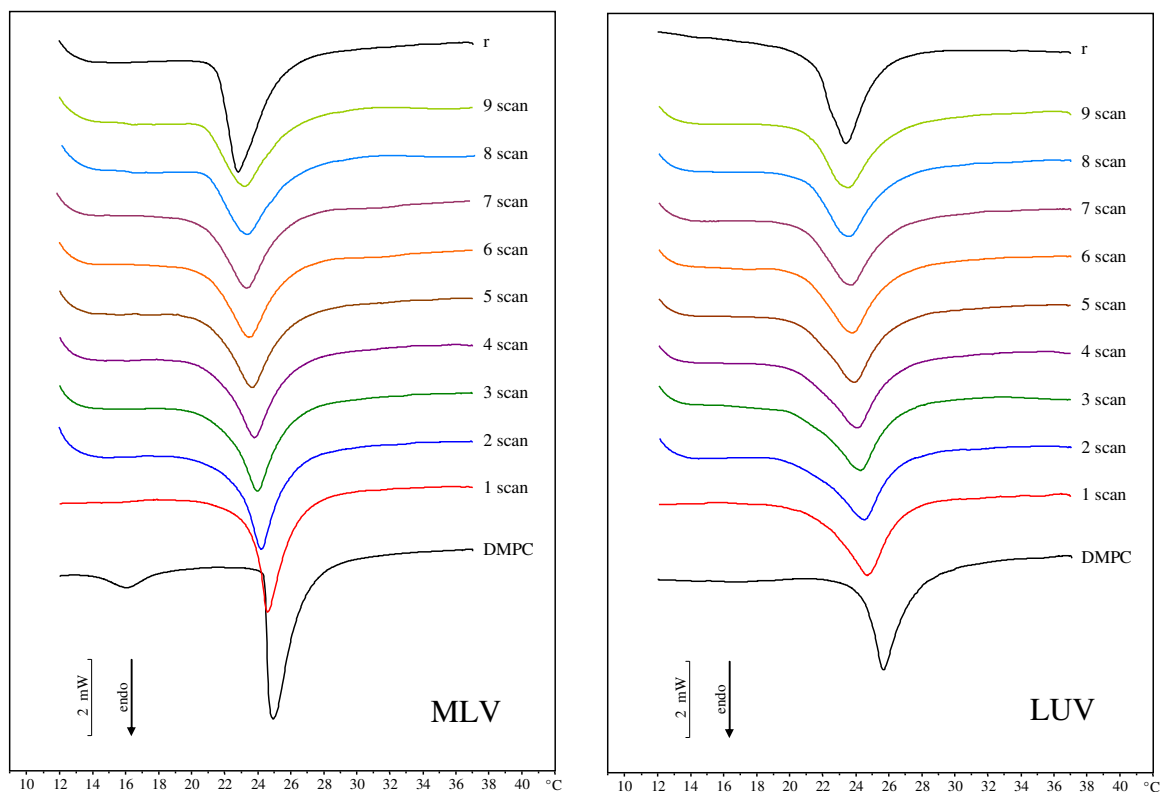


Figura 1.25. Curve calorimetriche, in riscaldamento, di MLV e LUV di DMPC lasciati in contatto con le micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA caricate con R-Flu (X = 0,09) a tempi di incubazione crescenti.

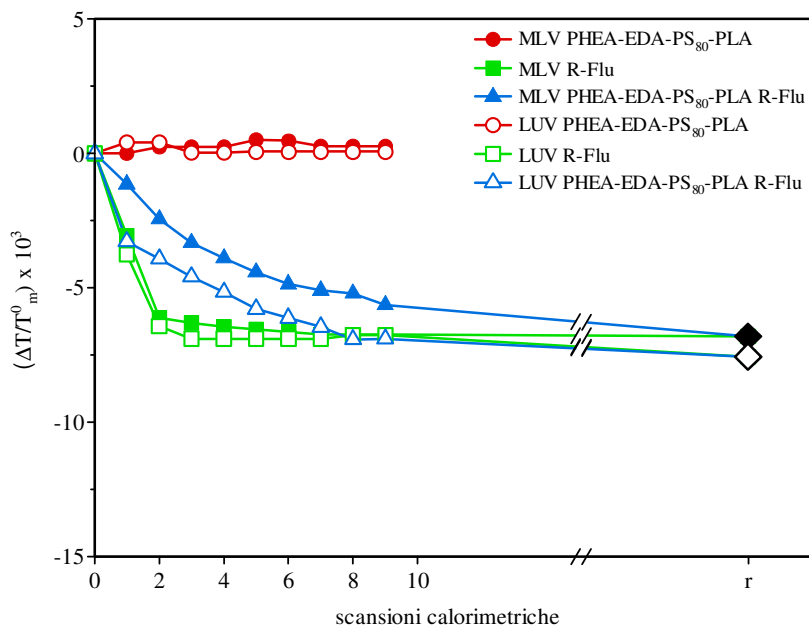


Figura 1.26. Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV e LUV di DMPC lasciati in contatto con PHEA-EDA-PS₈₀-PLA, R-Flu, PHEA-EDA-PS₈₀-PLA R-Flu, alla frazione molare 0,09 in funzione delle scansioni calorimetriche. La variazione della temperatura di transizione è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza di R-Flu e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura).

1.20. CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati presi in esame due diversi sistemi utili per il drug delivery ad uno specifico target terapeutico: un idrogel polisaccaridico, adatto per il rilascio di farmaci al colon, e micelle polimeriche funzionalizzate con residui di polisorbato 80, in grado di direzionare al sistema nervoso centrale il farmaco in esse contenuto. In particolare nel primo caso, utilizzando il polisaccaride naturale inulina derivatizzato con anidride metacrilica e succinica (INU-MA-SA) e, in seguito, sottoposto a reticolazione per mezzo di irradiazione UV è stato ottenuto un idrogel, insolubile in acqua, adatto al rilascio di farmaci al colon. L'idrogel è stato caratterizzato mediante studi FT-IR e $^1\text{H-NMR}$, studi di swelling a differenti pH, per simulare l'ambiente gastrico e quello intestinale, a studi di degradazione chimica ed enzimatica mediante inulinasi. I risultati ottenuti mostrano un maggiore swelling al pH simulante l'ambiente intestinale dovuto alla maggiore quantità di acqua assorbita come conseguenza della repulsione elettrostatica fra le catene polimeriche per l'incremento dei gruppi acidi dissociati. Gli studi di degradazione chimica mostrano che l'idrogel non è degradato a tutti i pH utilizzati. Invece gli studi di degradazione enzimatica dimostrano che sia il derivato dell'inulina che l'idrogel sono degradati dall'inulinasi.

La capacità di ramificazione ha permesso di caricare l'idrogel con diflunisal, scelto come farmaco modello. Il rilascio del diflunisal è stato studiato mediante calorimetria a scansione differenziale usando vescicole unilamellari di dimiristoilfosfatidilcolina come modello di membrane biologiche seguendo le modificazioni indotte dal diflunisal rilasciato dall'idrogel sul doppio strato fosfolipidico delle vescicole e confrontando tali modificazioni con quelle indotte dal diflunisal libero. I risultati sperimentali hanno dimostrato che è possibile modulare la cinetica di rilascio, ed il seguente assorbimento da parte delle biomembrane modello, scegliendo un opportuno drug loading, ma anche in base alle proprietà dell'idrogel (ad esempio il grado di swelling) ed in base ai parametri esterni, come il pH del mezzo.

Allo stesso modo, è stato studiato il rilascio di R-Flurbiprofene da micelle di PHEA-EDA-PS₈₀-PLA utilizzando la calorimetria a scansione differenziale e valutando le variazioni delle curve calorimetriche di MLV e LUV, dovute all'assorbimento del farmaco rilasciato dalle micelle. I risultati sperimentali mostrano che le micelle permettono un rilascio graduale che dovrebbe consentire un'azione prolungata del farmaco nelle cellule.

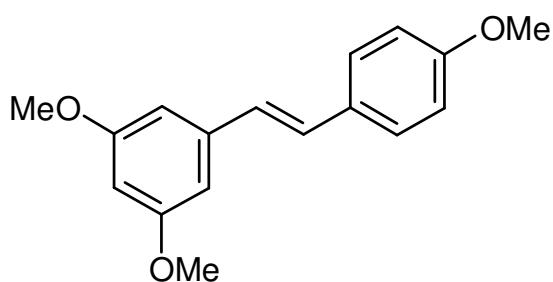
CAPITOLO 2

Interazione ed assorbimento di derivati del resveratrolo con modelli di biomembrana: studio degli effetti di variazioni strutturali.

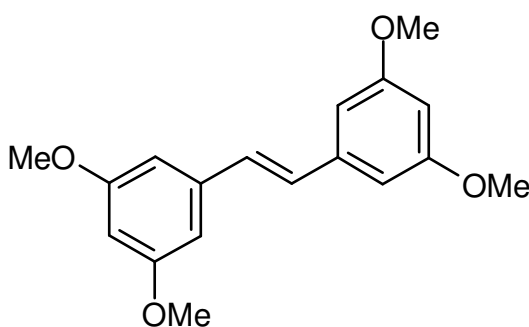
2.1. Il resveratrolo ed i suoi analoghi

Il resveratrolo è una sostanza fitochimica naturale presente nell'uva, negli arachidi ed in numerose altre piante (Turner L., 1999), esso appartiene alla classe degli stilbeni ed alla sottoclasse delle fitoalessine (Sarig P. et al., 1997) prodotte in risposta a condizioni di stress come infezioni fungine e radiazioni ultraviolette (Jeandet P. et al., 1991). Per esposizione alla luce e all'ossigeno il resveratrolo subisce la conversione dalla forma *cis* alla *trans* (Cantos E.C. et al., 2000), quest'ultima è quella maggiormente presente nel vino ed, inoltre, sembra essere la più attiva biologicamente. Il resveratrolo è stato intensamente studiato per le svariate proprietà biologiche (Fremont L., 2000; Gusman J. et al., 2001) ad esso attribuite tra cui: attività antiossidante (Belguendouz L. et al., 1997), inibizione della cicloossigenasi (Maccarrone M. et al., 1999), inibizione dell'aggregazione piastrinica (Pace-Asciak C.R. et al., 1995), attività antiestrogenica (Gehm B.D. et al., 1997). Il resveratrolo ed altri stilbenoidi ad esso correlati sono stati, inoltre, valutati per la loro abilità di agire come radical scavenger, di prevenire la perossidazione lipidica, di avere attività chemio-protettive nelle malattie degenerative umane come l'aterosclerosi (Pace-Asciak C.R. et al., 1996) ed il cancro (Jang M. et al., 1997). L'attività di anti-iniziazione tumorale è stata documentata dal suo effetto antimutageno, dall'inibizione della funzione iperperossidasi nell'attività della cicloossigenasi (COX), e nell'induzione degli enzimi "phase II" (Jang M. et al., 1997). L'attività anti-promozione della carcinogenesi è stata evidenziata dagli effetti antiinfiammatori, dall'inibizione della produzione di metaboliti dell'acido arachidonico catalizzata dagli enzimi COX-1 e COX-2, e dal blocco di trasformazioni neoplastiche di fibroblasti di topo indotte chimicamente (Jang M. and Pezzuto J.M., 1999). L'azione anti-progressione è stata dimostrata dalla capacità di indurre la differenziazione di cellule leucemiche promielocitiche. Per tali motivi il resveratrolo rappresenta la molecola di riferimento per la sintesi di derivati con maggiore attività e stabilità (Basini G. et al., 2010). I derivati, analoghi del resveratrolo, che prenderemo in esame sono: 3,5,4'-trimetossistilbene (TMS), o trimetilresveratrolo, ottenuto mediante una reazione di metilazione standard (Cardile V. et al., 2005) dei gruppi ossidrilici, inoltre la struttura di tale composto è stata ulteriormente modificata aggiungendo un ulteriore gruppo

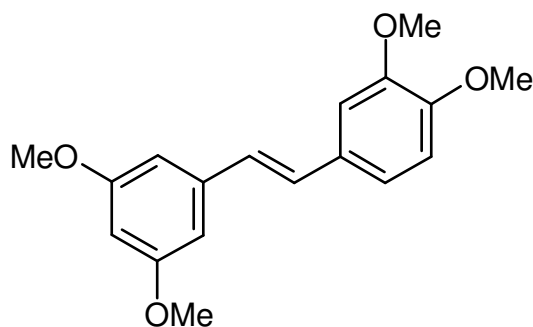
metossilico in posizioni diverse ottenendo il 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1) ed il 3,5,3',4'-tetrametossistilbene (Figura 2.1). L'obiettivo della ricerca è stato studiare l'effetto causato da queste variazioni strutturali sull'interazione dei composti con i modelli di biomembrana, costituiti sia da liposomi multilamellari di DMPC, che da monolayer di DMPC. Nel primo caso l'analisi è stata eseguita con la tecnica della calorimetria a scansione differenziale, mentre nel secondo caso sono state effettuate misure di tensione superficiale del monolayer, in assenza ed in presenza dei composti studiati, con la tecnica di Langmuir-Blodgett.



3,5,4'-Trimetilresveratrolo



3,5,3',5'-Trimetilresveratrolo



3,5,3',4'-Trimetilresveratrolo

Figura 2.1. Formule di struttura.

I derivati sintetizzati, se confrontati con il resveratrolo, hanno diversi vantaggi infatti la metilazione dei gruppi ossidrilici protegge la molecola dall'esteso metabolismo a cui è soggetta. Questo permette di avere a disposizione una molecola che abbia:

- Aumentata lipofilia; che si traduce in aumento della permeabilità attraverso le membrane cellulari;
- Lunga emivita di eliminazione.

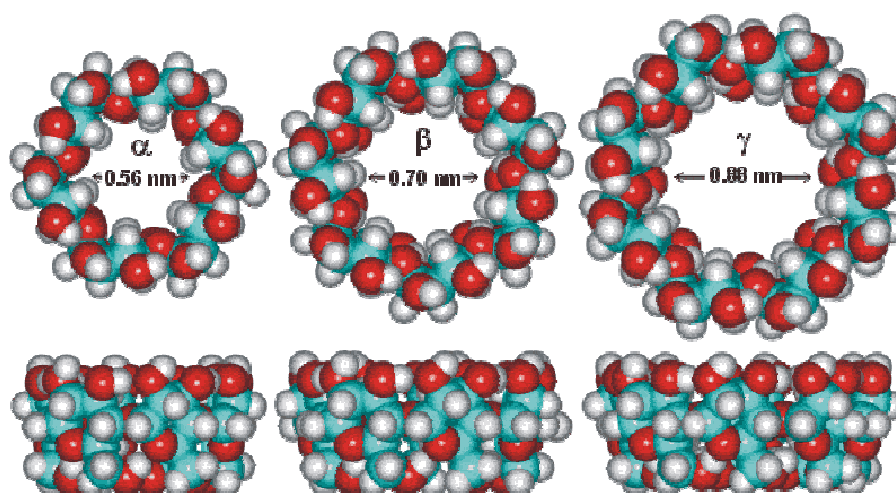
Lipoficità e solubilità sono fattori fisico-chimici importanti ed ambedue hanno effetti sulla quota di farmaco assorbita (*Lin J.H. and Lu A.Y., 1997*).

Le membrane delle cellule epiteliali gastrointestinali sono costituite da pacchetti di fosfolipidi in cui sono disperse proteine, il passaggio transcellulare del farmaco dipende sia dalla capacità propria di penetrare il bilayer lipidico delle membrane delle cellule epiteliali sia dalla lipofilia del farmaco (*Lin J.H. and Lu A.Y., 1997*). La lipofilia di questi composti è tale da poter avere un buon assorbimento intestinale, ma se somministrati in sospensione, per la bassa solubilità in acqua, non si dissolvono e quindi non possono essere assorbiti (*Lin J.H. and Lu A.Y., 1997*).

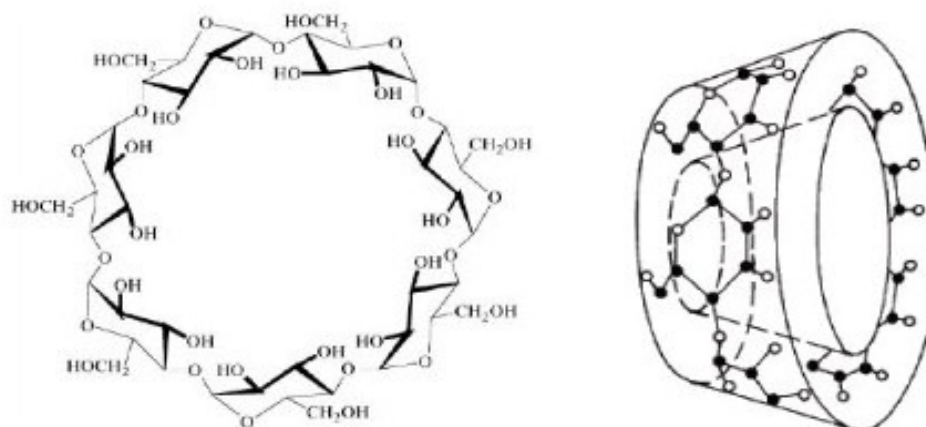
Il mancato assorbimento osservato sembra essere dovuto ad una lenta dissoluzione nell'intestino. Per tali motivi nel secondo stadio di questo lavoro di ricerca abbiamo selezionato il composto con il migliore profilo d'interazione con le biomembrane modello, ovvero il trimetilresveratrolo, con lo scopo di migliorarne la solubilità, e quindi la cinetica di assorbimento da parte delle biomembrane modello, per mezzo della complessazione con β -ciclodestrine. Le β -ciclodestrine sono state già ampiamente utilizzate per favorire la solubilità di svariati farmaci (*Ansari M.T. et al., 2009; Tokumura T. et al., 2009; Wang S. et al., 2009*) e saranno utilizzate in questo lavoro.

2.2. Le ciclodestrine

Le ciclodestrine (CD) sono oligosaccaridi ciclici costituiti da unità di D(+) glucosio legate da legami glucosidici $\alpha(1\rightarrow4)$. I termini più comuni sono costituiti da anelli a 6, 7 e 8 unità di glucosio, denominati rispettivamente α -, β - e γ -ciclodestrine.



Per molti anni la maggior parte dei lavori condotti sulle ciclodestrine hanno riguardato la β -ciclodestrina, poiché questa, rispetto alla α -ciclodestrina che è troppo piccola e la γ -ciclodestrina che ha invece dimensioni buone ma processi di sintesi e purificazione molto costosi, possiede le caratteristiche più idonee all'interazione con la maggior parte delle molecole di interesse farmaceutico.



Le ciclodestrine naturali sono ottenute per degradazione enzimatica dell'amido ad opera di un enzima ciclizzante, la cicloglicosiltransferasi (CGTase).

La CGTase è prodotta da circa 15 specie batteriche, principalmente da:

- Bacilli: *B. Macerans*; *B. Circulans*; *B. Megaterium*; *B. Sterotermophilus*; *B. Alkalophylic*.
- Micrococchi: *M. Varians*; *M. Luteus*.
- Klebsielle: *K. pneumoniae*.

I microorganismi principalmente utilizzati per la produzione delle β -ciclodestrine sono il *B. Macerans* e il *B. Circulans*.

La CGTase stacca dall'elica glucosidica dell'amido frammenti contenenti da 6 a 12 unità di glucosio, ne collega gli estremi e dà origine ad una miscela di molecole cicliche, la cui frazione principale è costituita dalla α -, β - e γ -ciclodestrina.

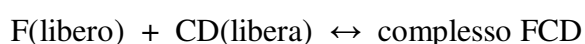
Le ciclodestrine sono state utilizzate come solubilizzanti, stabilizzanti per le sostanze biologicamente attive, modelli di enzimi, come agenti di separazione in cromatografia o in altri vari processi, catalizzatori e additivi (come detergenti, modificatori di viscosità, etc.) (Szejtli J., 1998).

Le ciclodestrine possono essere utilizzate per ridurre o prevenire irritazioni gastro-intestinali (GI) o oculari, ridurre o eliminare sapori o odori sgradevoli, evitare interazioni farmaco-farmaco o farmaco-additivo o addirittura per convertire oli e farmaci liquidi in microcristalli o polveri amorfe. Possono anche essere usate come

aiuto nei processi per isolare uno specifico composto da fonti naturali e per rimuovere composti indesiderati, come il colesterolo, da prodotti alimentari. Per la loro bassa tossicità, sia per via orale che locale, e per la buona biodisponibilità sono ampiamente commercializzate.

La complessazione di un farmaco (F) con le ciclodestrine (CD) si verifica attraverso un'interazione non covalente tra F e la cavità della CD.

Questo è un processo dinamico in cui la molecola di farmaco si associa e si dissocia continuamente dalla CD ospitante. Supponendo una complessazione 1:1, il processo sarà il seguente:



Due parametri sono molto importanti per il meccanismo di rilascio del farmaco:

- La costante di formazione K;
- La stabilità del complesso.

Quando la ciclodestrina si trova in soluzione acquosa, le molecole di acqua ne occupano la cavità dando luogo ad una interazione polare-apolare termodinamicamente sfavorita.

Se in soluzione è presente un farmaco lipofilo, sposterà le molecole di acqua e ne prenderà il posto, creando una situazione energeticamente più stabile (interazione apolare-apolare). Nel contempo le molecole di acqua estruse dalla cavità andranno a riorganizzarsi nel mezzo acquoso, guadagneranno in gradi di libertà e contribuiranno alla stabilizzazione del sistema.

2.3. Materiali

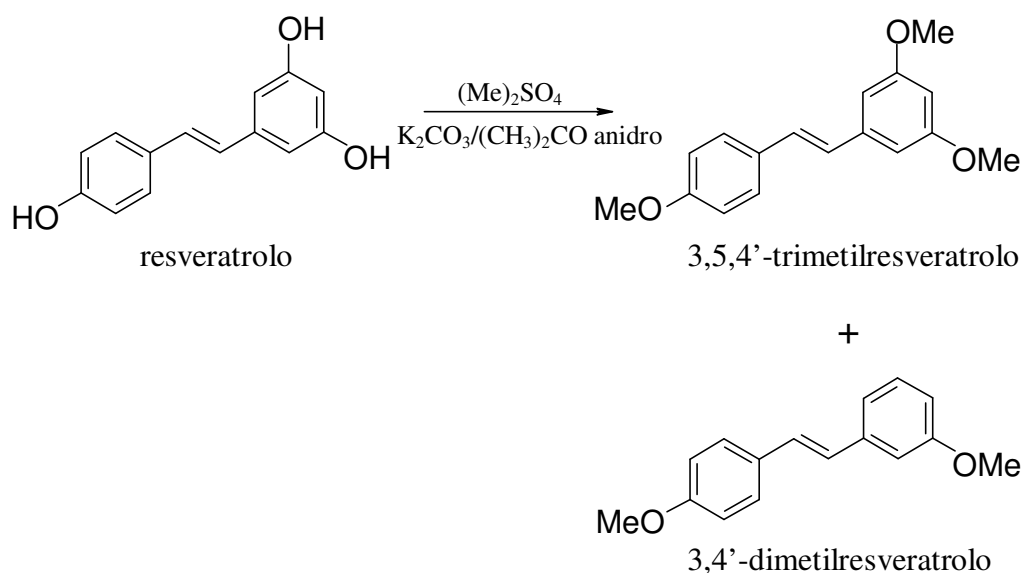
La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) (purezza: > 99 %) è stata ottenuta dalla Fluka (Germany). La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo (*Rouser G. et al., 1970*). La soluzione tampone consiste di Tris(idrossimetil)-amminometano (TRIS) 50 mM, aggiustata a pH = 7,4 con acido cloridrico. Tutti e tre i composti analizzati sono stati sintetizzati dal gruppo di ricerca del Prof. Corrado Tringali (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Catania). Il resveratrolo, da cui è stato sintetizzato il trimetilresveratrolo mediante

opportuni metodi di sintesi (Nicolosi G. et al., 2002; Cardile V. et al., 2005), è stato ottenuto dalla Sigma Aldrich (Svizzera).

L'acqua utilizzata per le misure di tensione superficiale è acqua ultra pura con resistività di 18,2 MΩ cm ottenuta mediante un sistema Simplicity 185 Millipore.

2.4. Sintesi del 3,5,4'-trimetilresveratrolo

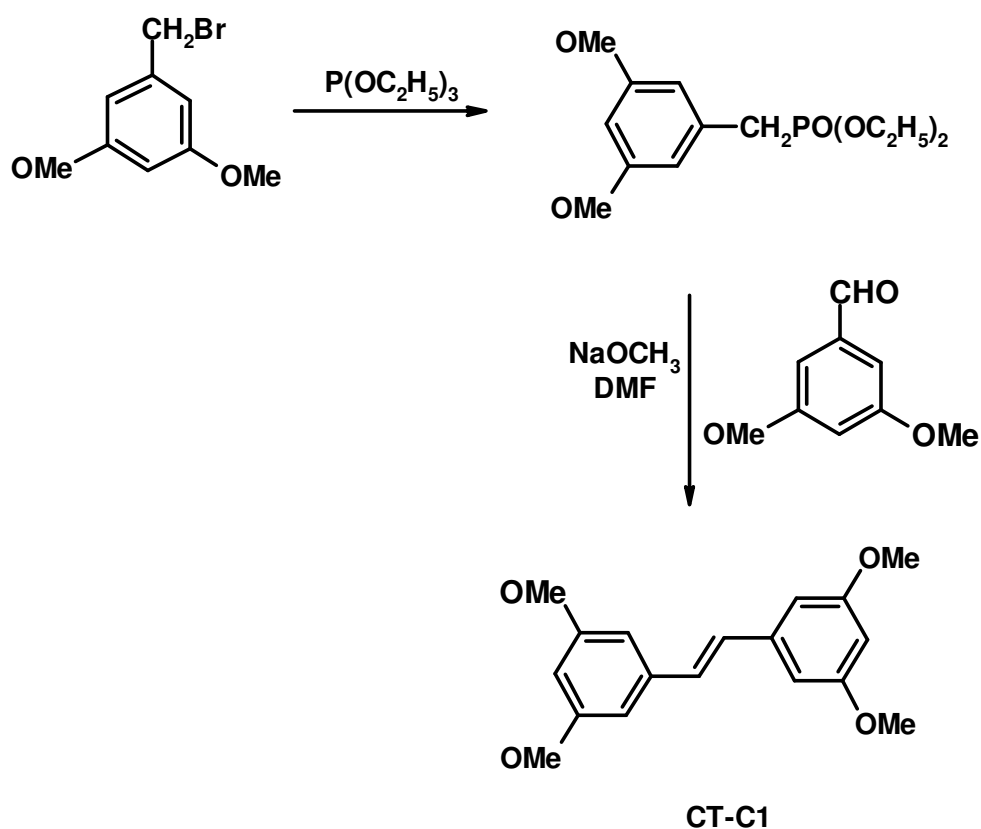
90 mg di resveratrolo (Schema 2.1) sono stati sottoposti a metilazione utilizzando come agente metilante dimetilsolfato ((Me)₂SO₄) (60 μl), carbonato di potassio (K₂CO₃) (60 mg), e come solvente acetone ((CH₃)₂CO) anidro (40 ml). La miscela di reazione è stata mantenuta a riflusso sotto costante agitazione per circa 10 ore. L'andamento della reazione è stato seguito mediante TLC, utilizzando come miscela eluente CH₃OH:CH₂Cl₂ (1:9 v:v). Si è notata la formazione di due prodotti principali: il 3,5,4'-trimetilresveratrolo e il 3,4'-dimetilresveratrolo. La miscela dei due composti è stata sottoposta a purificazione mediante un sistema LC Buchi-Biotage Flash 12 o Flash 40, su cartucce preimpaccate, l'eluizione è stata condotta con un gradiente CH₂Cl₂ in n-esano (dal 20 % al 100 %). I dati MS-FAB e ¹H NMR sono in accordo con quelli riportati in letteratura (Mannila E. et al., 1993).



Schema 2.1. Sintesi del 3,5,4'-trimetilresveratrolo.

2.5. Sintesi del 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1)

Il 3,5-dimetossibenzilbromuro (2,5 g; 10,8 mmol) è stato riscaldato con un eccesso di trietilfosfito (2,5 mL; 14,5 mmol) a 130 °C per dare il corrispondente dietilfosfonato. A quest'ultimo, raffreddato a 0 °C, sono stati aggiunti 20 mL di DMF e 1,06 g (19,7 mmol) di metossido di sodio. Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 1,92 g (11,5 mmol) di 3,5-dimetossibenzaldeide e la miscela è stata mantenuta a 0 °C sotto costante agitazione; la miscela di reazione quindi è stata riscaldata a 100 °C e lasciata per 1 ora a tale temperatura e successivamente per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione, quindi, è stata addizionata con H₂O e metanolo in rapporto 2:1 v/v. Si è ottenuto un precipitato bianco che stato filtrato e asciugato: sono stati ottenuti così 2,93 g del composto CT-C1 con una resa del 88,8 % in peso (Schema 2.2). Il CT-C1 è stato ricristallizzato da MeOH e ne è stato determinato il punto di fusione. Sul composto sono stati eseguiti: una TLC fluita con EtOAc/Etere di petrolio (30:70, v/v); uno spettro di massa ESI registrato in modo positivo; spettro ¹H NMR registrato in CDCl₃ a 500 MHz; lo spettro ¹³C NMR registrato in CDCl₃ a 125 MHz; lo spettro IR, registrato in CCl₄ e lo spettro UV registrato in acetonitrile.

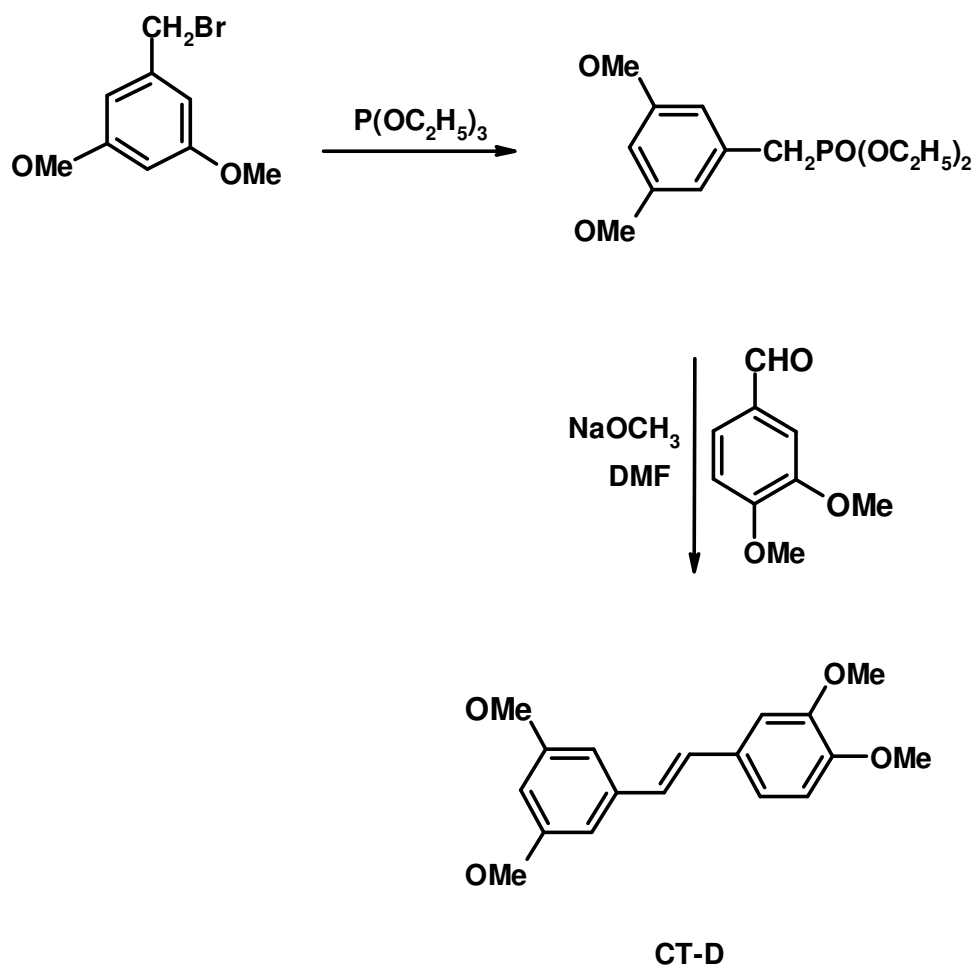


Schema 2.2. Sintesi del 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1).

2.6. Sintesi del 3,5,3',4'-tetrametossistilbene (CT-D)

In un pallone da 50 ml, vengono posti 5 gr. di 3,5-dimetossibenzilbromuro (22 mmol) e 8 ml di trietilfosfito (44 mmol). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso, sotto costante agitazione, per 5 h, alla temperatura di 130 °C.

La miscela contenente il dietilfosfonato, è stata raffreddata e divisa in due aliquote; la prima (3 g, 11 mmol) è stata raffreddata a 0 °C e sono stati aggiunti 20 ml di DMF, 1,09 g di NaOCH₃ e 2,04 g. di 3,4-dimetossibenzaldeide. La miscela di reazione inizialmente è stata lasciata sotto agitazione per 1 h, poi è stata riscaldata a 100 °C e lasciata a tale temperatura per 1 h; infine è stata mantenuta a temperatura ambiente per 28 h. Dopo aver avuto conferma dell'avvenuta reazione mediante TLC (10 % EtOAc-EP), la miscela di reazione è stata sottoposta ad un trattamento con H₂O/H₂SO₄ e poi ripartita con acetato di etile. La fase organica è stata trattata con NaHCO₃, quindi lavata con acqua fino a neutralità, anidrificata e portata a secco mediante evaporatore rotante. La miscela di reazione è stata purificata mediante cromatografia su colonna *flash* ($\phi = 3$ cm; h = 30 cm), utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente acetato di etile (da 5 % a 15 %) in etere di petrolio. Dall'analisi TLC e ¹H-NMR, viene individuata la frazione di interesse, la quale raccolta e portata a secco sotto pressione ridotta, fornisce il prodotto desiderato come solido bianco (2,16 gr., resa 65,49 %) (Schema 2.3). Il composto è stato successivamente cristallizzato da metanolo e ne è stato determinato il punto di fusione. Sul composto sono stati eseguiti: TLC eluita con etile/*n*-esano (30:70); lo spettro ¹H NMR registrato in CDCl₃ a 500 MHz e lo spettro ¹³C NMR registrato in CDCl₃ a 125 MHz.



Schema 2.3. Sintesi del 3,5,3',4'-tetrametossistilbene (CT-D).

2.7. Interazione MLV DMPC/composti

Per ottenere liposomi multilamellari di DMPC, contenenti i composti in esame, sono state preparate soluzioni standard di DMPC in cloroformio/metanolo (1:1 v:v) e dei composti in cloroformio. Aliquote delle soluzioni sono state trasferite in tubi da saggio in modo da avere la stessa quantità (7 mg; 0,010325 mmoli) di lipide e frazioni molari crescenti (0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12) dei composti. In seguito, i solventi sono stati allontanati sotto flusso di azoto, a 37° C (temperatura superiore alla temperatura di transizione del lipide), per ottenere un film lipidico contenente i derivati del resveratrolo. Successivamente, i campioni sono stati liofilizzati per 60 minuti per eliminare eventuali tracce di solvente. I campioni sono stati idratati aggiungendo 168 µl di TRIS, quindi, posti in un bagno termostato a 37° C per un minuto e poi vorticizzati per un minuto, la procedura è stata ripetuta per tre volte e quindi lasciati per un'ora a 37° C in modo da ottenere una dispersione liposomiale omogenea. Mediante questa

tecnica si ottengono liposomi multilamellari di DMPC in cui i composti sono omogeneamente dispersi nei bilayers (come nello Schema 1.1).

120 μ l della sospensione liposomiale sia in presenza che in assenza dei composti sono stati posti in un crogiolo di alluminio da 160 μ l e sottoposti al seguente ciclo di scansioni calorimetriche:

- 1) Riscaldamento da 5 °C fino a 37 °C (a 2 °C/min);
- 2) Raffreddamento da 37 °C a 5 °C (a 4 °C/min).

La procedura è stata fatta in triplicato per verificare la riproducibilità dei parametri termodinamici. Lo spostamento della T_m e la variazione di ΔH rispetto ai liposomi di solo fosfolipide sono parametri che indicano l'entità d'interazione che una determinata frazione molare causa sui liposomi di DMPC.

2.8. Cinetiche di permeazione

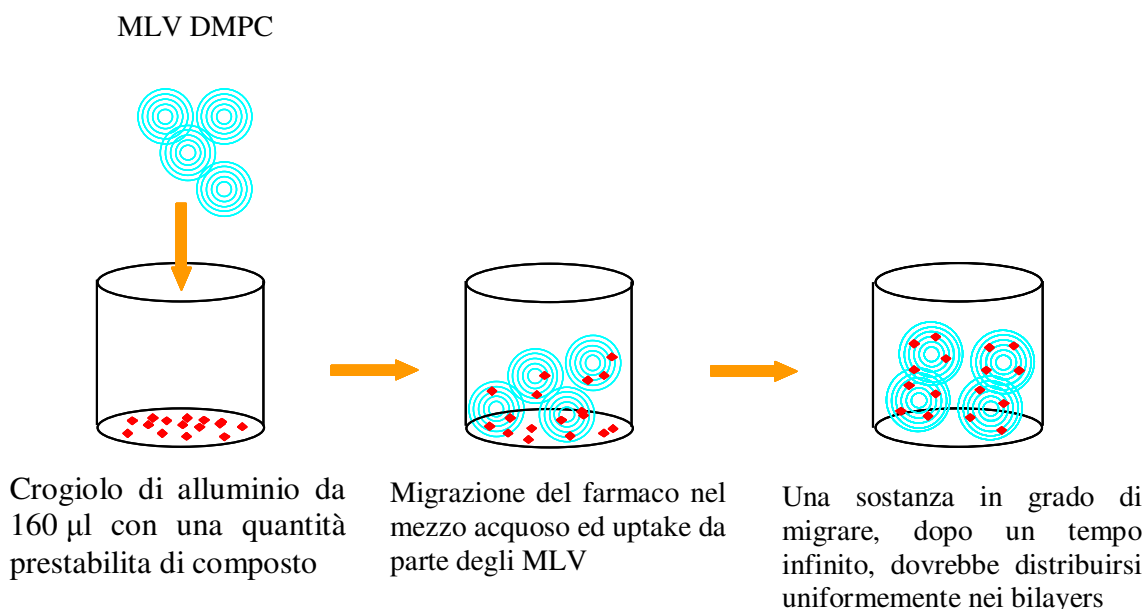
Queste misure sono state effettuate per verificare la capacità dei composti di attraversare il mezzo acquoso, interagire con le membrane modello ed eventualmente penetrare nelle stesse. Tali esperienze sono state eseguite ponendo aliquote di 120 μ l di sospensione acquosa di MLV di DMPC in crogioli di alluminio da 160 μ l, sul cui fondo era presente una quantità pesata dei composti tali da avere una frazione molare 0,12 rispetto al fosfolipide. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a leggera agitazione per 10 secondi, e quindi a cicli calorimetrici consistenti di tre step:

- 1) una scansione calorimetrica in riscaldamento da 5 a 37 °C (2 °C/min.);
- 2) un periodo di incubazione isoterma per 60 minuti a 37 °C;
- 3) una fase di raffreddamento da 37 °C a 5 °C (4 °C/min) per poi poter ripetere il ciclo dal primo step per almeno otto volte (Schema 2.4).

Nella seconda fase del lavoro, per quanto riguarda il TMS, al fine di valutare la possibilità di aumentare la velocità e il grado del processo di permeazione, le stesse misure appena descritte sono state eseguite in presenza di β -CD, mantenendo invariata la frazione molare del trimetilresveratrolo (0,12), e variando la quantità di β -CD al fine di ottenere i seguenti rapporti stechiometrici 1:0,5 - 1:1 - 1:2 mol:mol trimetilresveratrolo/ β -CD.

Inoltre, per monitorare eventuali interazioni tra MLV e β -CD, una determinata quantità di β -CD (le stesse utilizzate per il suddetto esperimento) è stata depositata sul fondo del crogiolo e sono stati aggiunti 120 μ l della sospensione acquosa di MLV di

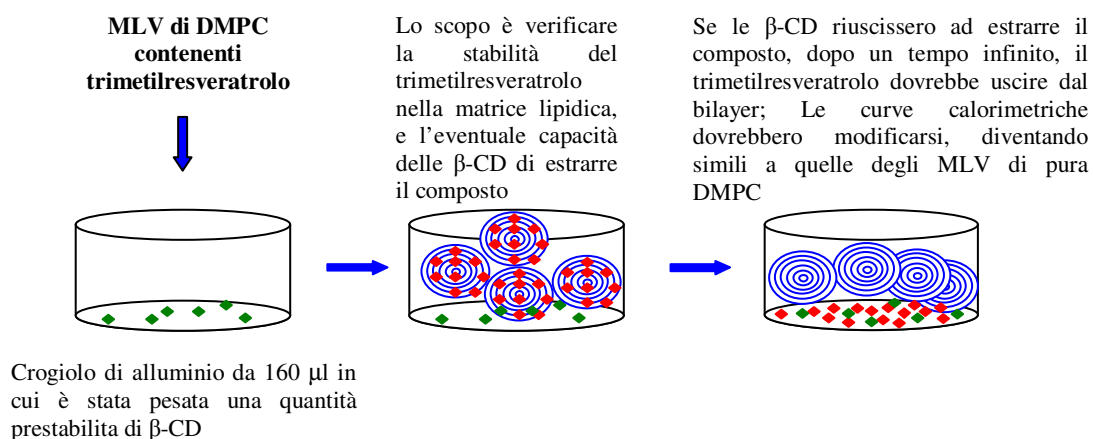
DMPC (0,007375 mmol di lipide). I crogioli sono stati chiusi ermeticamente, agitati per pochi secondi e l'interazione fra la DMPC e le β -CD è stata seguita sottoponendo i campioni allo stesso ciclo di analisi calorimetrica descritto in precedenza.



Schema 2.4. Steps delle cinetiche di permeazione.

2.9. Esperimenti di stabilità MLV DMPC/3,5,4'-trimetilresveratrolo

Per valutare la stabilità del trimetilresveratrolo nella matrice lipidica e l'eventuale capacità delle β -CD di estrarlo dagli MLV di DMPC, è stato fatto il seguente esperimento: gli MLV di DMPC preparati in presenza di trimetilresveratrolo (frazione molare 0,12) sono stati lasciati a contatto con β -CD per avere i rapporti molarli 1:0,5 - 1:1 - 1:2 trimetilresveratrolo/ β -CD in crogioli che sono stati chiusi ermeticamente, agitati gentilmente per pochi secondi e sottoposti all'analisi calorimetrica descritta sopra.



2.10. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)

Le misure di tensione superficiale sono state eseguite con un sistema KSV Minitrough fornito dalla KSV Instruments LTd (Finlandia), già descritto nel capitolo “Introduzione”. Prima di ogni misura la vaschetta di Teflon è stata accuratamente pulita con miscela cromica, lavata con etanolo e successivamente con acqua ultrapura e riempita con tampone (Tris 5 mM, pH 7,4), preparato in acqua ultrapura con resistività di 18.2 M Ω cm ottenuta mediante un sistema Simplicity 185 Millipore. Il menisco che l’acqua forma sopra la vaschetta deve essere convesso in modo che le barriere, scivolandovi sopra, riescano a comprimere la superficie.

Per formare il monolayer sono state preparate soluzioni di DMPC, 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1), 3,5,4',5'-tetrametossistilbene (CT-D) e di 3,5,4'-tetrametossistilbene (TMS) in cloroformio in modo da avere soluzioni equimolari. Le miscele di DMPC con i composti sono state preparate a partire dalle distinte soluzioni in modo da ottenere le seguenti frazioni molari: 0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0. Prima di ogni misura è stato controllato che il valore di tensione superficiale della sola subfase non superi $\pm 0,1$ mN/m. Le miscele di DMPC/CT-C1, DMPC/CT-D e DMPC/TMS sono state depositate sulla superficie della subfase mediante una microsiringa Hamilton previamente pulita per tre volte con cloroformio, avvinata con la soluzione in esame e riempita fino ad un volume di 30 μ l delle soluzioni dei componenti puri e delle soluzioni miste. Si è lasciato riposare il monolayer per permettere l’evaporazione del solvente. Il volume di soluzione impiegata è tale da compiere tutte le esperienze deponendo lo stesso numero di molecole sulla subfase. Per essere sicuri della riproducibilità del lavoro l’esperienza è stata ripetuta per almeno 3 volte. Le misure sono state eseguite alle temperature di 10 °C e 37 °C, in modo da monitorare il comportamento della DMPC (sia pura sia in presenza dei composti) a temperature inferiori e superiori alla transizione di fase gel-cristallo liquido della DMPC (24,4 °C). La variazione dell’area superficiale a disposizione delle molecole deposte è ottenuta grazie al movimento delle barriere, poste sul frame della vaschetta, che si muovono simmetricamente con una velocità di 10 mm/minuto.

2.11. RISULTATI E DISCUSSIONE

2.11.1. Interazione MLV DMPC/composti

È stato studiato l'effetto dei tre derivati del resveratrolo sul comportamento termotropico degli MLV di DMPC, le curve DSC delle vescicole di DMPC pura sono state confrontate con le curve delle vescicole preparate in presenza di differenti frazioni molari dei composti come mostrato in Figura 2.2.

Tutti e tre i composti interagiscono con le biomembrane modello, infatti all'aumentare della frazione molare di composto presente nei liposomi si osserva la scomparsa del picco di pretransizione ed una diminuzione della T_m del picco calorimetrico principale e il suo allargamento.

2.11.2. Cinetiche di permeazione

La Figura 2.3 riporta le curve calorimetriche relative a queste prove. Per tutti e tre i composti, all'aumentare del tempo d'incubazione, le curve calorimetriche mostrano solo una riduzione ed uno spostamento del picco di pretransizione verso temperature più basse, mentre il picco principale resta pressochè invariato. Ciò è spiegabile con una incapacità dei composti di solubilizzarsi nel mezzo acquoso, migrare attraverso esso, e raggiungere la superficie degli MLV ed essere assorbiti dal bilayer.

Gli stessi dati sono riportati in grafico nella Figura 2.4. Il valore r rappresenta la variazione della T_m dei liposomi di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,12, e corrisponde alla massima interazione possibile fra il composto e i liposomi. Dal grafico si evince che tutti e tre i composti non riescono a raggiungere il valore di riferimento e si osserva un profilo pressoché piatto, solo per il TMS si nota un piccolo decremento della temperatura di transizione.

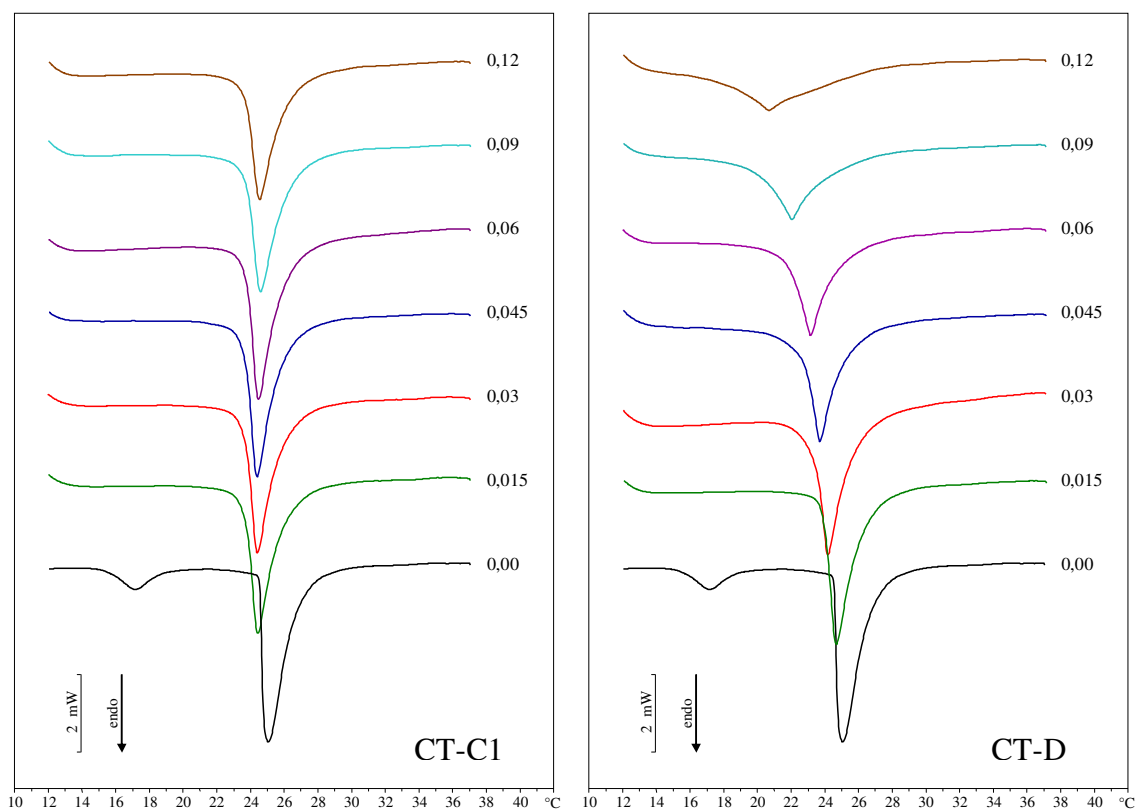
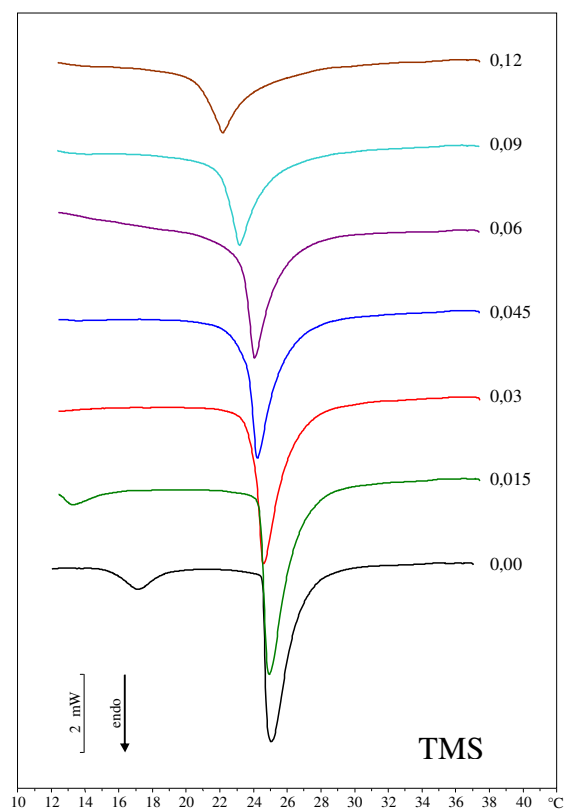


Figura 2.2. Curve calorimetriche, in riscaldamento, di liposomi di DMPC pura ed in presenza di differenti frazioni molari dei composti studiati.

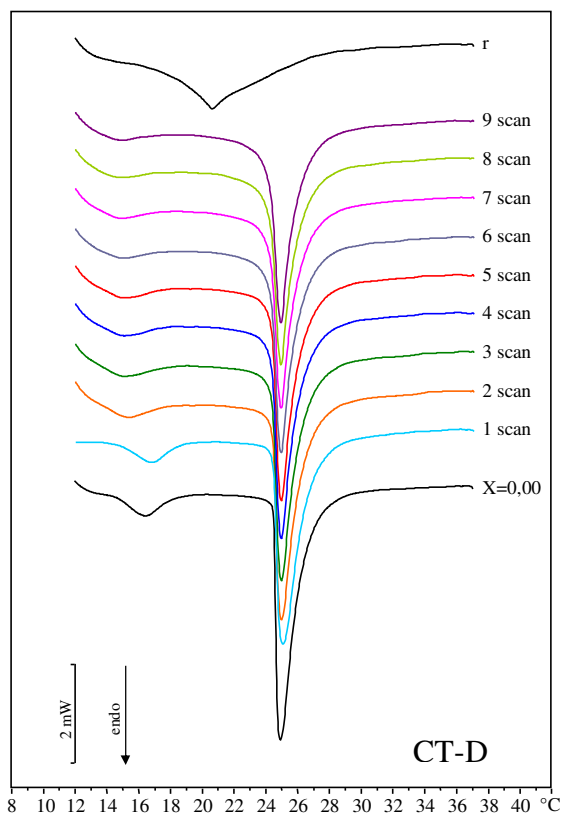
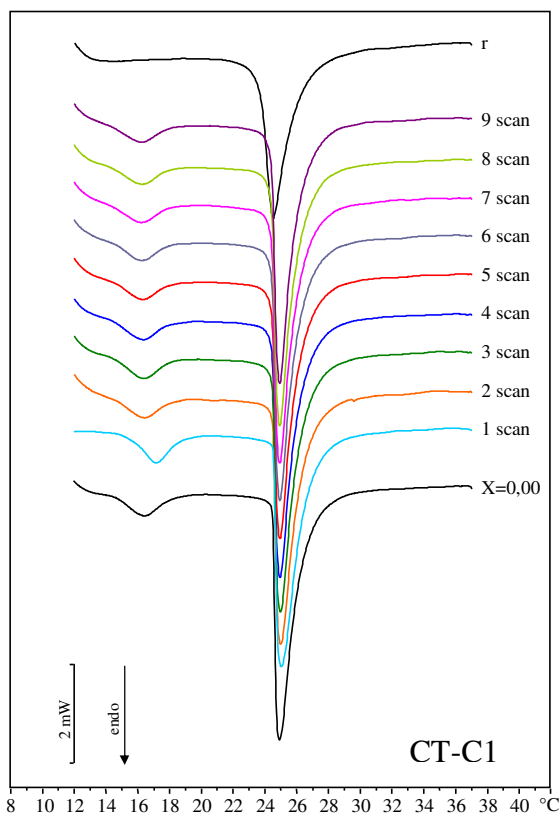
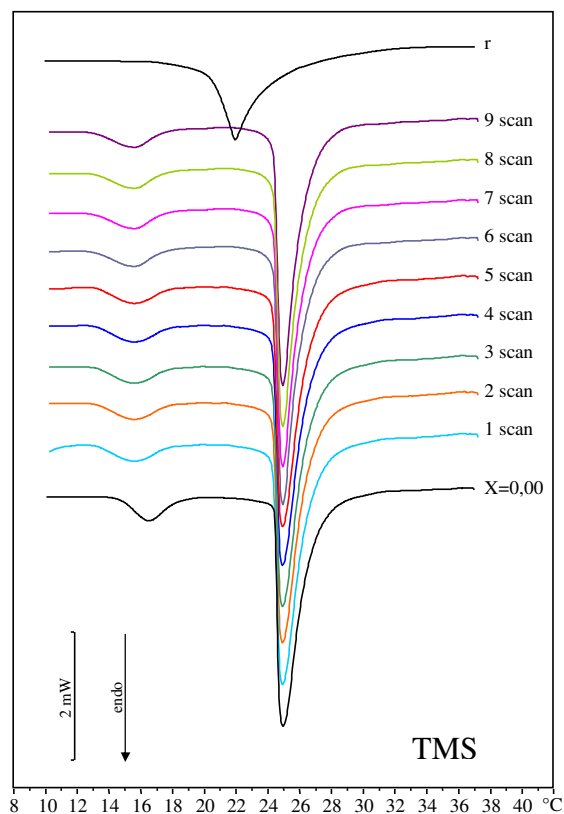


Figura 2.3. Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei liposomi di DMPC pura lasciati in contatto con la frazione molare 0,12 dei composti. La curva r rappresenta gli MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,12.

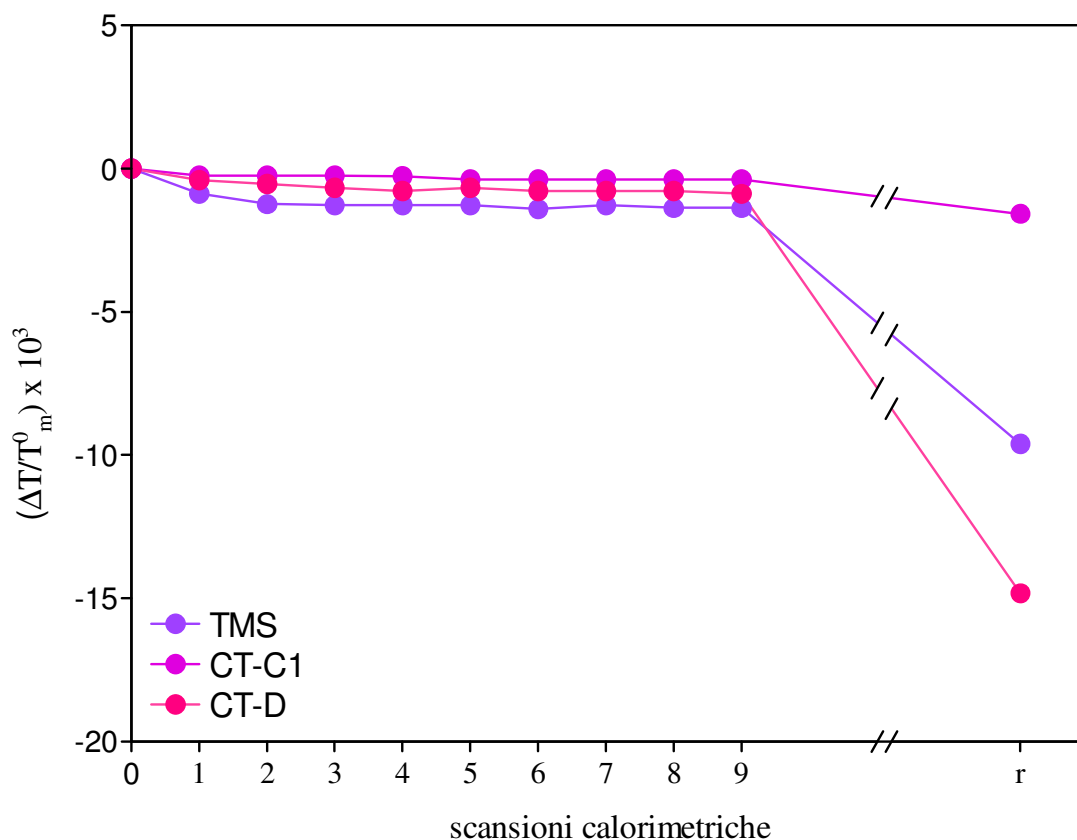


Figura 2.4. Variazione della temperatura di transizione degli MLV di DMPC lasciati in contatto con i composti alla frazione molare 0,12 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m = temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza dei composti esaminati e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura). **r** rappresenta il valore relativo ai liposomi di DMPC preparati in presenza dei composti, alla frazione molare 0,12.

In Figura 2.5 sono mostrate le curve calorimetriche ottenute per scansioni successive dei liposomi di DMPC pura in presenza di trimetilresveratrolo alla frazione molare 0,12, in presenza di diverse quantità di β -CD. La Figura 2.5 A, mostra le curve della cinetica effettuata con rapporto molare 1:0,5 - trimetilresveratrolo/ β -CD. Il picco di pretransizione scompare alla seconda scansione. Il picco principale si sposta leggermente e gradualmente verso temperature più basse senza però raggiungere il picco delle curve di riferimento. La Figura 2.5 B, mostra le curve calorimetriche dell'esperimento in presenza di trimetilresveratrolo e β -CD, rapporto molare 1:1. Il picco di pretransizione scompare alla seconda scansione mentre il picco principale si sposta verso temperature più basse ma, anche in questo caso, senza raggiungere il picco della curva di riferimento. La Figura 2.5 C, mostra le curve calorimetriche della cinetica registrata in presenza di trimetilresveratrolo e β -CD, rapporto molare 1:2. Il picco di

pretransizione non è più presente dopo la prima scansione; il picco principale si sposta verso temperature più basse e si allarga leggermente, senza raggiungere la curva di riferimento.

La Figura 2.6 mostra i valori della temperatura di transizione, espressa come $\Delta T/T_m^0$, dei picchi calorimetrici dei liposomi di DMPC lasciati in presenza di trimetilresveratrolo alla frazione molare 0,12 rispetto al fosfolipide, in assenza e in presenza di β -CD, in funzione delle scansioni calorimetriche effettuate a tempi crescenti di incubazione. Il valore r rappresenta la variazione della T_m dei liposomi di DMPC contenenti trimetilresveratrolo alla frazione molare 0,12; questo corrisponde alla massima interazione possibile fra il composto e i liposomi. Dal grafico si evince che il trimetilresveratrolo provoca un leggerissimo abbassamento della temperatura di transizione; in presenza di trimetilresveratrolo e di β -CD si osserva la graduale diminuzione della temperatura di transizione con il passare del tempo di incubazione. La diminuzione dipende dalla quantità di β -CD essendo più marcata in presenza della maggiore quantità di β -CD.

In Figura 2.7 sono mostrati i valori della variazione di entalpia, espressa come $\Delta\Delta H/\Delta H^0$, in funzione delle scansioni calorimetriche ottenute per tempi crescenti di incubazione. In assenza di β -CD, il trimetilresveratrolo non determina alcuna variazione del ΔH ; mentre in presenza di β -CD si osserva una diminuzione del ΔH che è tanto più evidente quanto maggiore è la quantità di β -CD.

Questi risultati indicano che il trimetilresveratrolo da solo non interagisce con gli MLV perché a causa del suo carattere lipofilo non riesce a dissolversi e ad attraversare il mezzo acquoso e, di conseguenza, non riesce a raggiungere la superficie degli MLV. In presenza di β -CD, il TMS è assorbito dagli MLV ed interagisce con il doppio strato fosfolipidico quindi, le β -CD formano complessi di inclusione con il trimetilresveratrolo agendo da agenti solubilizzanti per il composto. Inoltre, il processo di solubilizzazione dipende dalla quantità di β -CD essendo più pronunciato quando la quantità di β -CD è più elevata.

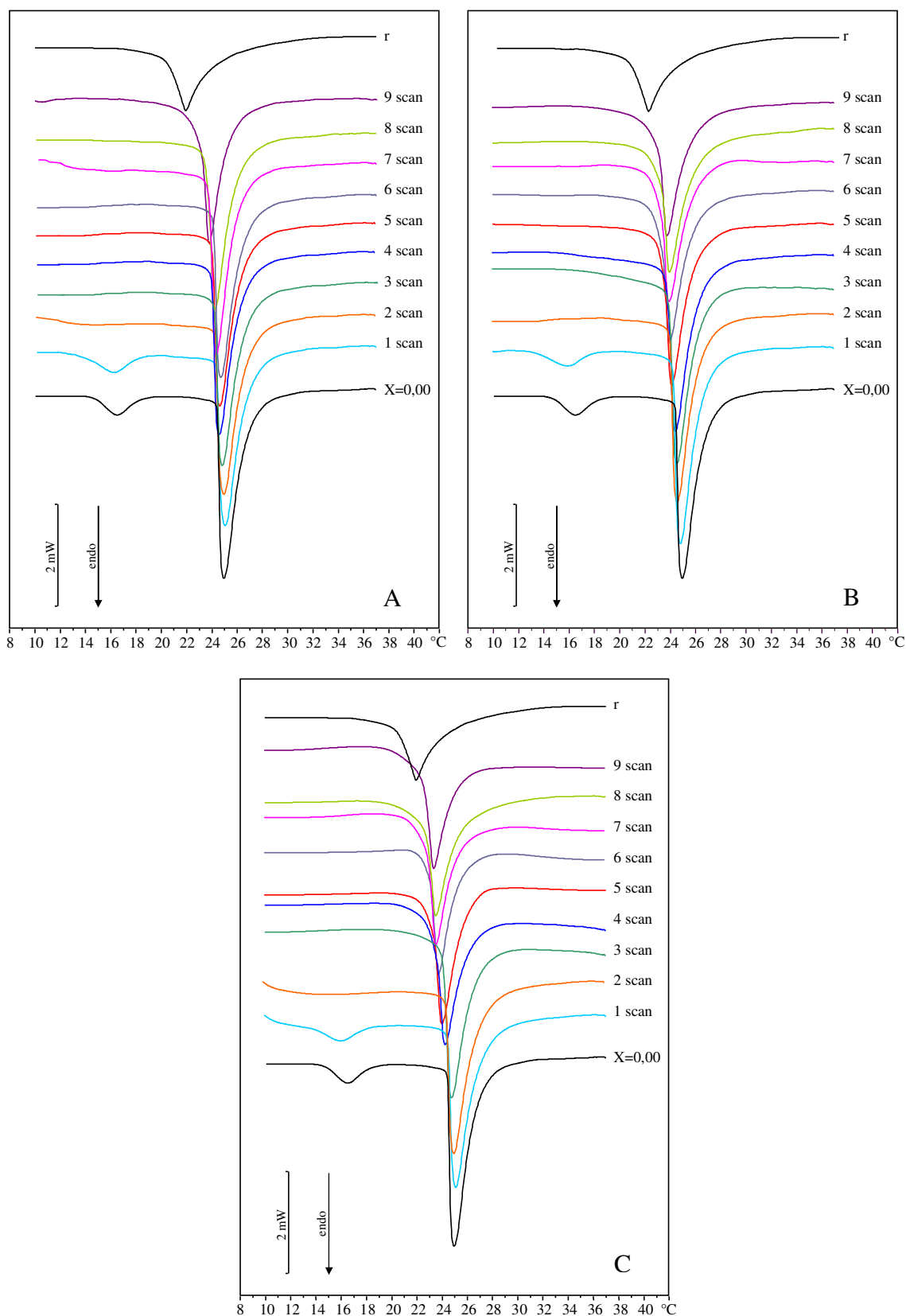


Figura 2.5. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV di DMPC lasciati ad incubare a 37 °C con TMS alla frazione molare 0,12 in presenza di β -CD, rispettivamente rapporto molare TMS/ β -CD 1:0,5 (A); 1:1 (B); 1:2 (C). Curva r: liposomi di DMPC preparati in presenza di TMS alla frazione molare 0,12.

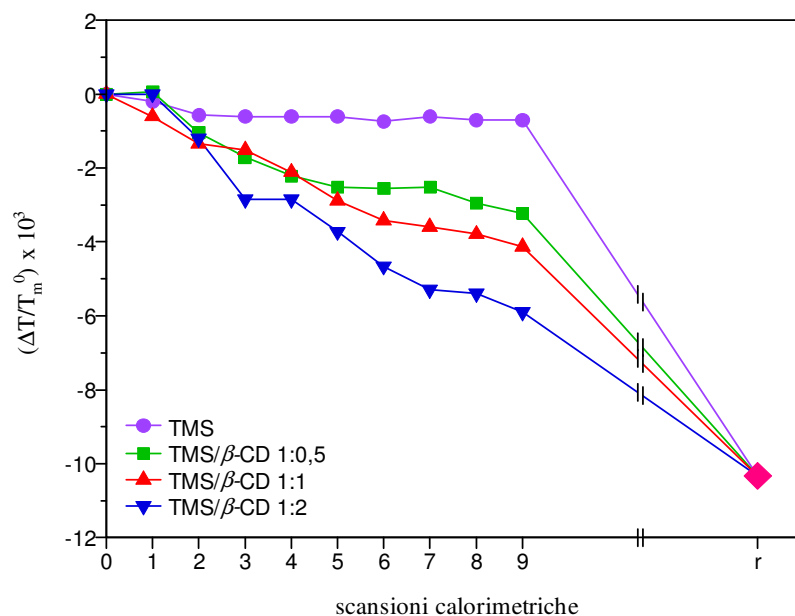


Figura 2.6. Temperatura di transizione, riportata come $\Delta T/T_m^0$, dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC lasciati a incubare in presenza di TMS alla frazione molare 0,12 (rispetto al fosfolipide) in assenza e in presenza β -CD, in funzione delle scansioni calorimetriche. ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di TMS e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) r rappresenta la temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di TMS, alla frazione molare 0,12.

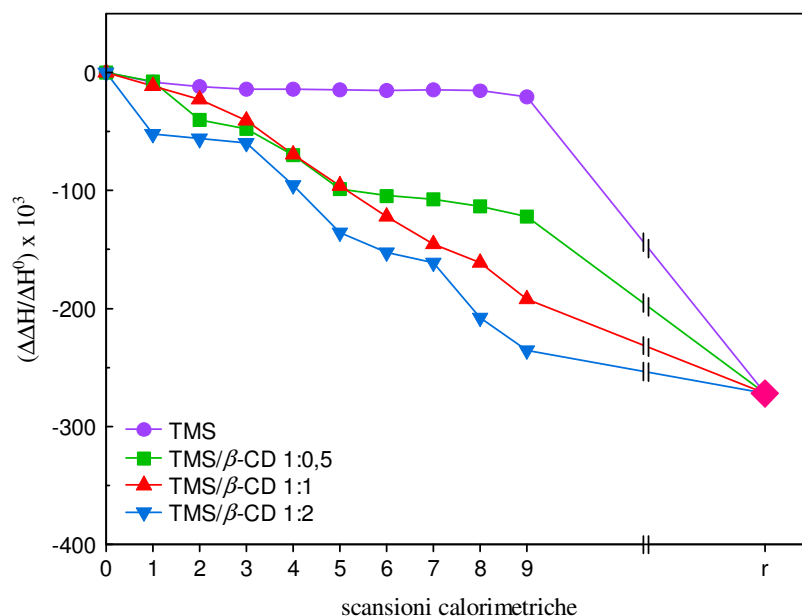


Figura 2.7. Variazione dell'entalpia, riportata come $\Delta\Delta H/\Delta H^0$, dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC lasciati a incubare in presenza di TMS alla frazione molare 0,12 (rispetto al fosfolipide) in assenza e in presenza β -CD, in funzione delle scansioni calorimetriche. ($\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$, dove ΔH = variazione di entalpia degli MLV di DMPC in presenza di TMS e ΔH^0 è la variazione di entalpia degli MLV di DMPC pura) r rappresenta la variazione di entalpia degli MLV di DMPC preparati in presenza di TMS, alla frazione molare 0,12.

La Figura 2.8 (A-C), mostra le curve calorimetriche degli MLV di DMPC in presenza di differenti quantità di β -CD a crescenti tempi di incubazione; questi esperimenti sono stati effettuati per essere certi che l'effetto osservato sulla curva degli MLV di DMPC nelle cinetiche fatte in presenza sia di TMS che di β -CD sia effettivamente dovuto ad un aumentato assorbimento del TMS e non ad una interazione tra i liposomi e le ciclodestrine. I risultati di questi esperimenti indicano chiaramente che le β -CD, per tutte e tre le quantità utilizzate, non provocano variazioni nella curva calorimetrica degli MLV di DMPC, quindi non interagiscono con il doppio strato fosfolipidico.

2.11.3. Esperimenti di stabilità MLV DMPC/3,5,4'-trimetilresveratrolo

Le curve calorimetriche degli MLV di DMPC, preparati in presenza di trimetilresveratrolo alla frazione molare 0,12, ed incubati in presenza di differenti quantità di β -CD sono mostrate in Figura 4.8, comparate con la curva calorimetrica degli MLV di DMPC. Nel caso in cui il sistema DMPC/trimetilresveratrolo non fosse stabile e le β -CD riuscissero ad estrarre il trimetilresveratrolo dal doppio strato fosfolipidico degli MLV, le curve calorimetriche dovrebbero subire delle variazioni che le renderebbero simili alla curva calorimetrica degli MLV di sola DMPC.

In presenza di β -CD nella stessa quantità utilizzata negli esperimenti in presenza di trimetilresveratrolo/ β -CD 1:0,5 (Figura 4.8 A) il picco non subisce alcuna variazione di forma né di posizione. Anche con una maggiore quantità di β -CD, (trimetilresveratrolo/ β -CD 1:1) il picco non subisce variazioni nella forma ma si sposta verso temperature leggermente più alte (Figura 4.8 B). Infine, per quanto riguarda la quantità più alta di β -CD, la stessa utilizzata negli esperimenti in presenza di trimetilresveratrolo/ β -CD 1:2, (Figura 4.8 C) il picco rimane pressoché invariato nella forma ma si sposta leggermente verso temperature più elevate.

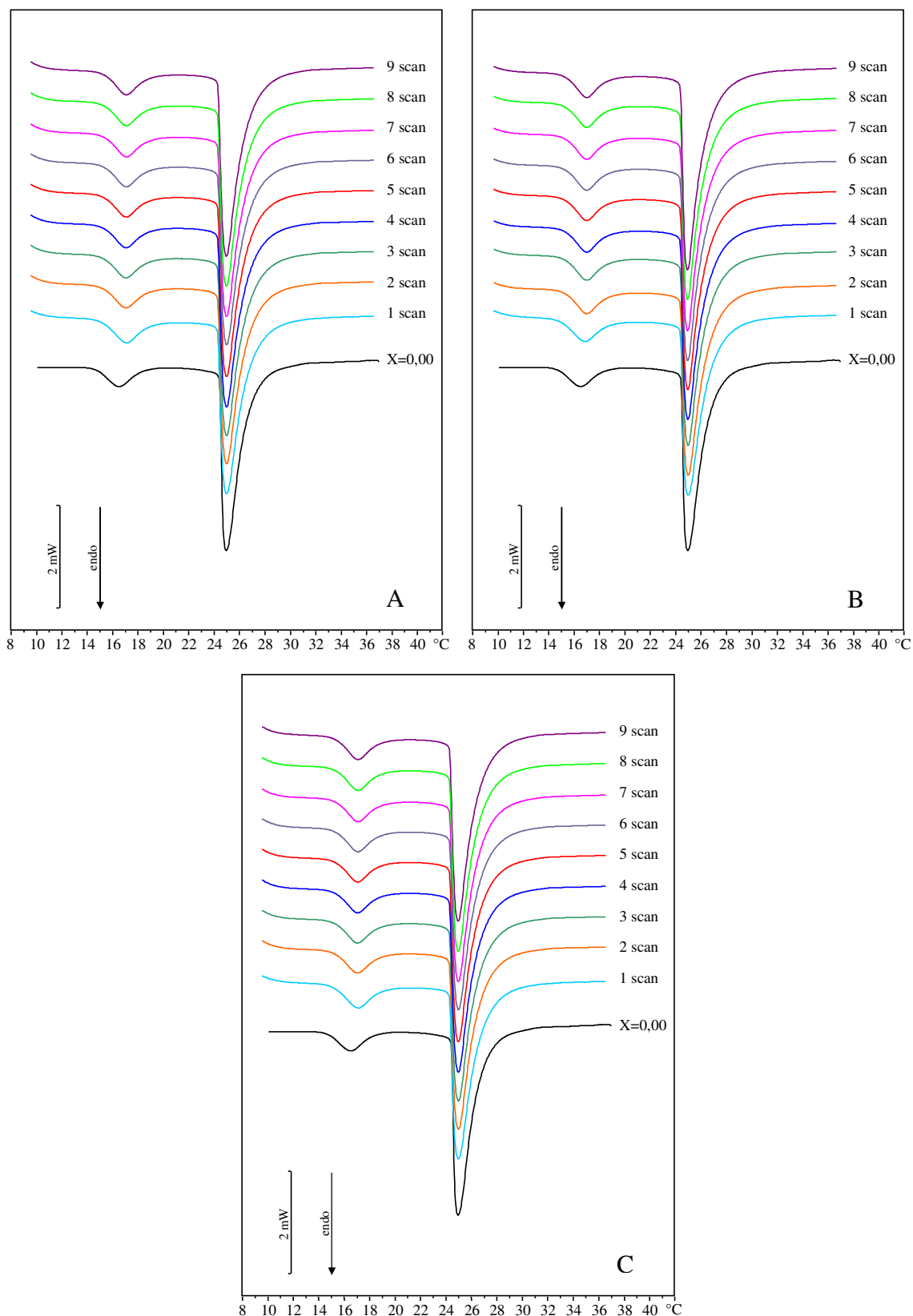


Figura 2.8. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV di DMPC lasciati ad incubare a 37 °C in presenza di β -CD nella quantità utilizzata per gli esperimenti in presenza di trimetilresveratrolo/ β -CD (rapporto molare 1:0,5 (A); 1:1 (B); 1:2 (C)).

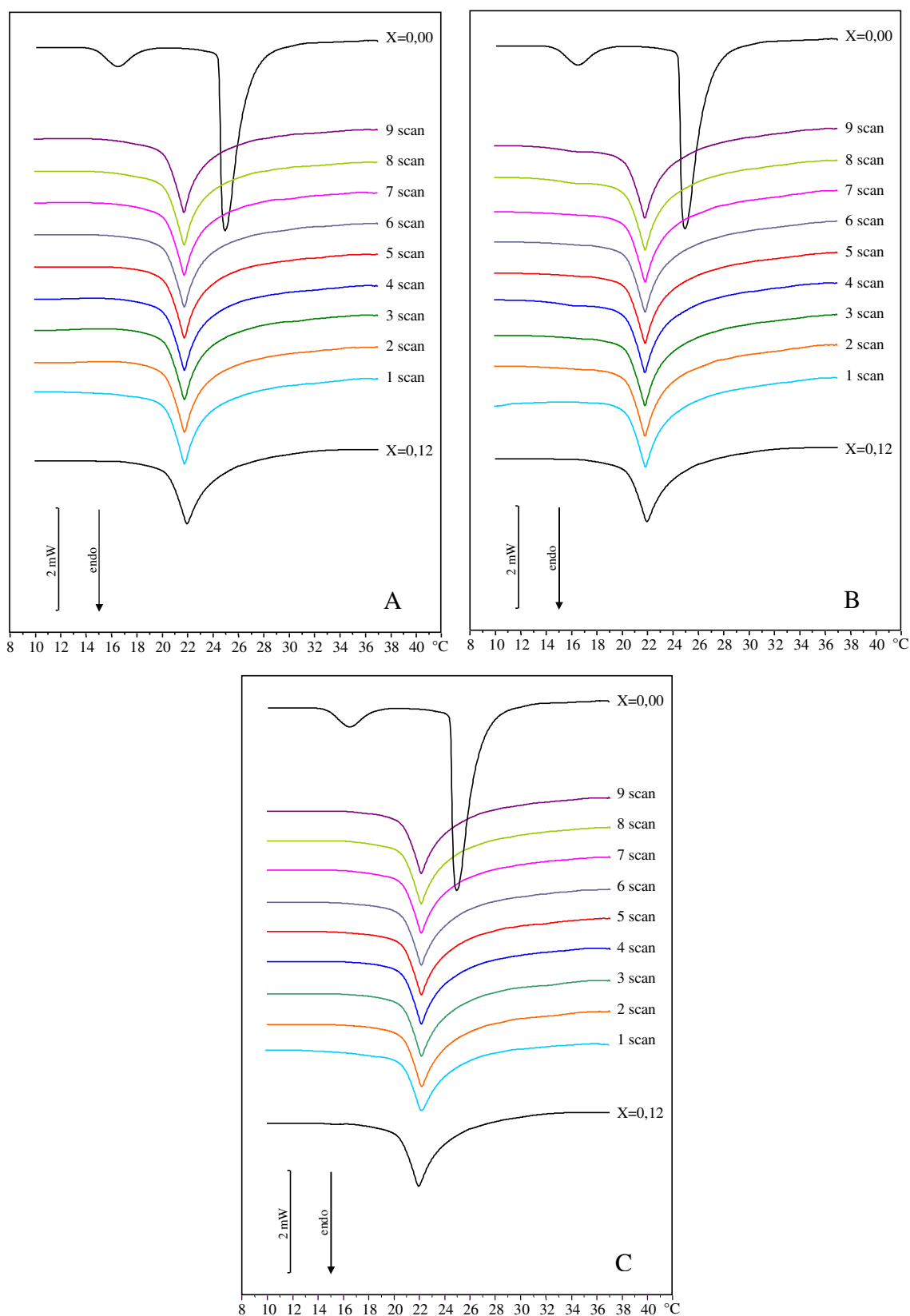


Figura 2.9. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV di DMPC, preparati in presenza della frazione molare 0,12 di trimetilresveratrolo, lasciati ad incubare a 37 °C in presenza di β -CD (A – C, rispettivamente rapporto molare TMS/ β -CD 1:0,5 - 1:1 - 1:2).

I valori della temperatura di transizione (espressa come $\Delta T/T_m^0$) dei picchi calorimetrici di questi esperimenti sono confrontati in Figura 2.10 e riportati in funzione delle consecutive scansioni calorimetriche ottenute all'aumentare del tempo di incubazione. Allorché il rapporto molare trimetilresveratrolo/ β -CD è 1:0,5, non si osserva alcuna variazione della temperatura di transizione per tutto il periodo di incubazione. Quando il rapporto molare trimetilresveratrolo/ β -CD è 1:1, si ha un piccolo aumento della temperatura di transizione che diventa leggermente più marcato quando il rapporto molare è 1:2. Comunque il valore di riferimento è lontano dall'essere raggiunto. Questo indica che il sistema vescicolare DMPC/trimetilresveratrolo è molto stabile e anche con la maggiore quantità utilizzata le β -CD riescono ad estrarre solo una piccolissima quantità di trimetilresveratrolo anche dopo un tempo di incubazione di otto ore.

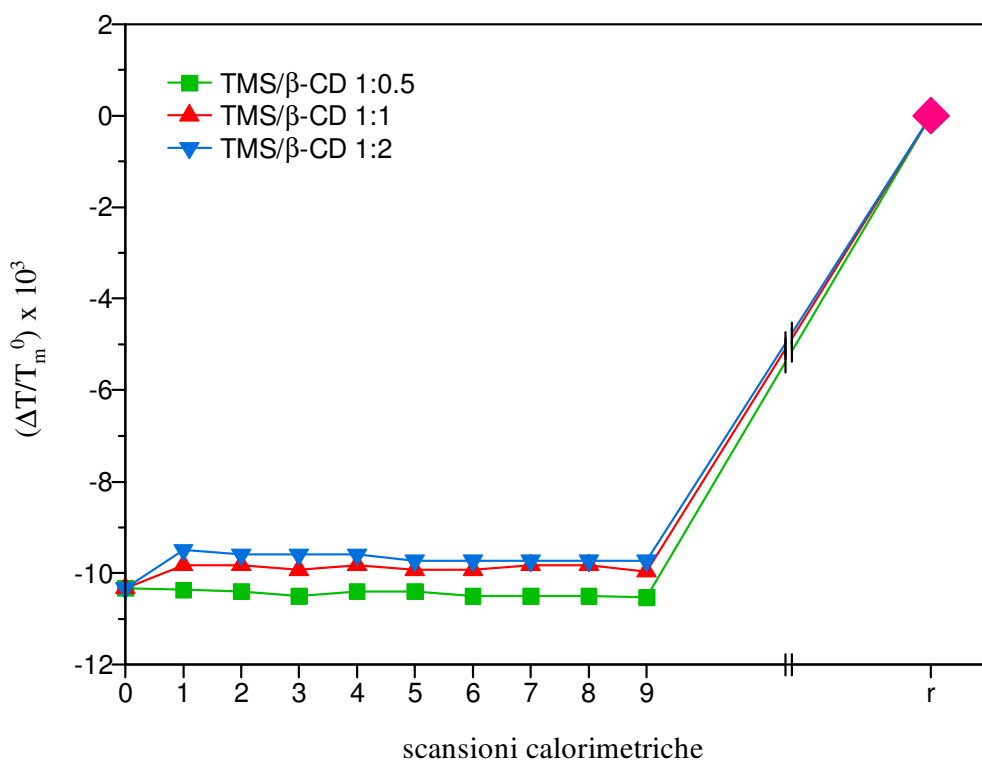


Figura 2.10. Temperatura di transizione, riportata come $\Delta T/T_m^0$, dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza di trimetilresveratrolo alla frazione molare 0,12 lasciati a incubare in presenza di β -CD, in funzione delle scansioni calorimetriche. ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di trimetilresveratrolo e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura). Il valore r rappresenta la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura.

2.11.4. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)

La Figura 2.11 mostra l'isoterma di compressione della DMPC pura registrata a 10 e 37 °C. Essa si sposta verso valori più elevati d'area per molecola all'aumentare della temperatura.

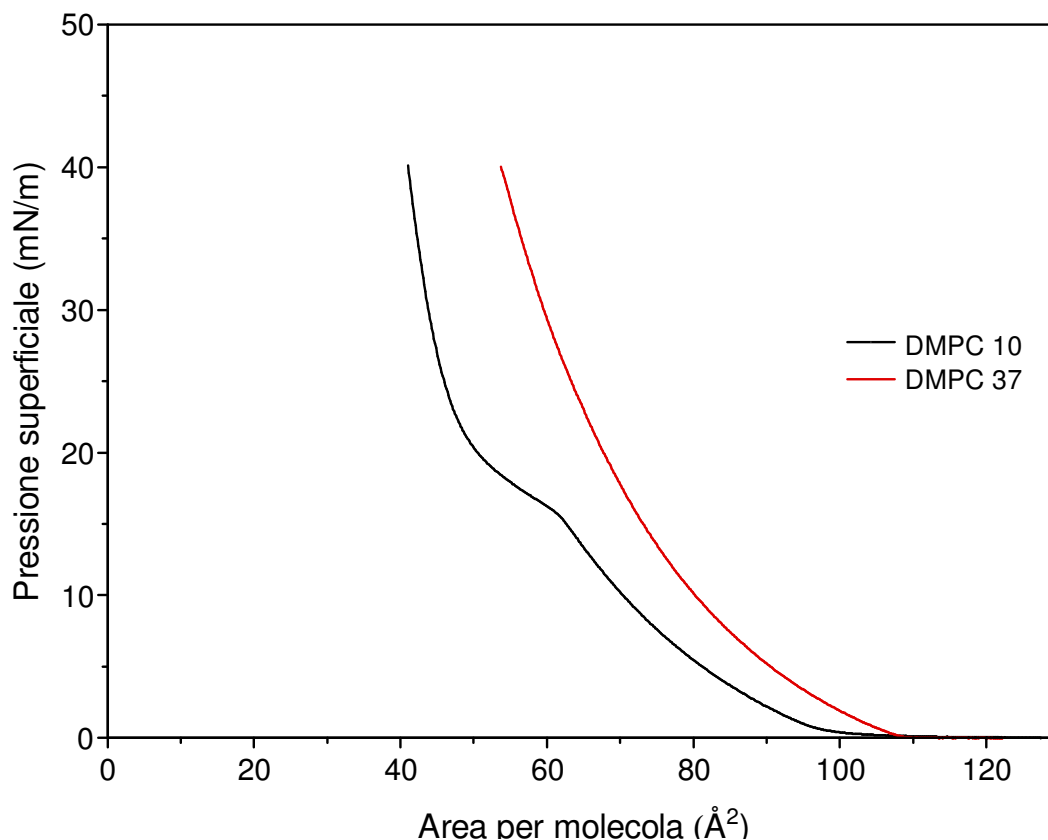


Figura 2.11. Curve isoterme di tensione superficiale/area media per molecola dei monolayer di DMPC alle temperature di 10 °C e 37 °C.

L'isoterma a 10 °C mostra quattro distinte regioni:

- Il comportamento tipico di uno stato gassoso si registra nella zona tra 130 e 100 Å²;
- La regione che va da 100 a circa 65 Å² è caratteristica di uno stato liquido-espanso;
- La regione che va da 65 a 50 Å² indica la transizione dalla fase di liquido-espanso alla fase di liquido-condensato;
- La regione che va da circa 50 Å² a valori minori di area per molecola è indicativa di uno stato liquido-condensato allorché la pressione superficiale aumenta velocemente al diminuire dell'area molecolare.

L'isoterma a 37 °C presenta due regioni:

- La zona tra 130 a circa 115 Å² è caratteristica di uno stato gassoso;

- La zona che va da 115 \AA^2 a valori più bassi d'area per molecola è caratteristica di uno stato liquido-espanso, infatti, al diminuire dell'area per molecola si ha un graduale aumento della pressione superficiale.

La Figura 2.12 riporta le curve isoterme di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ della DMPC, del CT-C1 e delle miscele DMPC/CT-C1 a varie frazioni molari di CT-C1. Si nota che il composto puro non riesce a formare un monostrato. Esaminando le curve isoterme dei monolayer formati dalle miscele DMPC/CT-C1, si nota che l'aggiunta del CT-C1 a basse frazioni molari non provoca sostanziali variazioni nell'isoterma della DMPC. A partire dalla frazione molare 0,09 le isoterme non presentano la transizione liquido espanso/liquido condensato tipica della DMPC e aumentando gradualmente la quantità di composto si osserva uno spostamento sempre più evidente delle isoterme verso valori più bassi di area per molecola.

Nella Figura 2.13 sono riportate le curve isoterme di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ della DMPC, del CT-C1 e delle miscele DMPC/CT-C1 a varie frazioni molari. A questa temperatura, le isoterme della miscela DMPC/CT-C1, per frazioni molari di composto comprese tra 0,015 e 0,06 risultano leggermente spostate verso valori più alti d'area per molecola rispetto all'isoterma della DMPC; per frazioni molari comprese fra 0,09 e 0,12 si spostano leggermente verso valori più bassi di area per molecola, mentre per le frazioni molari più alte lo spostamento osservato è maggiore. Per il CT-C1 puro non si osserva alcuna isoterma.

Nella Figura 2.14 sono riportate le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del CT-D e delle miscele DMPC/CT-D a varie frazioni molari, registrate a $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Non si osserva alcuna curva isoterma del CT-D puro, indicando che il composto non riesce a formare un monostrato. Per le frazioni molari comprese tra la 0,015 e la 0,045 l'andamento delle isoterme non si discosta molto da quello della sola DMPC. A partire dalla frazione molare 0,06 la transizione liquido espanso/liquido condensato si sposta verso valori di pressione superficiale più alti rispetto a quelli della DMPC e diventa sempre meno evidente sino a scomparire.

Nella Figura 2.15 sono riportate le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del CT-D e delle miscele DMPC/CT-D a varie frazioni molari, registrate a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Le isoterme delle miscele, per frazioni molari di CT-D comprese fra 0,015 e 0,12 non si discostano molto dall'isoterma della DMPC; mentre per le frazioni molari più alte si hanno notevoli spostamenti verso valori di area per molecola più bassi. Il solo composto non forma il monolayer.

Nella Figura 2.16 sono riportate le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del trimetilresveratrolo e delle miscele DMPC/TMS a varie frazioni molari di TMS, registrate a 10 °C. Il TMS non forma un monolayer. Confrontando le isoterme delle miscele rispetto a quella della DMPC, per basse frazioni molari (0,015-0,03) di TMS, sono spostate verso valori d'area per molecola più alti mentre, a frazioni molari maggiori, sono spostate verso valori d'area per molecola più bassi. La transizione LE/LC tende a spostarsi verso valori più elevati di pressione superficiale, e a diventare sempre meno netta fino a scomparire già alla frazione molare 0,5.

Nella Figura 2.17 sono riportate le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del TMS e delle miscele DMPC/TMS a varie frazioni molari di trimetilresveratrolo, a 37 °C. Lostilbene non forma un monolayer, le isoterme delle miscele DMPC/TMS, per tutte le frazioni molari sono spostate a valori di area per molecola più bassi rispetto all'isoterma della DMPC.

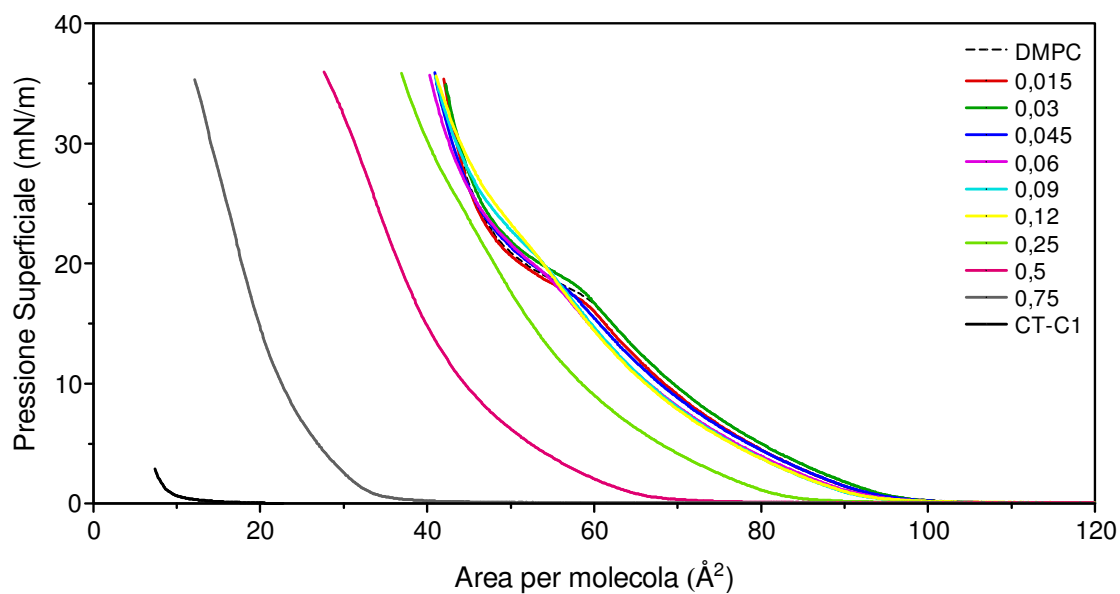


Figura 2.12. Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di CT-C1 a diverse frazioni molari.

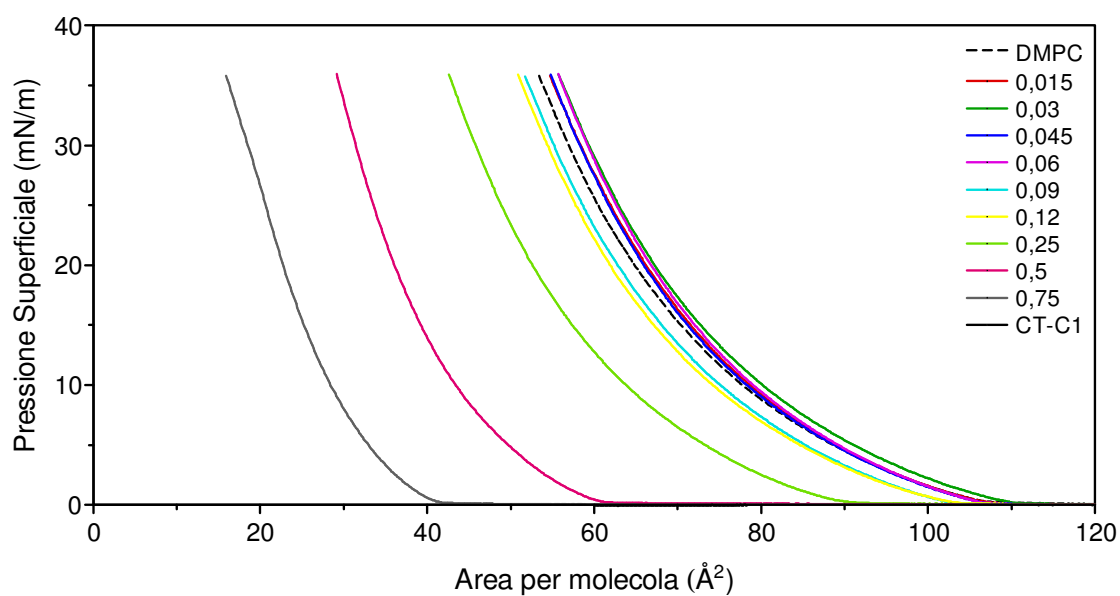


Figura 2.13. Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di CT-C1 a diverse frazioni molari.

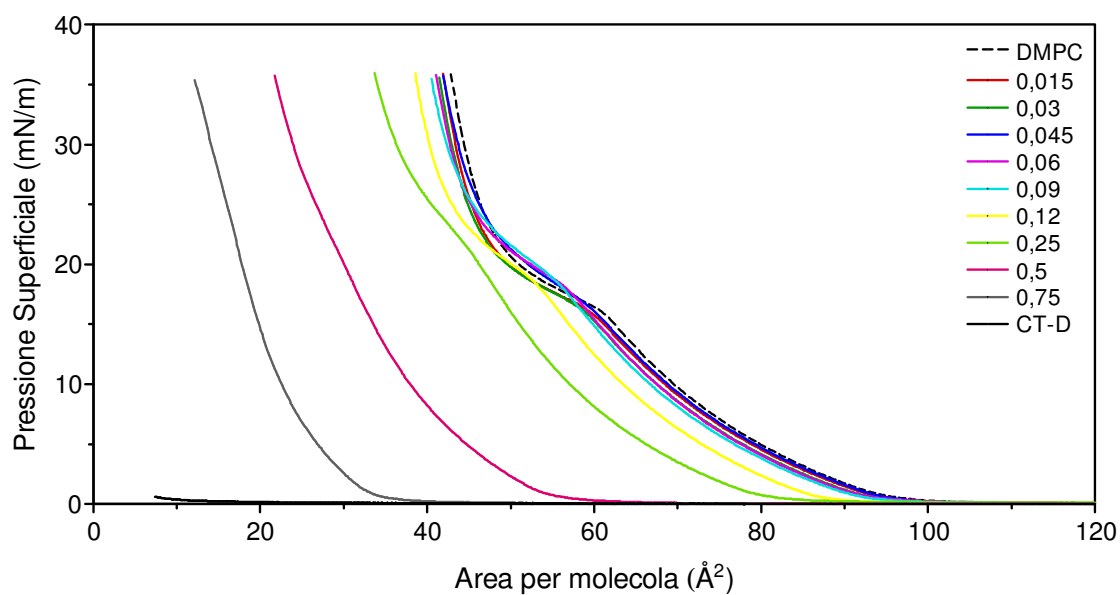


Figura 2.14. Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di CT-D a diverse frazioni molari.

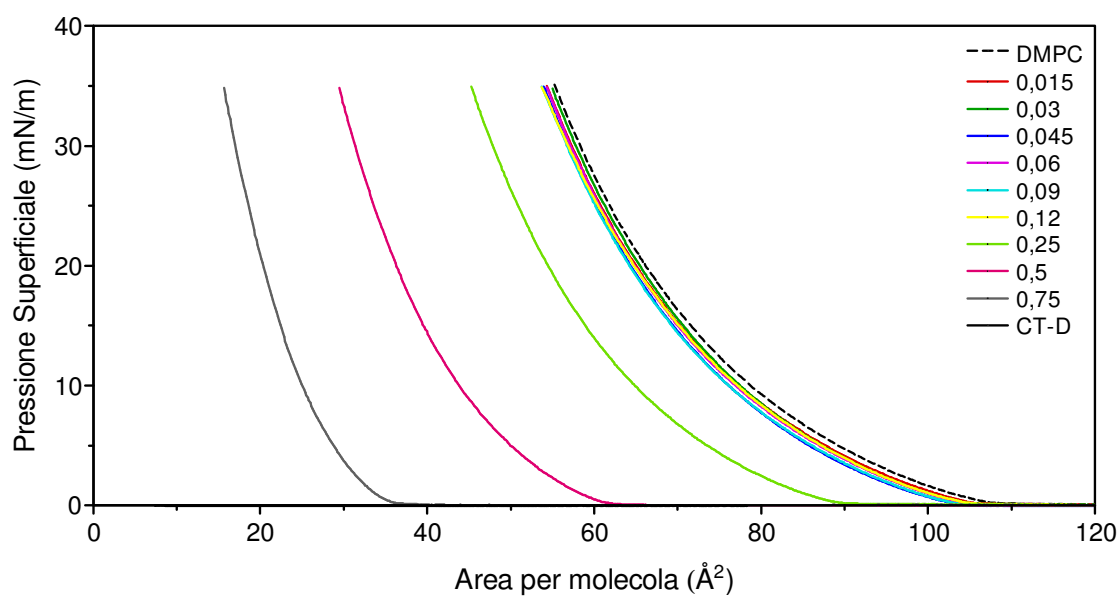


Figura 2.15. Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di CT-D a diverse frazioni molari.

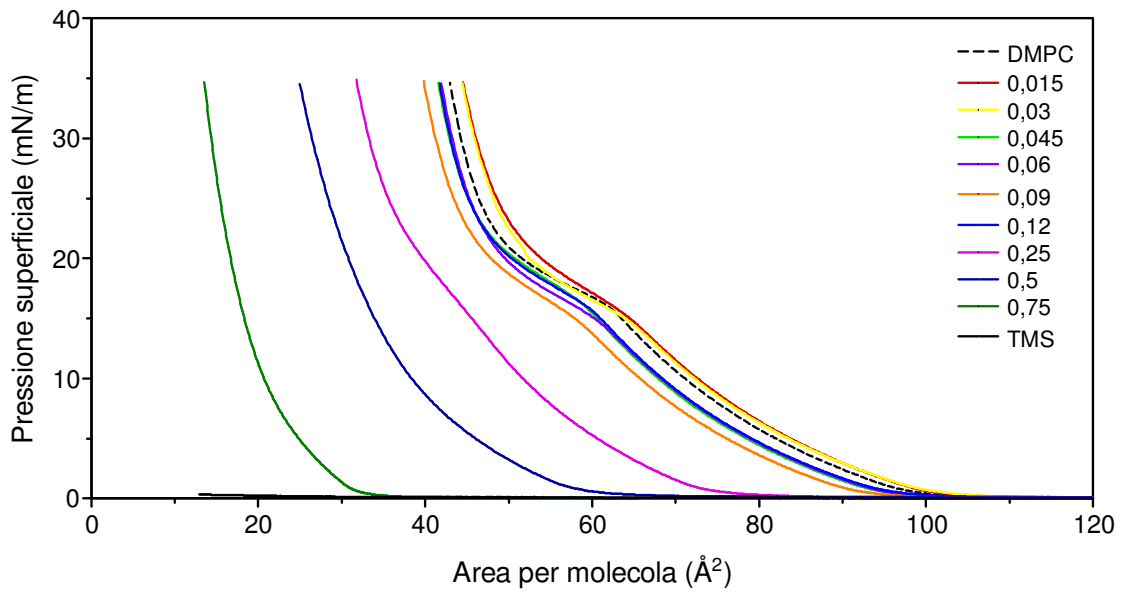


Figura 2.16. Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di TMS a diverse frazioni molari.

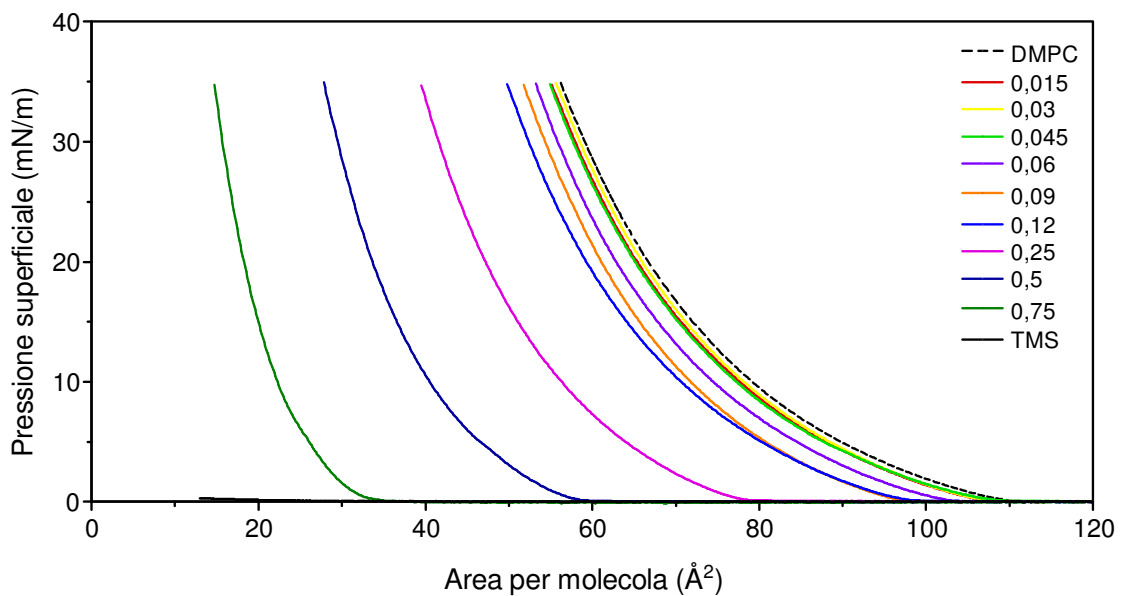


Figura 2.17. Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di TMS a diverse frazioni molari.

Al fine di ottenere maggiori informazioni sul tipo di interazioni intermolecolari che si instaurano nei monolayers misti di DMPC/composti in esame si riportano in grafico i dati relativi all'area media per molecola, a differenti valori di pressione superficiale (10 mN/m; 20 mN/m e 30 mN/m) in funzione delle frazioni molari di CT-C1 CT-D e TMS. La retta tratteggiata, riportata nelle figure, indica i valori di area per molecola ad un determinato valore di pressione superficiale per un monolayer a due componenti con comportamento ideale. Essa si ottiene congiungendo il valore dell'area per molecola di DMPC pura (frazione molare pari a 0,0 del composto considerato) al valore ottenuto per il composto puro (frazione molare pari a 1 del composto considerato) ai valori di pressione superficiale considerati.

Le Figure 2.18-2.19 mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/CT-C1 in funzione della frazione molare di CT-C1 alle temperature di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Alla temperatura di 10 °C, alla pressione di 10 mN/m e di 30 mN/m, fino alla frazione molare 0,09 si osserva la sovrapposizione dei valori sperimentali a quelli ideali, dalla frazione molare 0,12 si osserva una deviazione positiva rispetto alla retta ideale. A 20 mN/m si osserva una deviazione positiva rispetto alla retta ideale per tutte le frazioni molari, ad eccezione della 0,015. Alla temperatura di 37 °C, a 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m si nota una deviazione positiva dei valori di area molecolare rispetto alla retta ideale per tutte le frazioni molari suggerendo che fra le molecole di CT-C1 e DMPC si instaurano interazioni repulsive.

Le Figure 2.20-2.21 mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/CT-D in funzione della frazione molare di CT-D alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Alla temperatura di 10 °C, per tutti i valori di pressione superficiale, i valori sperimentali registrati per le frazioni molari più basse (0,015-0,03) si sovrappongono a quelli della retta ideale e a partire dalla frazione molare 0,045 si hanno deviazioni positive più evidenti a 20 mN/m. Alla temperatura di 37 °C a 10 mN/m, 20 mN/m, 30 mN/m i valori sperimentali sono quasi sovrapponibili a quelli ideali per le frazioni molari più basse; a partire dalla frazione molare 0,06 si osserva una deviazione positiva dovuta alla repulsione fra le molecole di CT-D e quelle di DMPC.

Le Figure 2.22-2.23 mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/TMS in funzione della frazione molare di TMS alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Gli esperimenti

effettuati a 10 °C mostrano che il trimetilresveratrolo per tutti e tre i valori di pressione superficiale considerati ha un lieve effetto espansore che è più evidente ad alte frazioni molari. Gli esperimenti effettuati alla temperatura di 37 °C hanno mostrato che i valori di area per molecola sperimentali si sovrappongono a quelli ideali per tutte le frazioni molari, tranne per quella più alta che mostra una leggera deviazione positiva.

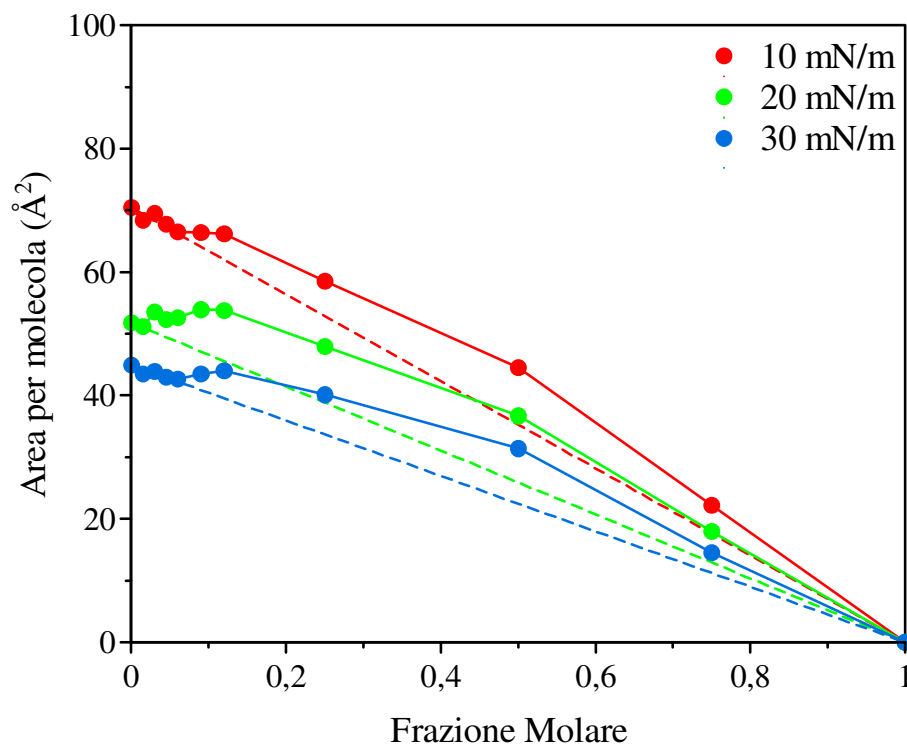


Figura 2.17. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/CT-C1 a frazioni molari crescenti di CT-C1, a 10 °C.

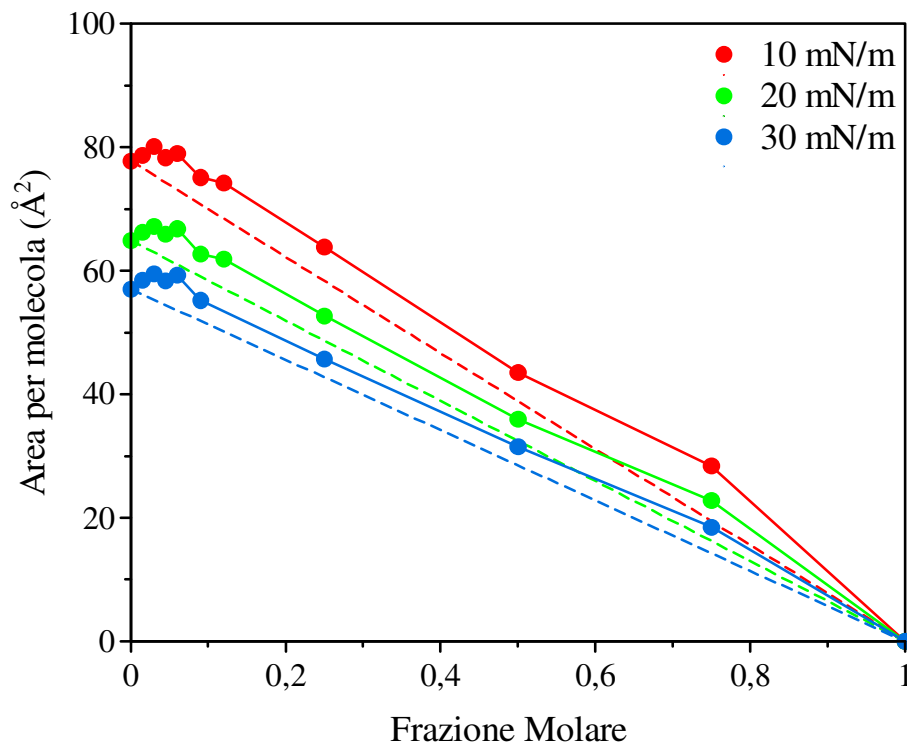


Figura 2.18. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/CT-C1 a frazioni molari crescenti di CT-C1, a 37 °C.

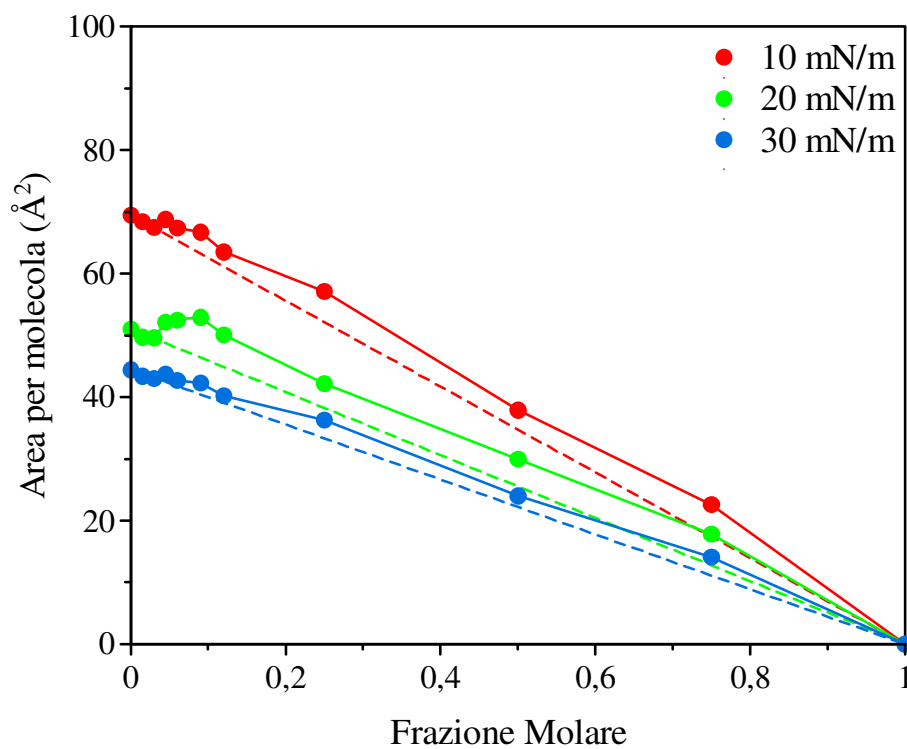


Figura 2.19. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/CT-D a frazioni molari crescenti di CT-D, a 10 °C.

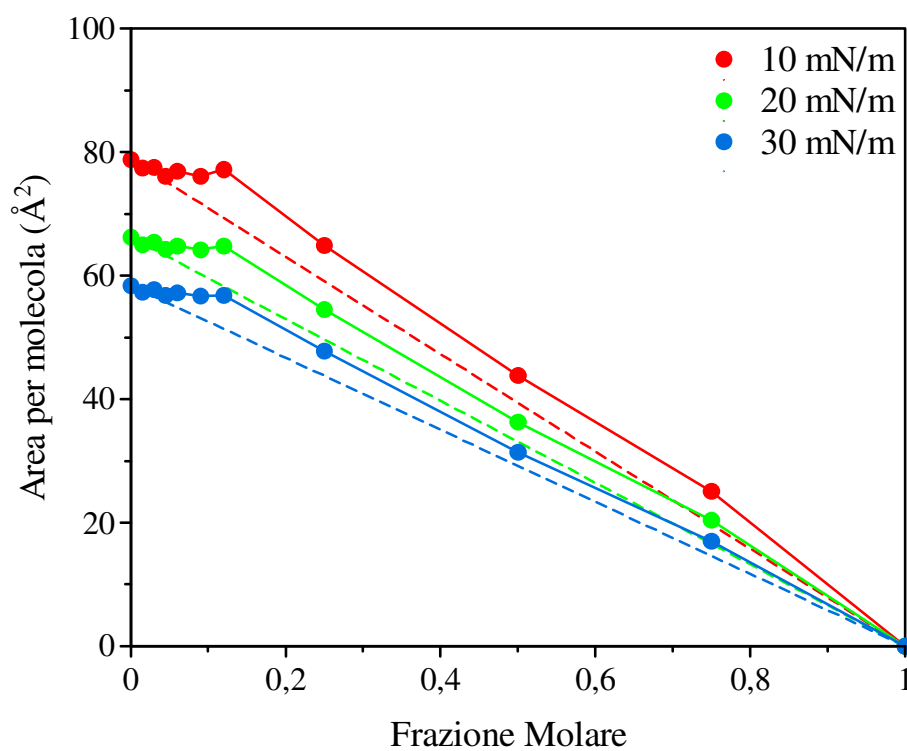


Figura 2.20. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/CT-D a frazioni molari crescenti di CT-D, a 37 °C.

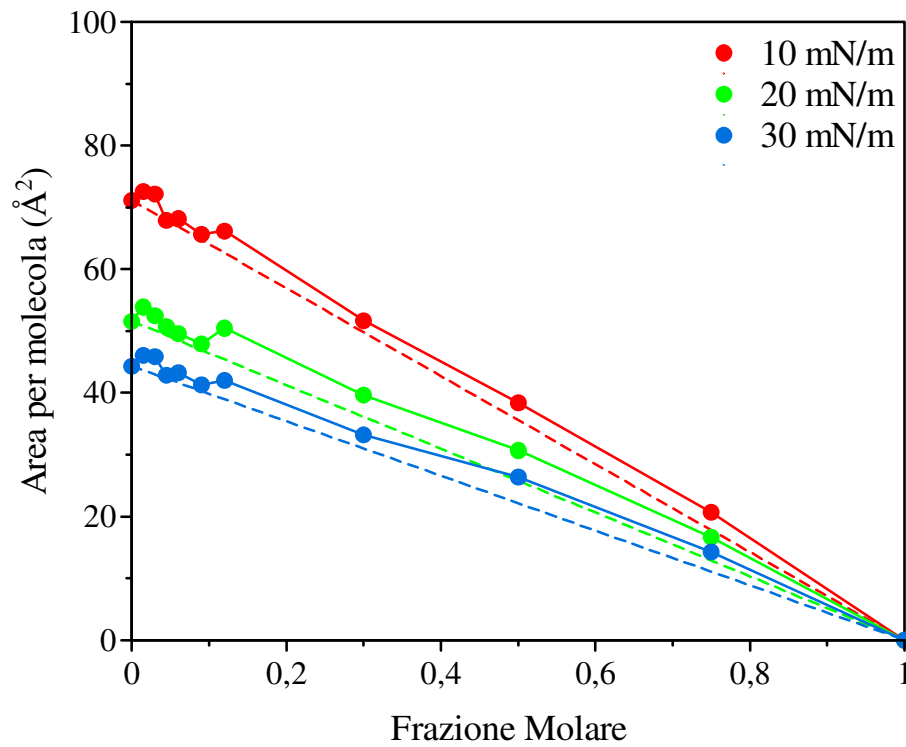


Figura 2.21. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/TMS a frazioni molari crescenti di TMS, a 10 °C.

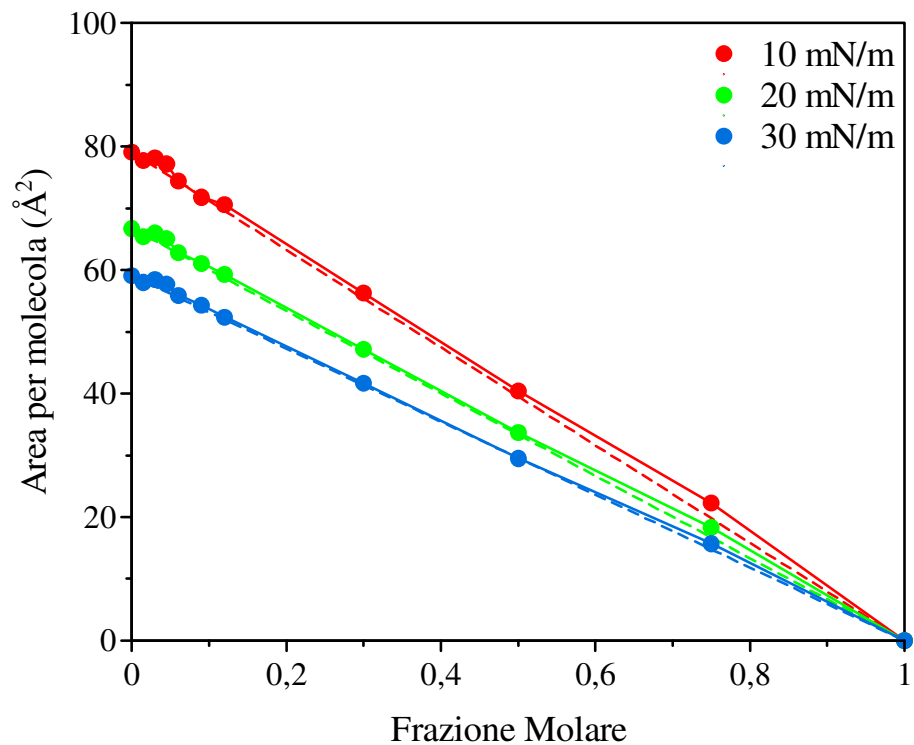


Figura 2.22. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/TMS a frazioni molari crescenti di TMS, a 37 °C.

2.11.5. CONCLUSIONI

Esaminando i risultati ottenuti si evince che tutti e tre i composti interagiscono con i modelli di biomembrana. Infatti, dalle misure di calorimetria a scansione differenziale è emerso che i composti hanno un effetto fluidificante sugli MLV di DMPC in dipendenza della loro concentrazione, modificando la transizione di fase del lipide usato. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti con la tecnica di Langmuir-Blodgett, infatti si osservano deviazioni positive dei valori di area per molecola rispetto ai valori ideali, giustificabili con l'instaurarsi di interazioni repulsive tra i composti ed il monolayer di DMPC.

Gli esperimenti di permeazione, effettuati lasciando gli MLV di DMPC in contatto con i composti, ci hanno permesso di studiare la loro capacità di solubilizzarsi nel mezzo acquoso circostante, raggiungere e attraversare il doppio strato lipidico dei liposomi. In particolare ci hanno permesso di dimostrare che i composti, per le loro proprietà lipofile non sono capaci di attraversare il mezzo acquoso e interagire con i doppi strati lipidici degli MLV. Quindi, il lavoro di ricerca è stato proseguito valutando la possibilità di favorire la solubilizzazione del trimetilresveratrolo, che, tra i tre, è il composto con il miglior profilo cinetico, mediante l'uso di ciclodestrine. Per ciò gli esperimenti di permeazione sono stati effettuati in presenza di differenti quantità di β -CD, i risultati ottenuti hanno dimostrato che esse sono in grado di aumentare l'assorbimento del trimetilresveratrolo da parte degli MLV. Recentemente è stata dimostrata la capacità del trans-resveratrolo, composto strettamente correlato al trimetilresveratrolo, di formare complessi di inclusione con le β -CD (Lu Z. *et al.*, 2009), ciò rafforza l'ipotesi che anche il trimetilresveratrolo sia in grado di formare complessi d'inclusione con le β -CD. Inoltre, si è osservato che il processo di solubilizzazione, dipende dalla quantità di β -CD usata, i migliori risultati si sono ottenuti con un rapporto trimetilresveratrolo/ β -CD pari a 1:2. In più, per accertare che gli effetti osservati in questi esperimenti sono dovuti al solo trimetilresveratrolo, sono stati condotti esperimenti di controllo in presenza delle sole β -CD nelle stesse concentrazioni usate negli esperimenti di permeazione in presenza di trimetilresveratrolo e β -CD. Questi esperimenti hanno confermato che le quantità di β -CD generalmente usate per la formazione di complessi (rapporto molare 1:1) non causano variazioni della transizione di fase degli MLV di DMPC.

Ulteriori esperimenti sono stati effettuati per verificare la stabilità degli MLV di DMPC e trimetilresveratrolo e la capacità delle β -CD di estrarre il trimetilresveratrolo dal sistema vescicolare. Da tali esperimenti è emerso che gli MLV di DMPC contenenti il trimetilresveratrolo sono un sistema stabile e le β -CD non sono in grado di estrarre il trimetilresveratrolo.

CAPITOLO 3

Analisi calorimetrica dell'interazione e dell'assorbimento di acidi grassi ω -3 con modelli di biomembrana.

3.1. Acidi grassi ω -3

Gli acidi grassi omega-3 (ω -3) sono dei componenti essenziali per ogni cellula vivente, infatti sono importanti non solo per assicurare l'integrità delle strutture lipidiche cellulari (*Alexander J.W., 1998*) e lo sviluppo neurologico (*Yamashima T., 2008*), ma rappresentano anche una cospicua fonte di energia e sono i precursori di numerosi composti biologicamente attivi. La loro struttura chimica è caratterizzata da una catena idrocarburica con un gruppo terminale carbossilico ed uno metilico (omega) e contenente un certo numero di doppi legami. La fonte principale di acidi grassi ω -3 è rappresentata dal cibo ed, in particolare, pesce, olio di pesce e vegetali (*Lunn J. and Theobald H.E., 2006*). Inoltre, una dieta ricca di acidi grassi ω -3, come l'acido eicosapentaenoico (EPA), è correlata alla prevenzione di molte patologie, come i tumori del seno, del colon e della prostata (*Sasaki S. et al., 1993; Rose D.P. and Connolly J.M., 1999; Kelavkar U.P. et al., 2006*), patologie infiammatorie e autoimmuni, comprese l'artrite reumatoide (*Simopoulos A.P., 2002*), la psoriasi (*Mayer P. et al., 2002*), il diabete (*Morishita M. et al., 2000*) e patologie cardiovascolari (*Dyerberg J. and Bang H.O., 1982*).

Come tutte le molecole biologicamente attive anche gli acidi grassi, per sortire il loro effetto, devono interagire con le membrane biologiche ed in seguito oltrepassarle. Il meccanismo che consente questo processo non è stato pienamente chiarito, infatti sono stati proposti due differenti meccanismi. Secondo alcuni ricercatori gli acidi grassi possono penetrare facilmente il foglietto lipidico più esterno del bilayer, per inserzione delle catene idrofobiche, quindi ruotano lentamente all'interno del bilayer, trasferendosi al foglietto più interno della membrana biologica. In tale meccanismo di diffusione passiva il trasporto è regolato dalle proprietà fisiche della membrana e dalla struttura degli acidi grassi (lunghezza della catena e grado di insaturazione) (*Kamp F. et al., 1995; Zakim D., 1996; Simard J.R. et al., 2008*). Dall'altra parte, altri ricercatori sostengono che il trasporto degli acidi grassi all'interno delle cellule sia mediato da specifiche proteine di membrana: FABPpm (plasma membrane fatty acid-binding proteins), FAT/CD36 (fatty acid translocase) e FATP1-FATP6 (fatty acid transport proteins) (*Zimmerman A.W. and Veerkamp J.H., 2002; Kalant D. and Cianflone K.,*

2004; Koonen D.P. et al., 2005; Eehalt R. et al., 2006) Per provare la validità del meccanismo passivo, abbiamo studiato l'interazione e l'assorbimento di acidi grassi a diversa struttura: l'acido linolenico (LNA, 18:3 n-3), l'acido eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-3), l'acido docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3), (Figura 3.1) con modelli di biomembrana, rappresentati da MLV e LUV di DMPC. Il DPA e il DHA sono costituiti da una catena idrocarburica formata dallo stesso numero di atomi di carbonio ma hanno rispettivamente cinque e sei doppi legami, quindi permettono di valutare l'effetto del grado di insaturazione sul processo di assorbimento da parte dei modelli di biomembrana. Inoltre, per ottenere maggiori informazioni sugli effetti strutturali, i risultati ottenuti sono stati paragonati con quelli dell'acido grasso a diciotto atomi di carbonio, LNA. Infine, è stato studiato anche l'acido grasso a venti atomi di carbonio, l'acido eicosapentaenoico, il quale viene sintetizzato nel nostro organismo a partire dagli acidi grassi a catena più corta, come lo stesso LNA.

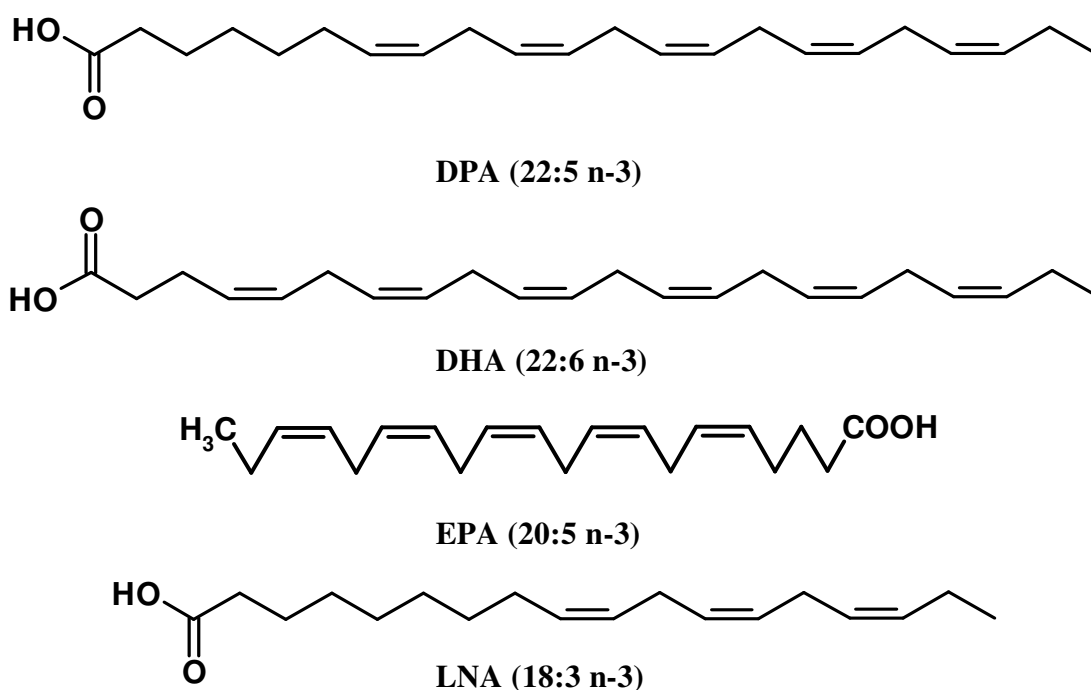


Figura 3.1. Formula di struttura degli acidi grassi studiati.

3.2. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata ottenuta dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera), (purezza: 99 %). L'acido linolenico

(LNA) (purezza $\geq 98\%$), l'EPA (purezza $\geq 98\%$) il DPA (purezza $\geq 98\%$), ed il DHA (purezza $\geq 98\%$) sono stati forniti da Cayman Chemical (Mi, USA) La soluzione tampone utilizzata per preparare i liposomi consiste in Tris 50 mM, ed è stata aggiustata a pH = 7,4 con acido cloridrico. La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo presente (Rouser G. et al., 1970).

3.3. Interazione MLV DMPC/acidi grassi ω -3

Per studiare l'interazione tra gli acidi grassi presi in esame ed i modelli di biomembrana sono stati preparati liposomi contenenti frazioni molari crescenti dei composti. In particolare, sono state preparate soluzioni del lipide e degli acidi grassi studiati in cloroformio:metanolo 1:1, quindi appropriate aliquote di queste soluzioni sono state miscelate in tubi da saggio per ottenere 0,010325 mmoli di DMPC e le seguenti frazioni molari di ogni singolo composto: 0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 e 0,18; per evaporazione dei solventi sono stati ottenuti film di DMPC contenenti i composti in esame che, in seguito sono stati idratati, con la stessa procedura descritta nel paragrafo 1.17 (Schema 1.1). Per ottenere le vescicole unilamellari, gli MLV sono stati estrusi per 19 volte attraverso una membrana in policarbonato (pori 100 nm) in un sistema per estrusione LiposofastTM Basic (Avestin Inc.) (Figura 1.4).

L'analisi DSC dei campioni preparati è stata eseguita usando un sistema Mettler TA Star^e provvisto di cella DSC 822. I campioni sono stati sottoposti per almeno tre volte (per verificare la riproducibilità dei dati) alla seguente procedura:

- 1) una scansione in riscaldamento tra 5 e 37 °C a 2 °C/min;
- 2) una scansione in raffreddamento da 37 a 5 °C a 4 °C/min.

È stata impiegata la massima sensibilità possibile ed è stato usato come riferimento una soluzione di Tris(idrossimetil)-amminometano (Tris pH = 7,4; 50 mM).

Il sistema calorimetrico è stato calibrato nella temperatura di transizione e nella variazione di entalpia usando indio, acido stearico e cicloesano seguendo la procedura dello strumento DSC 822 Mettler TA STAR^e.

Dopo l'analisi calorimetrica, aliquote di tutti i campioni sono state estratte dal crogiolo di alluminio e usate per la determinazione dell'esatta quantità di fosfolipide mediante l'analisi del fosforo (Rouser G. et al., 1970).

3.4. Cinetiche di permeazione

Per seguire l'assorbimento dei composti presi in esame, caratterizzati da una scarsa solubilità in acqua, quando si trovano in un mezzo idrofilico, un'esatta quantità (corrispondente alla frazione molare 0,09) di ciascun composto è stata pesata sul fondo del crogiolo e a questa sono stati aggiunti 120 μl (0,007375 mmoli) di MLV o LUV di DMPC (Schema 2.4). Il crogiolo è stato ermeticamente chiuso e il campione sottoposto alla seguente analisi calorimetrica:

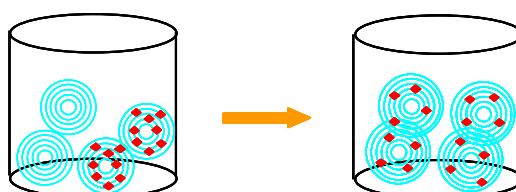
- 1) una scansione in riscaldamento tra 5 e 37 °C, ad una velocità di 2 °C/min;
- 2) un'isoterma a 37 °C, per 1 ora;
- 3) una scansione in raffreddamento da 37 a 5 °C, a 4 °C.

La procedura è stata ripetuta per otto volte al fine di rilevare una qualche variazione nelle curve calorimetriche al variare del tempo di incubazione (come nello Schema 2.4).

3.5. Cinetiche di trasferimento transmembrana

Questi esperimenti sono stati effettuati per capire se un mezzo lipofilo, dove gli acidi grassi in esame possono essere molecolarmente dispersi, possa contribuire a migliorare l'assorbimento degli stessi da parte dei lipidi di membrana. Una quantità pari a 60 μl di liposomi multilamellari di DMPC (0,003687 mmoli), preparati in presenza di ciascun composto preso in esame alla frazione molare 0,12, è stata posta in un crogiolo di alluminio da 160 μl e ad essa sono stati aggiunti 60 μl di una sospensione equimolare di liposomi multilamellari di DMPC pura (Schema 3.1). Il crogiolo è stato chiuso ermeticamente e sottoposto alla stessa analisi calorimetrica descritta nel paragrafo precedente.

Se ogni composto è capace di trasferirsi dai liposomi pieni a quelli vuoti, si raggiungerà l'equilibrio quando tutti i liposomi presenti conterranno la stessa frazione molare di composto pari alla 0,06.



Schema 3.1 Steps delle cinetiche di trasferimento transmembrana.

3.6 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.6.1 Interazione MLV DMPC/acidi grassi ω -3

Gli MLV di DMPC preparati in presenza di frazioni molari crescenti di ognuno dei composti studiati sono stati analizzati con la tecnica DSC, le curve calorimetriche ottenute sono riportate in Figura 3.2. Esse sono, inoltre, comparate con quella degli MLV di DMPC pura (0,00), le variazioni, più o meno marcate in base al composto considerato, osservate in tale curva provano l'interazione tra gli acidi grassi ed i liposomi di DMPC. Infatti, per tutti gli acidi grassi si osserva una riduzione del picco di pretransizione fino a scomparire. Per quanto riguarda il picco principale, esso subisce uno spostamento verso temperature più basse, inoltre è molto evidente un allargamento del picco. In Figura 3.3 è riportata la variazione della temperatura di transizione causata dalla presenza degli acidi grassi in esame negli MLV di DMPC, espressa come $\Delta T/T_m^0$, in funzione della frazione molare di composto. Poiché, soprattutto per LNA, DPA e DHA i picchi delle frazioni molari 0,12, 0,15 e 0,18 sono molto slargati e meno intensi, i valori della temperatura di transizione di tali frazioni molari non sono stati riportati in grafico. Dalla figura si evince che maggiore è la frazione molare dei composti presente negli MLV, maggiore è il decremento della temperatura di transizione; in particolare l'effetto più marcato è quello causato dal DHA, seguito dal DPA, da LNA ed infine dall'EPA.

La Figura 3.4 mostra la variazione di entalpia riportata come $\Delta\Delta H/\Delta H^0$, dove $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$, e ΔH^0 è la variazione di entalpia degli MLV di DMPC pura e ΔH è la variazione di entalpia degli MLV di DMPC preparati in presenza di ciascun composto, rispetto alla loro frazione molare. La presenza di crescenti quantità dei composti in esame causa una riduzione della variazione di entalpia. La riduzione dei valori di T_m , di ΔH , e l'allargamento del picco calorimetrico causati dalla presenza degli acidi grassi possono essere giustificati con un effetto fluidificante sulla cooperatività dei fosfolipidi causato dall'inserimento dei composti nella struttura ordinata del bilayer fosfolipidico; questa caratteristica è comune a molte classi di composti già studiati e riportati in letteratura (*Mouritsen O.G. and Bloom M., 1984; Raudino A. and Castelli F., 1998; Castelli F. et al., 2008*).

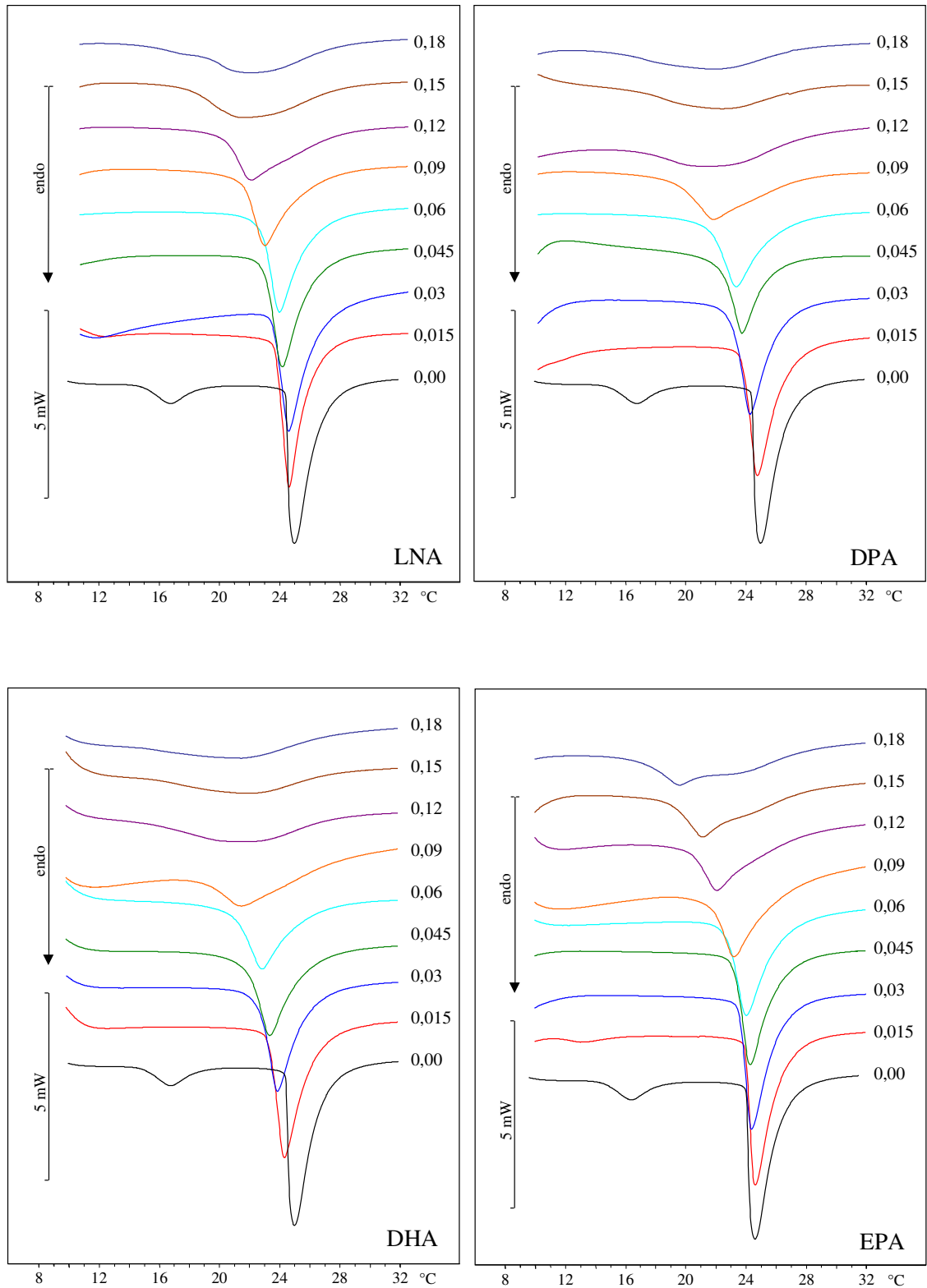


Figura 3.2. Curve calorimetriche, in riscaldamento, degli MLV di DMPC contenenti frazioni molari crescenti degli acidi grassi presi in esame.

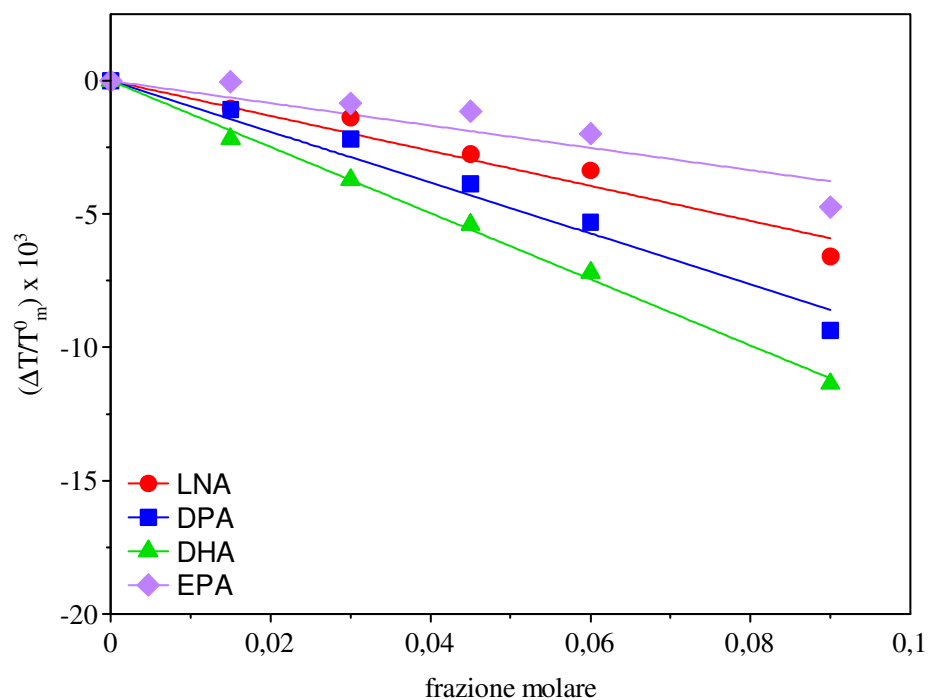


Figura 3.3. Variazione della temperatura di transizione, espressa come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura e T_m è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza degli acidi grassi), in funzione della frazione molare di composto nella dispersione degli MLV.

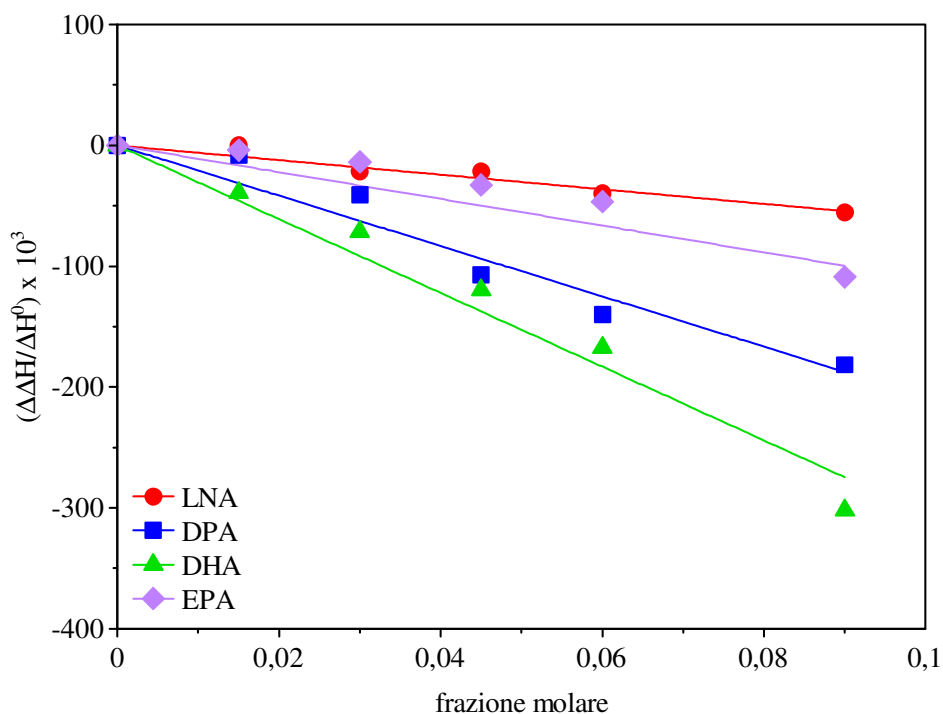


Figura 3.4. Variazione dell'entalpia, espressa come $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ ($\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$, dove ΔH^0 è la variazione di entalpia degli MLV di DMPC pura e ΔH è la variazione di entalpia degli MLV di DMPC preparati in presenza degli acidi grassi), in funzione della frazione molare di composto nella dispersione degli MLV.

3.6.2. Cinetiche di permeazione

Per svolgere la loro azione gli acidi grassi introdotti con la dieta devono essere assorbiti dalle membrane biologiche. Per mimare questo processo MLV o LUV di DMPC sono stati lasciati in contatto con un'esatta quantità di ciascun ω -3 (per avere la frazione molare 0,09 di composto rispetto al lipide), a tempi di incubazione crescenti; le curve calorimetriche ottenute per le scansioni successive effettuate, sono riportate nelle Figure 3.5-3.6. La curva r è stata ottenuta dall'analisi delle vescicole preparate in presenza della frazione molare 0,09 dei composti, e rappresenta la massima interazione che si può ottenere fra il composto e lo strato lipidico.

Per quanto riguarda gli esperimenti effettuati con gli MLV (Figura 3.5), al crescere del tempo di incubazione, per i composti LNA e DHA il picco di pretransizione resta visibile fino alla nona scansione, ed il picco principale non subisce evidenti modifiche. Invece, per i composti DPA ed EPA il picco di pretransizione diventa via via più piccolo fino a scomparire; il picco di transizione principale non subisce grosse variazioni. Per tutti i composti presi in esame la curva di riferimento non viene raggiunta. Questo risultato si spiega con la bassa solubilità dei composti in acqua, a causa della quale si ha una ridotta capacità di migrazione dal mezzo acquoso verso la superficie degli MLV, e così l'assorbimento da parte del bilayer fosfolipidico non avviene. Dalle curve della cinetica di permeazione effettuata con i LUV riportate in Figura 3.6, si può dedurre che la presenza degli acidi grassi causa, al crescere del tempo di incubazione, un allargamento del picco ed uno spostamento verso valori più bassi di temperatura di transizione, avvicinandosi alla curva di riferimento.

Nella Figura 3.7 è riportata in grafico la variazione della temperatura di transizione, come $\Delta T/T_m^0$, dei LUV lasciati in contatto con i quattro acidi grassi rispetto alle scansioni calorimetriche ottenute a tempi d'incubazione crescenti. Il valore r rappresenta la temperatura di transizione delle vescicole preparate in presenza dei composti alla frazione molare 0,09. Si può osservare un decremento della T_m , mentre per gli MLV la diminuzione della temperatura è molto piccola (dati non riportati), in presenza dei LUV si ha un decremento graduale ciò sta a significare che i composti vengono assorbiti dai liposomi. Ciò si verifica grazie alla maggiore superficie esposta, per cui il processo di trasferimento attraverso il mezzo, e di permeazione nel layer lipidico viene favorito. Maggiore è la lunghezza dell'acido grasso maggiore è la capacità di penetrare nei LUV.

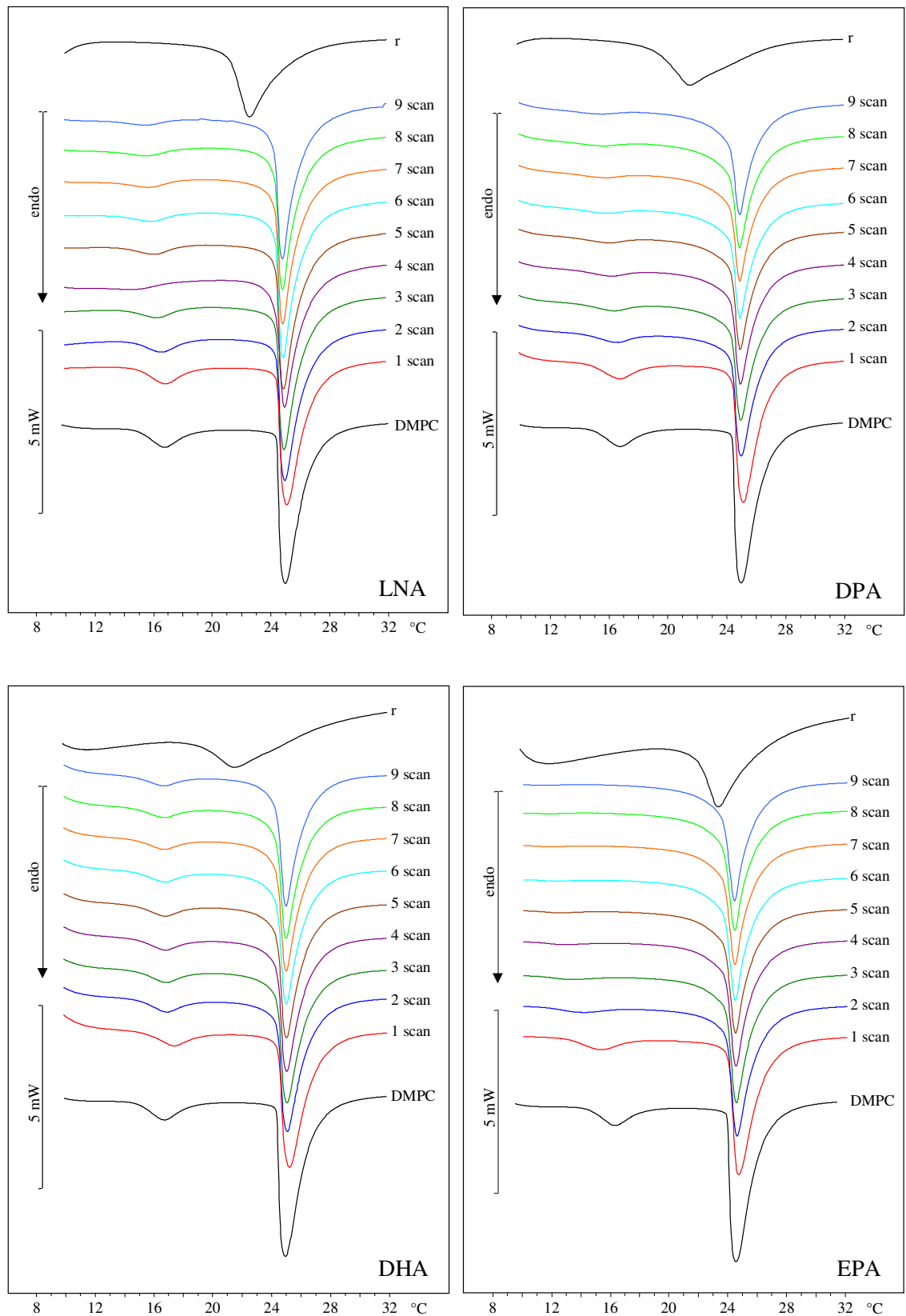


Figura 3.5. Curve calorimetriche in riscaldamento, degli MLV di DMPC lasciati in contatto con la frazione molare 0,09 degli acidi grassi presi in esame a crescenti tempi di incubazione. Le curve r appartengono agli MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 dei composti.

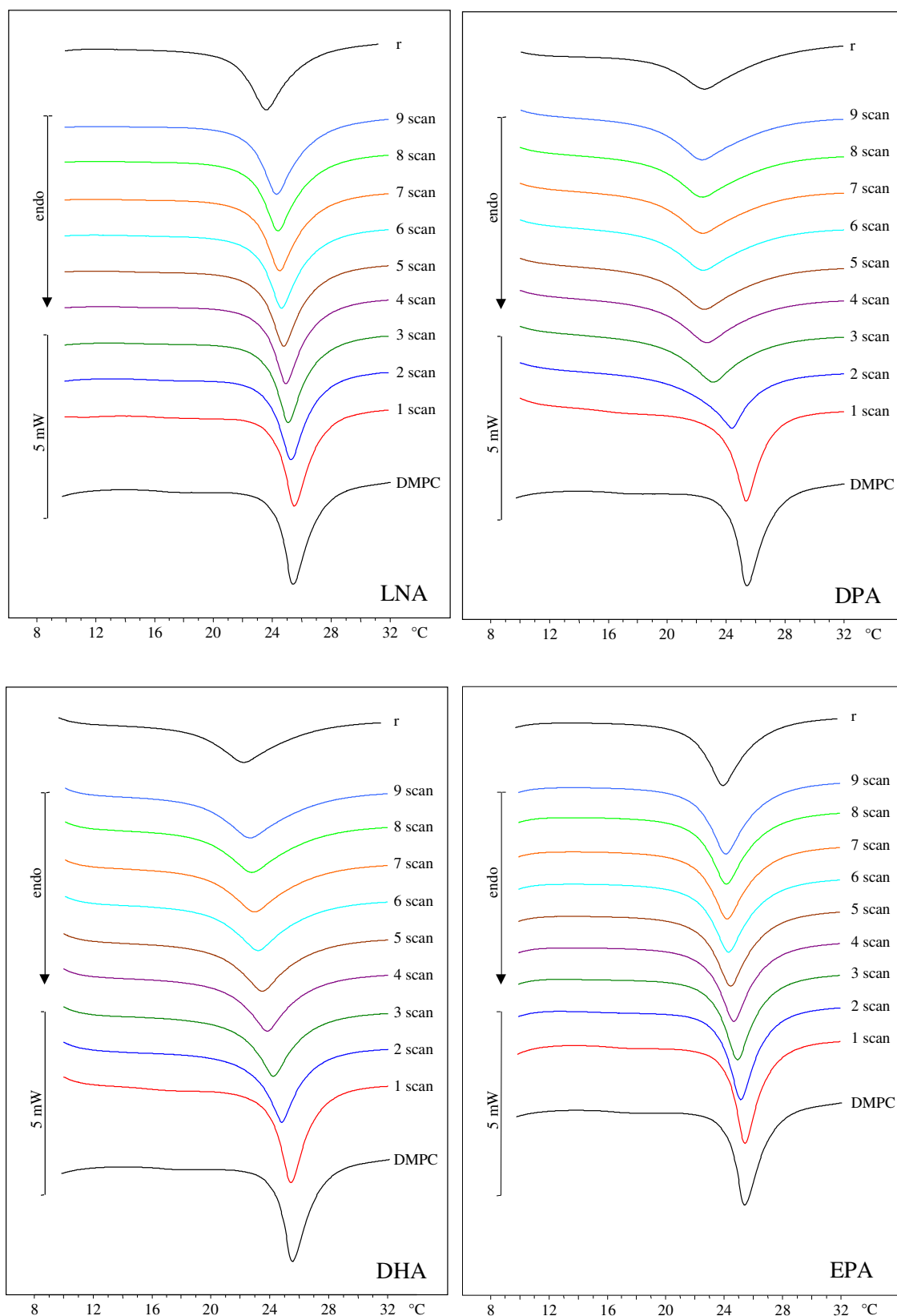


Figura 3.6. Curve calorimetriche in riscaldamento, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con la frazione molare 0,09 degli acidi grassi presi in esame a crescenti tempi di incubazione. Le curve r appartengono ai LUV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 dei composti.

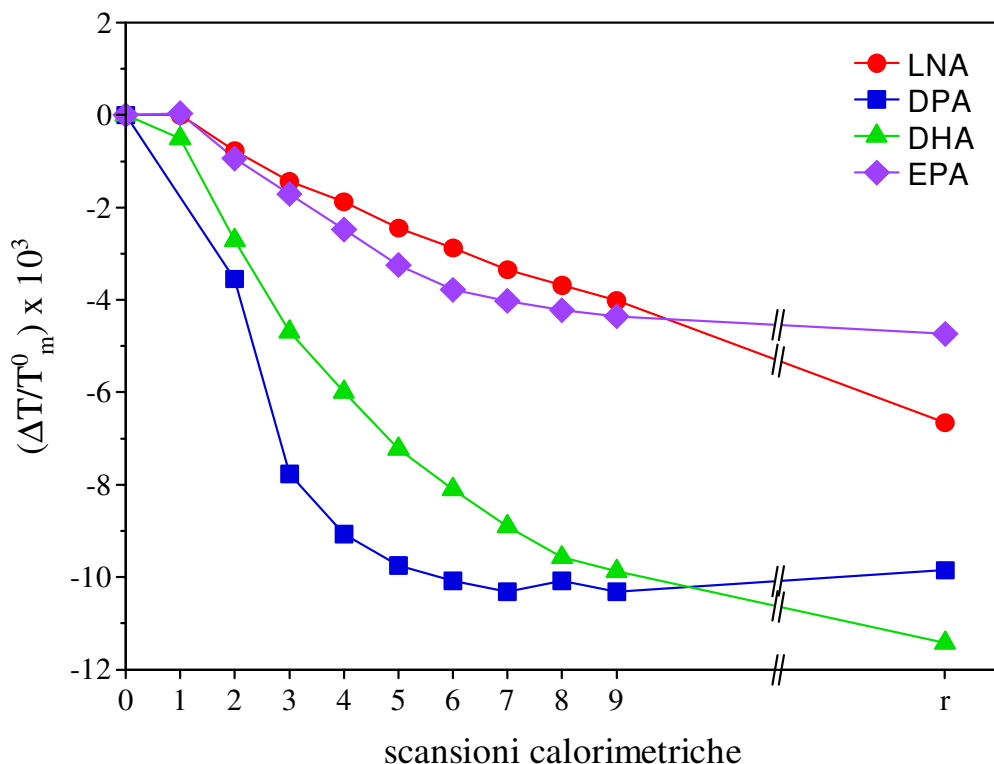


Figura 3.7. Variazione della temperatura di transizione, espressa come $\Delta T/T_m^0$, dei LUV di DMPC lasciati in contatto con la frazione molare 0,09 di composto, in funzione del tempo d'incubazione. Il valore r rappresenta la variazione della temperatura di transizione dei LUV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 di composto e che può essere considerata la massima interazione tra il composto e gli MLV.

3.6.3. Cinetiche di trasferimento transmembrana

Le curve calorimetriche ottenute dalle cinetiche di trasferimento sono riportate in Figura 3.8, esse sono state comparate con quelle dei due campioni messi a contatto (MLV carichi: $X = 0,12$ e MLV vuoti: DMPC), e con la curva r ottenuta dall'analisi degli MLV preparati in presenza della frazione molare 0,06 dei composti, infatti, se il composto riuscisse a migrare completamente dagli MLV pieni a quelli vuoti la concentrazione di equilibrio che si dovrebbe raggiungere alla fine del processo è pari alla frazione molare 0,06. In tutti i casi la curva calorimetrica relativa alla prima scansione è caratterizzata da tre segnali calorimetrici: il picco di pretransizione appena visibile, una spalla più o meno evidente, in base al composto preso in considerazione, relativa agli MLV pieni, ed un picco principale a circa $24,5\text{ }^\circ\text{C}$ relativo alla presenza degli MLV vuoti. Nelle scansioni successive, a tempi crescenti di incubazione, il picco di pretransizione scompare completamente, mentre la spalla ed il picco principale tendono ad unificarsi in un unico picco che si sposta verso temperature più basse.

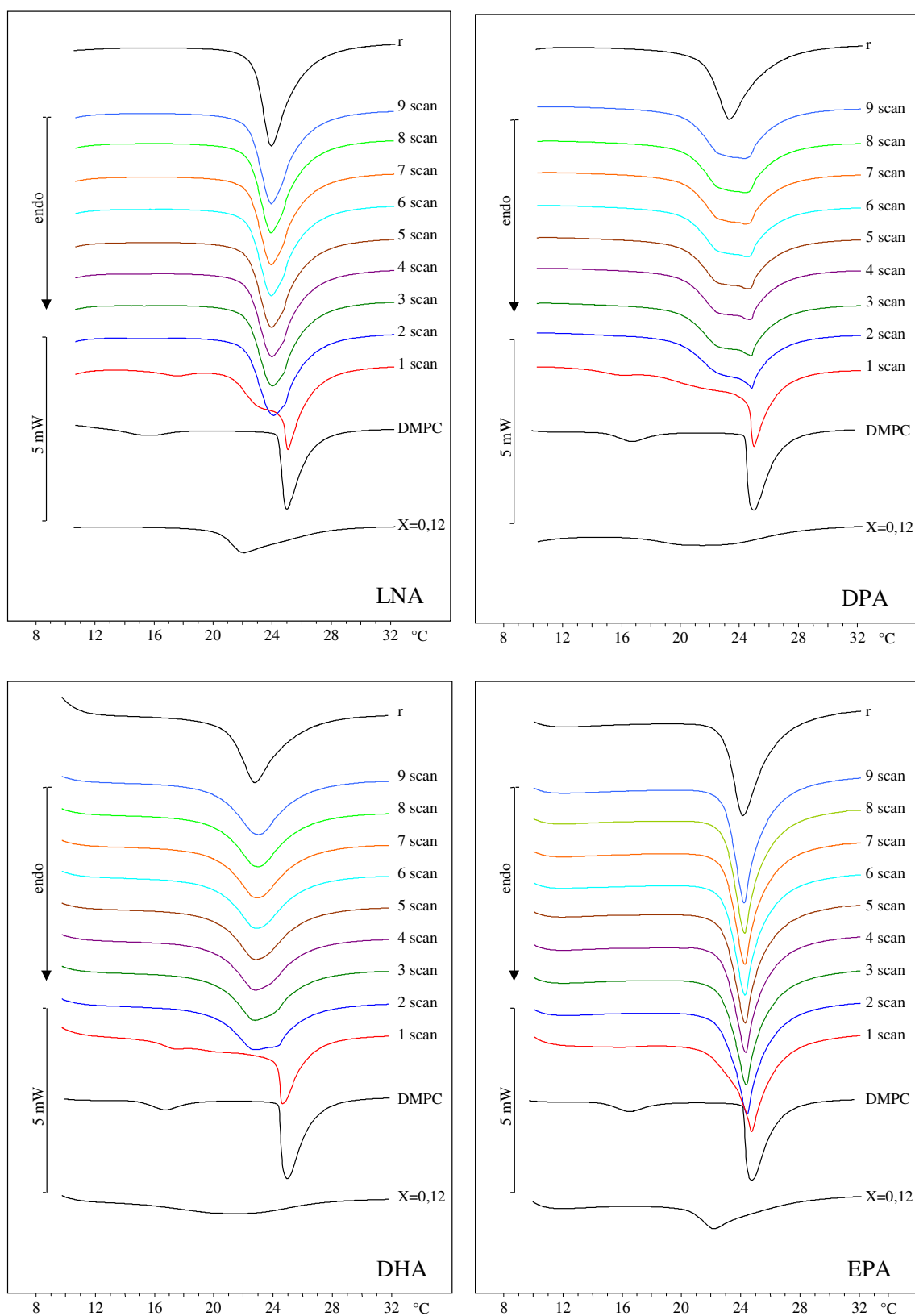


Figura 3.7. Curve calorimetriche in riscaldamento, degli MLV di DMPC lasciati in contatto con quantità equimolare di MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,12 dei composti. La curva r appartiene agli MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,06 dei composti.

3.7. CONCLUSIONI

Dallo studio dell'interazione di acidi grassi insaturi, caratterizzati da catene di diversa lunghezza, ed MLV di DMPC, è stato dimostrato, dall'effetto causato da quantità crescenti dei composti sui parametri termotropici (riduzione della temperatura di transizione, e dell'entalpia) che essi interagiscono notevolmente con i modelli di biomembrana. Inoltre, dagli esperimenti di cinetica, effettuati per studiare il ruolo svolto dal mezzo nell'assorbimento del composto da parte dei modelli di biomembrana, è stato evidenziato che un mezzo acquoso ostacola l'assorbimento degli acidi grassi, probabilmente a causa della loro bassa solubilità in acqua, mentre quando i composti vengono trasportati da un mezzo lipofilo viene facilmente assorbito dalle biomembrane modello, soprattutto nel caso in cui vengono usati come carrier liposomi unilamellari, essi infatti espongono una superficie maggiore facilitando il passaggio dei composti alle vescicole vuote.

CAPITOLO 4

Analisi di prodrug lipofili di farmaci ottenuti per coniugazione con lo Squalene: studi di Calorimetria a Scansione Differenziale e Langmuir-Blodgett.

Come detto nella Premessa, alcuni farmaci, somministrati attraverso le forme farmaceutiche convenzionali, presentano diversi inconvenienti, tra cui una durata d'azione del principio attivo troppo breve con conseguenti frequenti somministrazioni che possono dar vita a fenomeni di accumulo e conseguente tossicità. Spesso sono necessarie dosi elevate a causa di una scarsa specificità d'organo ed a causa delle proprietà chimico-fisiche sfavorevoli del farmaco, come un'eccessiva o insufficiente solubilità in acqua che ne limita la biodisponibilità. Un approccio possibile per ovviare a questi problemi è la sintesi di *prodrug lipofili*, che hanno la duplice funzione di migliorare le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco, rendendolo maggiormente adatto all'inserimento in un sistema lipidico, e di fornire una protezione chimica del gruppo funzionale.

La nostra attenzione si è concentrata su tre diversi farmaci, con problemi di assorbimento e biodisponibilità, come l'Aciclovir (ACV), la Citosina Arabinoside (AraC) che, inoltre, subisce un rapido metabolismo a livello epatico essendo rapidamente deaminato con formazione del metabolita inattivo arabinofuranosiluracile; ed il Paclitaxel (PTX).

Per ovviare a questi inconvenienti, i farmaci presi in esame sono stati coniugati con l'acido (4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentametil-4,8,12,16,20-docosapentaenoico (SqualeneCOOH) per ottenere i prodrug lipofili, ACV-Squalene, AraC-Squalene e PTX-Squalene. Lo SqualeneCOOH può essere sintetizzato a partire dallo Squalene, un idrocarburo aciclico a 30 atomi di carbonio, contenente 6 unità isopreniche. Esso si presenta sotto forma di un liquido giallo chiaro e oleoso, dall'odore debole e gradevole, praticamente insolubile in acqua (*Van Tamelen E.E., 1968*), e nella sua struttura (Figura 4.1) presenta dei doppi legami non coniugati equivalenti dal punto di vista chimico e sterico; il suo ruolo d'elezione è quello di antiossidante naturale.

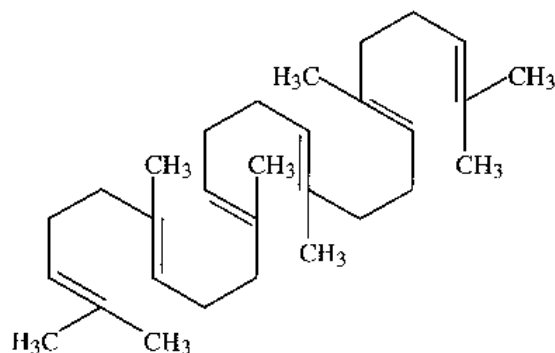


Figura 4.1. Formula di struttura dello Squalene.

In particolare sono stati studiati gli effetti esercitati dai farmaci liberi, dai rispettivi prodrug e dai loro precursori Squalene e SqualeneCOOH sul comportamento termotropico di vescicole multilamellari (MLV) di 1,2-Dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DMPC) per ottenere informazioni biomimetiche sulla lipofilia e sulla solubilità di queste molecole nei lipidi, tutti fattori che modulano la loro interazione con la membrana cellulare e la loro penetrazione nella membrana stessa.

Inoltre, per valutare la capacità di essere trasportati da un mezzo lipofilo, di superare uno strato acquoso ed interagire con i layers lipidici per essere da loro assorbiti, è stato studiato il comportamento dei liposomi lasciati, a tempi crescenti, a contatto con liposomi di DMPC in precedenza caricati con i diversi composti (cinetica di trasferimento).

Queste interazioni possono essere studiate mediante misure di calorimetria a scansione differenziale che, come già detto, è una tecnica ampiamente impiegata per investigare gli effetti esercitati da composti biologicamente attivi sul doppio strato fosfolipidico e per la caratterizzazione di prodrug lipofili (*Trombetta D. et al., 2005; Castelli F. et al., 2006a, 2006b; Castelli F. et al., 2007a, 2007b; Sarpietro M.G. et al., 2007*).

Per ottenere informazioni complementari sul tipo d'interazione tra le molecole investigate e i fosfolipidi impiegati sono state eseguite anche misure di tensione superficiale con la tecnica di Lagmuir-Blodgett (LB).

4.1 L'Aciclovir

L'Aciclovir (ACV), (Figura 4.2), è un analogo nucleosidico purinico di sintesi, derivato dalla deossiguanidina, è un principio attivo con potente attività antivirale contro l'Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1), di tipo 2 (HSV-2), l'Herpes Zoster, il virus di Epstein Barr (EBV) ed il Citomegalovirus (*Elion G.B. et al., 1977; Balfour H.H. et al., 1989; Prentice H.G. et al., 1994*).

Il farmaco combina gli effetti inibitori sul virus dell'epatite B con una bassa tossicità verso le cellule di mammifero (*Haynes P. et al., 1996*). Vari lavori scientifici indicano che l'Aciclovir ha azione uguale o superiore a quella di altri antivirali, più bassa tossicità, elevata selettività e minori effetti collaterali (*Tu J. et al., 2001*) per cui il suo impiego ha segnato l'inizio di una nuova era nella terapia delle infezioni virali.

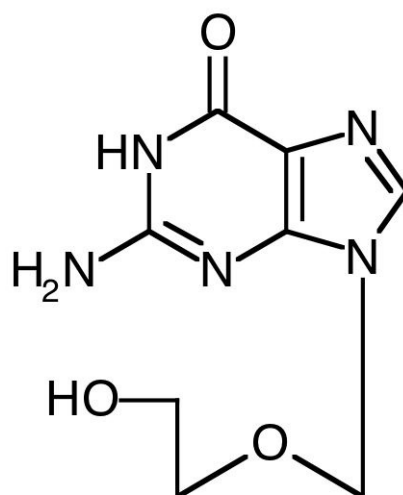


Figura 4.2. Formula di struttura dell'Aciclovir.

Il principio attivo si presenta come una polvere bianca cristallina con peso molecolare di 225,2 e formula bruta C₈H₁₁N₅O₃ esso risulta essere scarsamente solubile in acqua a causa della presenza nella struttura di due anelli condensati e soprattutto di una catena idrocarburica legata all'azoto in posizione nove dell'anello biciclico.

L'alta attività e selettività dell'Aciclovir è dovuta all'iniziale attivazione del farmaco a monofosfato dalla timidina chinasi codificata dai virus erpetici (*Fyfe J.A. et al., 1978*), ciò avviene all'interno delle cellule infette. La fosforilazione avviene molto più rapidamente rispetto a quanto avviene nelle cellule umane sane perché l'Aciclovir è

un substrato poco sensibile alla timidina chinasi delle cellule umane sane. In seguito, l'Aciclovir monofosfato è convertito nella forma bifosfatata ed infine trifosfatata dalla guanosina monofosfato chinasi, enzima normalmente presente nella cellula umana (Figura 4.3). La triplice fosforilazione avviene sul gruppo ossidrilico della molecola la cui presenza, dunque è fondamentale affinché il principio attivo espliciti la sua attività. L'Aciclovir trifosfato blocca l'azione dell'enzima DNA polimerasi virale tramite la formazione di un complesso irreversibile con la catena di DNA virale nascente (*St. Clair M.H. et al., 1980*) a concentrazioni molto inferiori di quanto non avvenga per l'enzima analogo presente nelle cellule umane.

Inoltre, l'Aciclovir in forma monofosforilata può inserirsi nella catena del DNA virale in crescita causandone la terminazione precoce a causa della mancanza del gruppo ossidrilico in posizione 3' (*Katzung G.B., 1997; Mycek M.J., et al., 2000*).

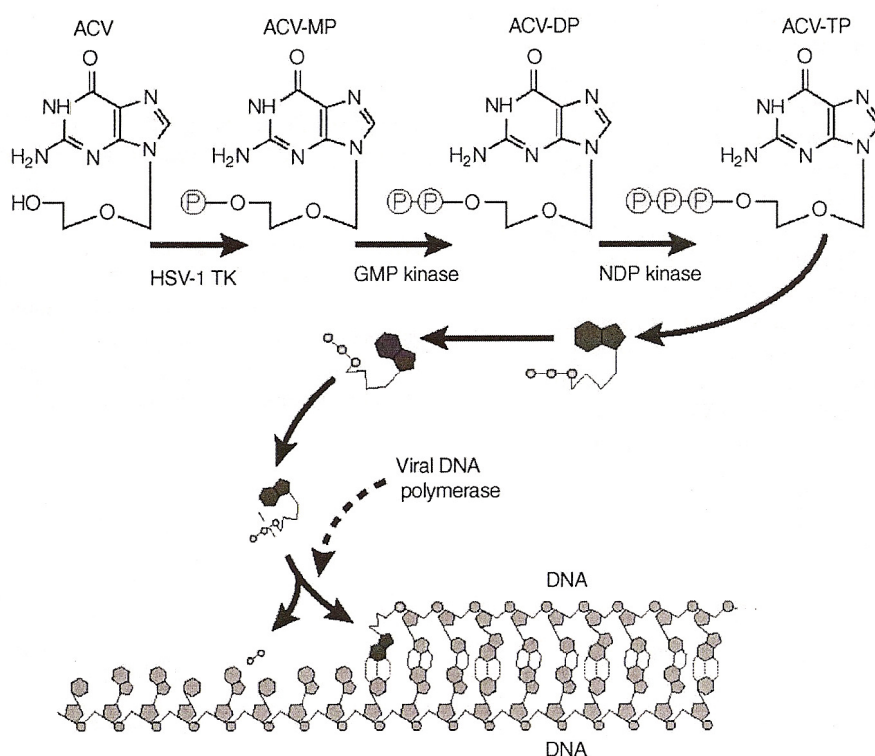


Figura 4.3. Schema del metabolismo e del meccanismo d'azione dell'ACV.

L'Aciclovir esiste in formulazioni atte alla somministrazione per via orale (compresse, sospensione orale, granulato), endovenosa e all'uso topico. Il farmaco ha breve tempo di emivita (2-3 ore) per cui deve essere usato 5-6 volte al giorno e ciò determina una bassa compliance da parte del paziente. La somministrazione va

continuata per 5 giorni; tuttavia la durata può essere modificata in base alle condizioni del paziente ed alla risposta terapeutica.

L'effetto inadeguato della crema è dovuto parzialmente alle povere proprietà chimico-fisiche del composto in termini di assorbimento/trasporto e parzialmente alla formulazione (*Freeman D.J. et al., 1986; Mcadows K.C. and Dressman J.B., 1990*).

Il farmaco viene trasportato nel sangue scarsamente legato alle proteine plasmatiche (9-33 %) e si distribuisce bene nell'organismo raggiungendo concentrazioni tissutali pari al 50-100 % di quella plasmatica; infine l'Aciclovir viene escreto per via renale in forma quasi immodificata.

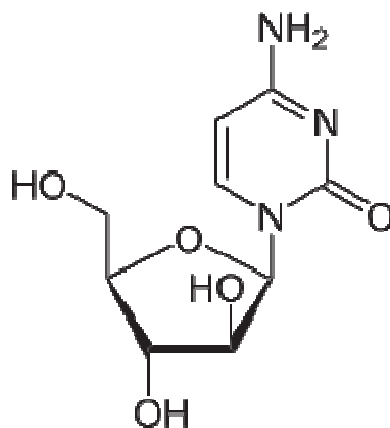
L'unico metabolita dell'Aciclovir è la 9-carbossimetossimetilguanina (*Katzung G.B., 1997; Mycek M.J. et al., 2000*), esso corrisponde circa al 10-15 % della quantità escreta nelle urine (*Hanes J.W. et al., 2007*).

Effetti avversi dell'Aciclovir possono essere nausea, vomito, mal di testa, affaticamento. Raramente possono manifestarsi reazioni allergiche, angioedema e disturbi neurologici. L'applicazione topica dell'Aciclovir può causare un temporaneo stato d'irritazione locale.

L'Aciclovir ha una solubilità in acqua di 1,5 mg/ml a 22 °C e coefficiente di partizione tra ottanolo e tampone fosfato 0,02 M a pH 7,4 (22 °C) pari a 0,03 (*O'Brain J.J. and Campoli-Richards D.M., 1989*). A 37 °C la massima solubilità in acqua è 2,5 mg/ml. L'Aciclovir inoltre è un principio attivo poco solubile in etanolo, mentre la sua solubilità aumenta in dimetilsolfossido e nelle soluzioni diluite alcaline o acide. L'Aciclovir presenta dunque uno scarso assorbimento e una biodisponibilità del 15-20 %, motivi per cui è stato sintetizzato e studiato un prodrug lipofilo, che possa favorire l'assorbimento e il trasporto del farmaco stesso.

4.2. La Citosina Arabinoside

La Citosina Arabinoside, o Citarabina (AraC), è un agente chemioterapico utilizzato principalmente nel trattamento delle neoplasie ematologiche come le leucemie acute mieloidi e linfoidi e i linfomi non-Hodgkin.



4-amino-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-diidrossi-5-(idrossimetil) oxolan-2-il] pirimidin-2-one.

L'AraC è un farmaco appartenente alla classe degli antimetaboliti, è un analogo strutturale della deossicitidina che differisce dai nucleotidi pirimidinici fisiologici per la presenza di un gruppo β -idrossilico in posizione 2' del ribosio (*Chabner B. and Longo D.L., 1982*). Da studi recenti si evince che l'AraC, in combinazione con altri agenti, come il desametasone, è efficace nel trattamento della Leucemia Linfatica Acuta (ALL) refrattaria, ma l'aggiunta all'AraC di altri agenti non mostra ottimi risultati nell'ALL adulta. Si pensa dunque che questa variabilità nella risposta sia legata ad una eterogeneità immunologica nell'ALL (*Nishimori H. et al., 2009*).

Il pre-requisito per la morte cellulare mediata dall'AraC è il trasporto di questo nucleoside dentro la cellula e la sua conversione in 5' trifosfato AraC, detta AraCTP. L'AraCTP è considerata la forma attiva del farmaco ed è in grado di inibire la DNA polimerasi fungendo da antimetabolita. È stato dimostrato che l'AraC nei mieloblasti (elementi cellulari primi precursori dei granulociti, caratterizzati da un diametro di circa 10 μm e ricchi in ribosomi) può essere convertita in AraCTP, mentre scarsi risultati di conversione sono stati ottenuti nei linfoblasti. Così si è ipotizzata una resistenza all'AraC nei casi di ALL e si pensa che la causa sia una difficoltà di trasporto del farmaco attraverso la membrana (*Wiley J.S. et al., 1985*).

L'AraC è un profarmaco che per esplicare le proprie funzioni citotossiche necessita di alcune trasformazioni che avvengono a livello intracellulare. Iniettando per via venosa una dose standard (100-200 mg/m^2 di superficie corporea), il farmaco viene deaminato nel torrente circolatorio ad opera della citidina deaminasi che lo trasforma nel suo metabolita inattivo uracil-arabinoside. A questi dosaggi la penetrazione dell'AraC all'interno della cellula avviene per diffusione facilitata: la rapidità di trasporto dipende dal numero di carriers nucleosidici per cellula (*Wiley J.S. et al., 1985*).

L'AraCTP, forma attiva del farmaco, inibisce la DNA polimerasi entrando in competizione con il substrato fisiologico trifosfato (dCTP). L'AraCTP viene inoltre incorporato direttamente nella sintesi di nuovo DNA provocandone un'aberrante duplicazione (*Chabner B. and Longo D.L., 1982*). L'effetto dell'AraC è proporzionale alla velocità di sintesi del DNA ed al tempo di esposizione al farmaco. Una volta che il metabolita attivo AraCTP si è formato, l'entità e la durata dell'inibizione della DNA polimerasi dipende dalla concentrazione cellulare di AraCTP nonché dalla quantità di AraCTP trattenuta all'interno della cellula (*Larizza P. and Riva C.M., 1985*).

4.3. Il Paclitaxel

Il Paclitaxel (PTX) è stato isolato, all'inizio del 1960, dalla corteccia del tasso (*Taxus brevifolia*). Esso è un diterpenoide pseudoalcaloide (Figura 4.4), è stato ampiamente studiato per via della sua significativa attività anticancro ed attualmente è prescritto per il trattamento di molte forme aggressive di tumore alle ovaie al polmone, al seno, così come nel trattamento del sarcoma di Kaposi correlato all'AIDS (*Spenser C.M. and Faulds D., 1994; Rowinsky E.K. and Donehover R.C., 1995*).

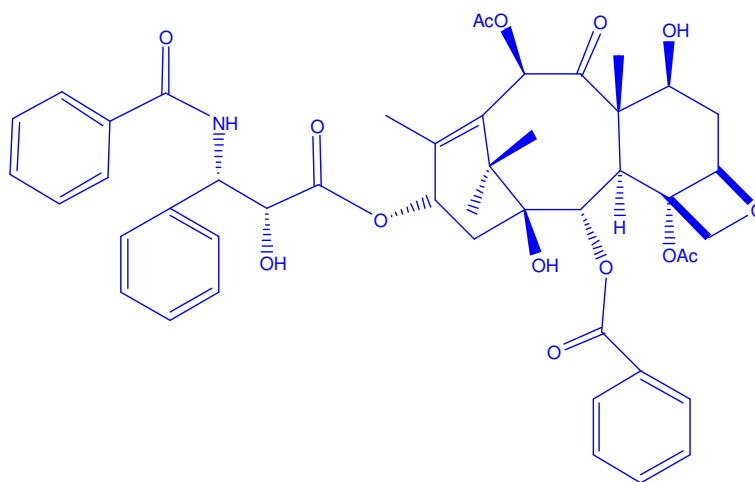


Figura 4.4. Formula di struttura del Paclitaxel.

Diversamente da altri alcaloidi, come quelli della *Vinca*, che agiscono inibendo la formazione dei microtubuli, il Paclitaxel promuove la polimerizzazione della tubulina (*Schiff P.B. et al., 1979; Rowinsky E.K. et al., 1990*). I microtubuli che si formano in presenza del Paclitaxel sono estremamente stabili e non funzionali, causando quindi la

morte della cellula poiché viene a mancare il normale dinamismo dei microtubuli, necessario per la divisione cellulare (Singla A.K. et al., 2002).

Il Paclitaxel è altamente lipofilo, insolubile in acqua e fonde intorno a 216-217 °C. La sua scomparsa dal circolo è bifasica (Wiernik P.H. et al., 1987b), il rapido decremento iniziale è dovuto alla distribuzione nel compartimento centrale ed alla eliminazione del farmaco, mentre la fase successiva è dovuta all'efflusso del farmaco dal compartimento periferico (Brown T. et al., 1991). Il tempo di emivita varia da 1,3-8,6 h (in media 5 h) (Rowinsky E.K. and Donehower R.C., 1993). Il farmaco subisce un'ampio metabolismo epatico mediato dal P-450 e meno del 10 % di farmaco viene eliminato nelle urine immodificato (Rizzo R. et al., 1990). Più del 90 % di farmaco si lega rapidamente alle proteine plasmatiche (Wiernik P.H. et al., 1987a). Ad oggi l'unica formulazione del Paclitaxel disponibile è formulata in un veicolo composto da una miscela di olio di ricino polietossilato (Cremophor EL) ed etanolo (1:1) diluito, per la somministrazione, con una normale soluzione salina o di destrosio. Tuttavia, tale veicolo è risultato responsabile di numerose reazioni di ipersensibilità (Trissel L.A. et al., 1998)

4.4. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) (purezza 99,9 %) è stata fornita dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). L'Aciclovir (purezza ≥ 99 %) è stato fornito dalla Sigma (Germania). L'AraC (purezza ≥ 99 %) è stata fornita dalla Sigma (Germania). Il Paclitaxel è stato fornito dalla INDENA (Milano, Italia). Lo Squalene (purezza >99 %) è stato fornito dalla VWR (Italia).

4.5. Sintesi dello SqualeneCOOH

Tale sintesi (Figura 4.5) è stata condotta a partire dallo Squalene che è stato bromurato a livello del doppio legame terminale dall'agente ossidante *N*-bromosuccinimide (NBS), a 0 °C in tetraidrofurano (THF), ottenendo la Squalene monobromidrina. La Squalene monobromidrina è stata a sua volta convertita dal K_2CO_3 , a temperatura ambiente in metanolo, in Squalene monoepossido. Quest'ultimo è stato trasformato dall'acido periodico ($HIO_4 \cdot 2H_2O$), a temperatura ambiente in etere etilico, in Squalene monoaldeide. Infine l'ossidazione dell'aldeide squalenica a SqualeneCOOH è stata ottenuta con l'acido cromico a 0 °C in etere etilico.

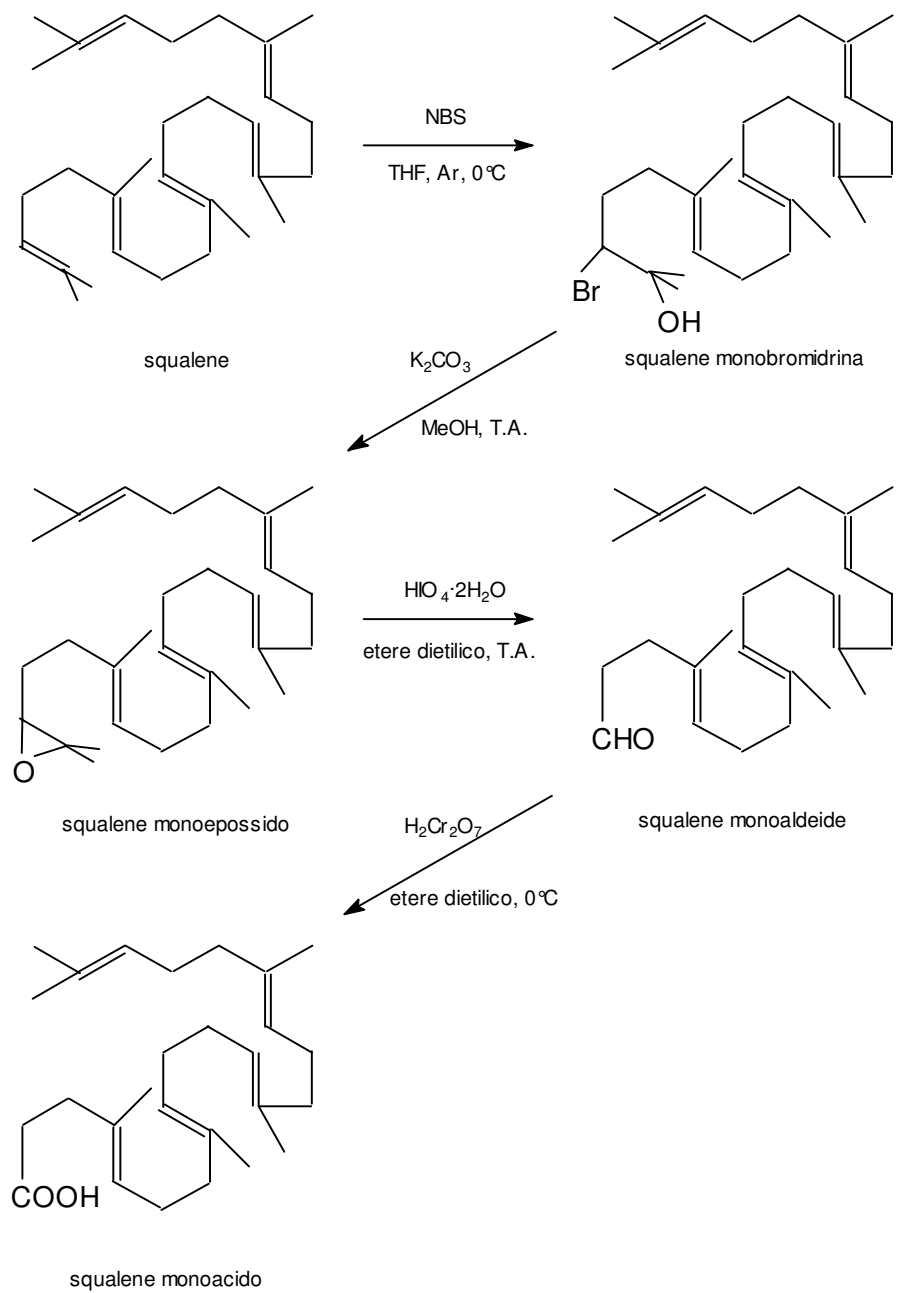


Figura 4.5. Schema di reazione per la sintesi dello Squalene monoacido.

4.6. Sintesi dell'Aciclovir-Squalene

Una volta terminata la sintesi dello SqualeneCOOH è stato possibile procedere alla sintesi dell'Aciclovir-Squalene (Figura 4.6).

La reazione è stata condotta a 70 °C. Lo SqualeneCOOH è stato solubilizzato in dimetilformammide (DMF) anidro, sotto flusso d'azoto; ad esso è stata aggiunta la dimetilaminopiridina (DMAP) e, successivamente, l'Aciclovir. Infine è stata aggiunta la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodimmide (EDC).

La reazione è stata fatta procedere a 70 °C fino a completa formazione dell'Aciclovir-Squalene, verificata tramite TLC su gel di silice.

Il grezzo di reazione è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice. I rapporti stechiometrici tra le sostanze sono 1:1 per quanto riguarda l'Aciclovir e lo SqualeneCOOH; fanno eccezione la EDC e la DMAP dove il rapporto stechiometrico con lo SqualeneCOOH è di 2:1. La reazione è stata condotta in ambiente anidro utilizzando il gas inerte azoto.

La stechiometria ed il tipo di solvente rivestono un ruolo fondamentale nella reazione, in quanto utilizzando questo metodo si ottiene una notevole reattività dell'Aciclovir nel formare il legame estere con lo SqualeneCOOH.

Dopo la purificazione eseguita mediante flash cromatografia, il prodotto è stato analizzato utilizzando l'¹H-NMR e la spettrometria di massa. In questo modo si è avuta la conferma della struttura della molecola desiderata. La resa di reazione dell'Aciclovir-Squalene è compresa tra il 40 ed il 50 %.

La sintesi è stata eseguita presso il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco dell'Università degli Studi di Torino dal gruppo di ricerca del Prof. M. Ceruti.

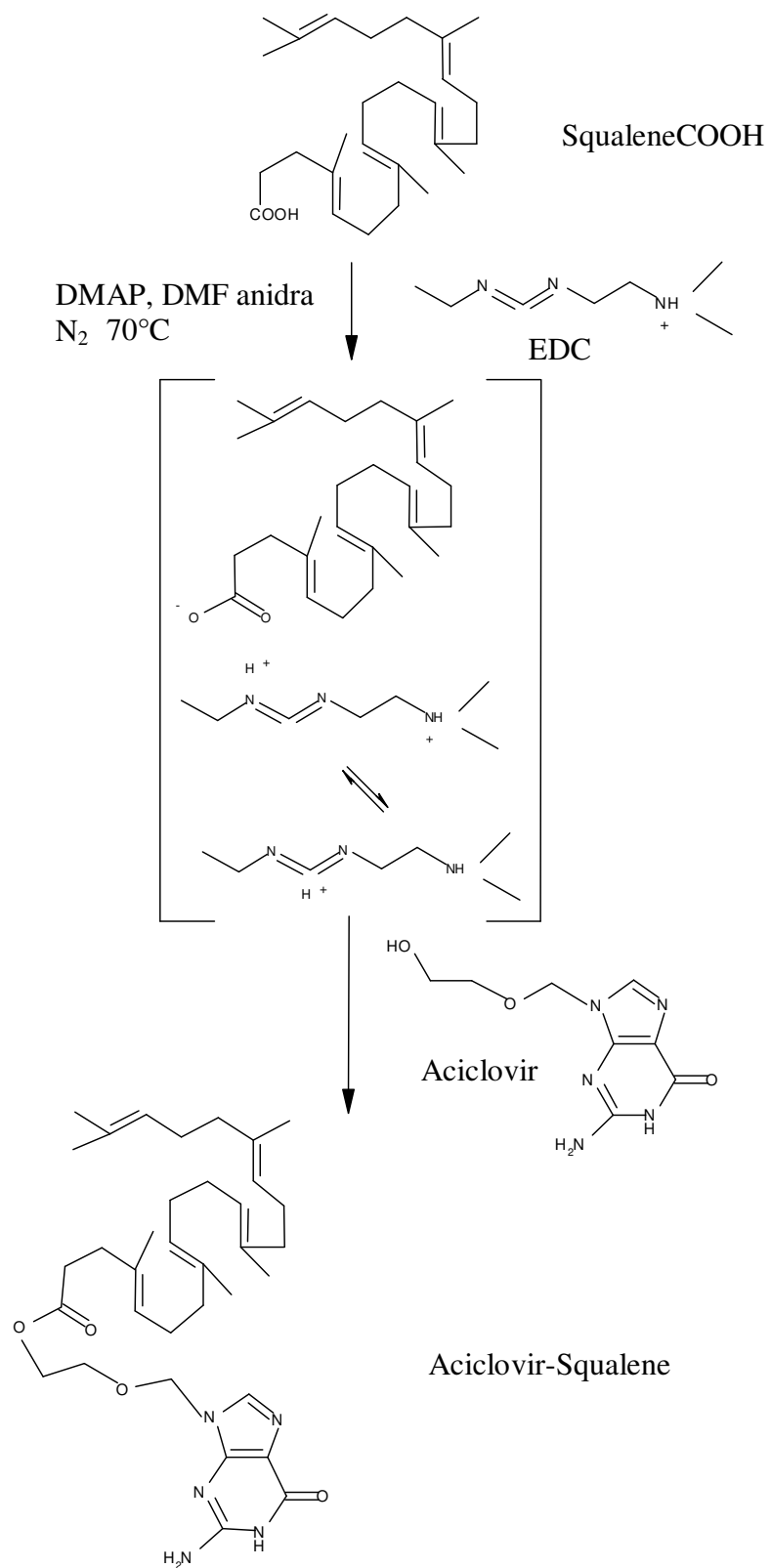


Figura 4.6. Schema di reazione per la sintesi dell' Aciclovir-Squalene.

4.7. Sintesi dell'AraC-Squalene

La sintesi del coniugato AraC-Squalene è stata ottenuta facendo reagire, in opportune condizioni, l'AraC e lo SqualeneCOOH (Figura 4.7). La 1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide (**1**), un intermedio della reazione di sintesi dello SqualeneCOOH descritta precedentemente, è stata sciolta in dietil-etero a 0 °C. Separatamente, a 0 °C e sotto agitazione, sono stati miscelati acido solforico, potassio dicromato ed acqua distillata per avere acido cromico. L'acido cromico è stato aggiunto a 0 °C alla soluzione di aldeide precedentemente preparata, lasciando reagire per 2 h a 0 °C sotto agitazione. La miscela di reazione è stata estratta con dietil-etero, lavata con una soluzione satura di cloruro di sodio (brina), portata a secco con sodio solfato anidro ed evaporata sotto vuoto. Il completamento della reazione è stato rivelato tramite TLC in etere di petrolio/dietil-etero/metanolo (70:23:7). Il prodotto è stato purificato tramite flash cromatografia con etere di petrolio e, in seguito, con etere di petrolio/dietil-etero (95:5) come eluenti per dare una resa del 35 % di 1,1',2-*tris-nor*-squalene acido (**2**), come un olio incolore.

Quindi l'1,1',2-*tris-nor*-squalene acido (**2**) è stato miscelato con tetraidrofurano (THF) anidro, sotto agitazione e con flusso d'azoto, quindi è stata aggiunta trietilammina in THF anidro e la miscela è stata raffreddata fino a 0 °C. In seguito è stato aggiunto cloroformiato di etile, sciolto in THF anidro, e la miscela è stata lasciata a 0 °C per 20 minuti, sotto agitazione, dopodiché è stata aggiunta l'AraC, sciolta in dimetilformammide (DMF) anidra calda, per ovviare alla sua bassa solubilità. La miscela di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente, e lasciata reagire per tre giorni, sotto agitazione e in atmosfera d'azoto. Il completamento della reazione è stato verificato tramite TLC in gel di silice con diclorometano/acetone (75:25) come eluente, e si è avuta una resa del 56 % di AraC-SQ (**3**) che si presenta come un olio viscoso ed incolore.

La sintesi è stata eseguita presso il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco dell'Università degli Studi di Torino dal gruppo di ricerca del Prof. M. Ceruti.

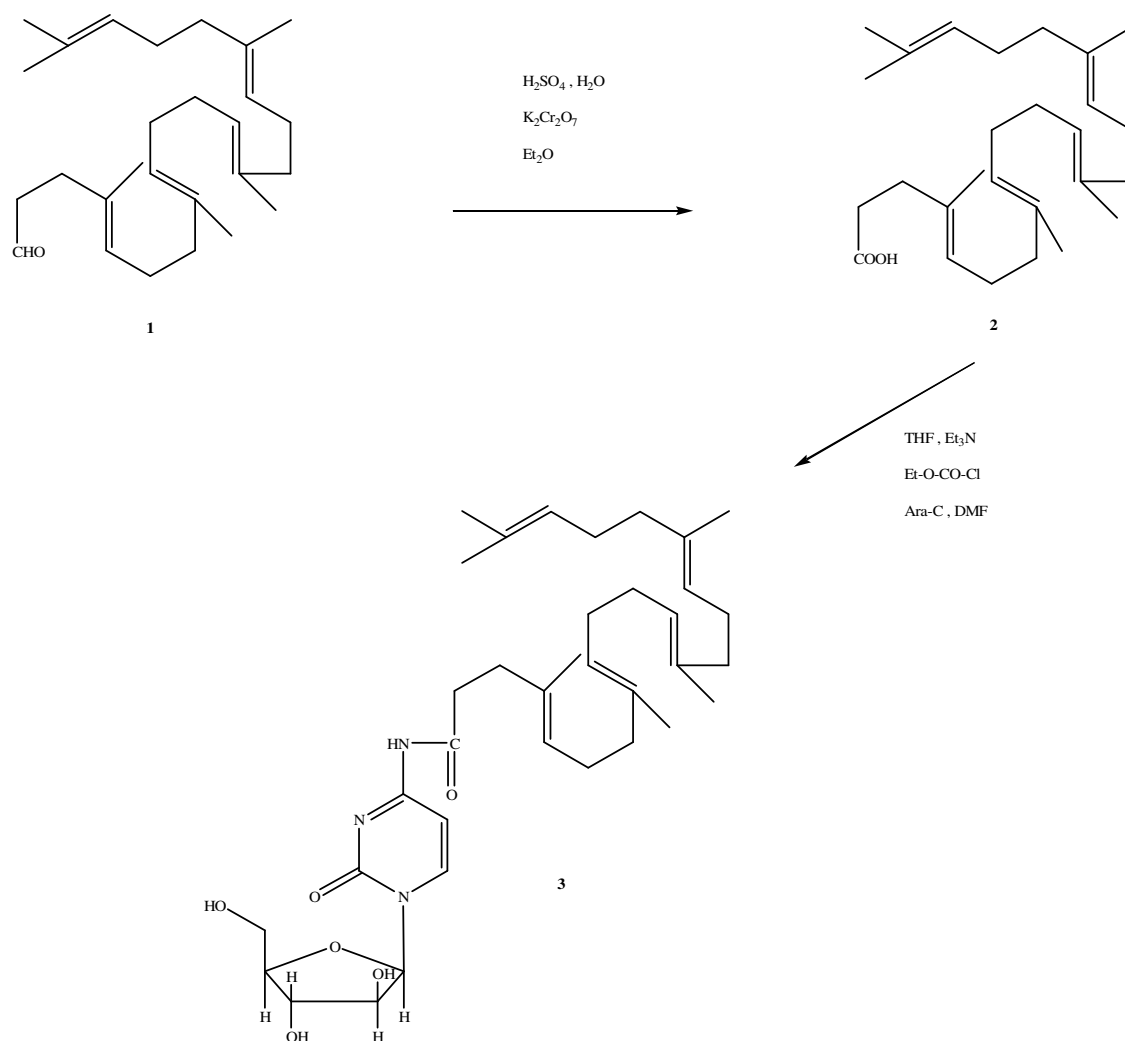


Figura 4.7. Sintesi dell'AraC-Squalene.

4.8. Sintesi del Paclitaxel-Squalene

Il Paclitaxel (1,2 g, 1,4 mmol), disciolto in 30 ml di diclorometano (DMC), è stato fatto reagire con EDAC (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide) (0,6 equivalenti), in presenza di DMAP (4-dimetilamino piridina) (0,2 equivalenti) e dell'acido 1,1',2-trisnorsqualenoico (0,6 equivalenti) precedentemente disciolto a temperatura ambiente in DCM. Dopo tre ore, la reazione è stata fermata con acqua ed il prodotto è stato estratto con una soluzione satura di cloruro di sodio. La miscela viene poi purificata con cromatografia su SiO_2 eluita con gradiente di DCM/etilacetato (da 95:5 a 80:20) per dare il Paclitaxel-Squalene puro, (resa del 65 %) (Figura 4.8).

La sintesi è stata eseguita presso il laboratorio del Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco dell'Università degli Studi di Torino, dal gruppo di ricerca del Prof. F. Dosio.

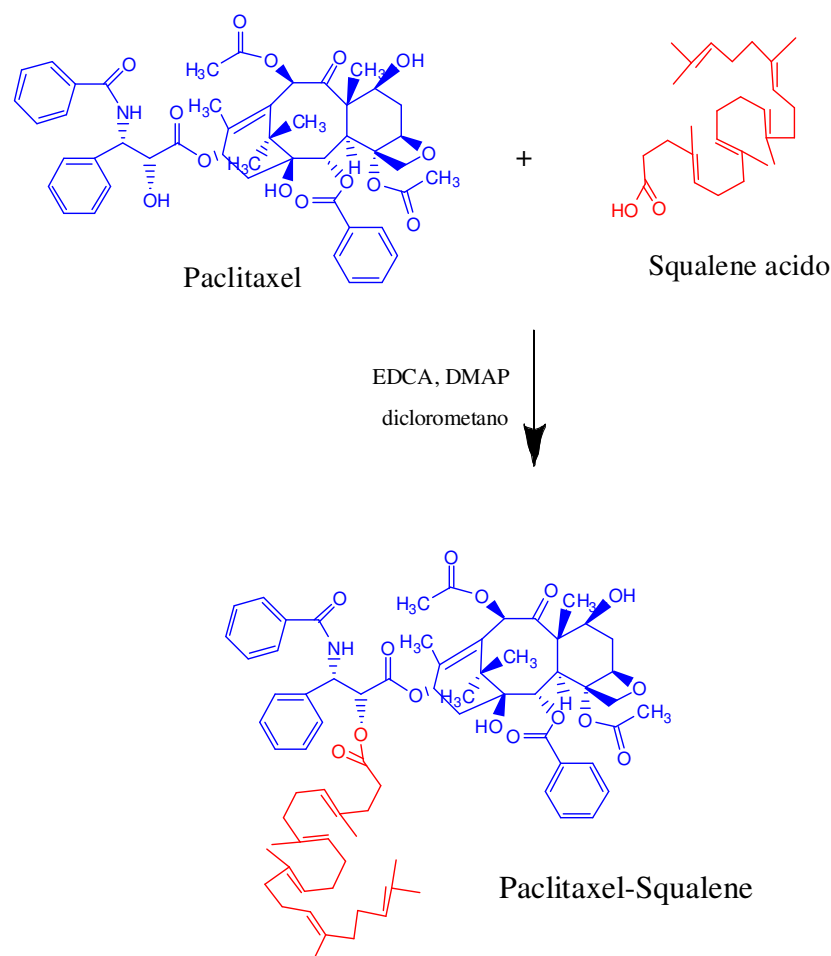


Figura 4.8. Sintesi del Paclitaxel-Squalene.

4.9. Interazione MLV DMPC/composti

Per questa ricerca sono state utilizzate vescicole multilamellari (MLV) di dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) preparate in assenza e in presenza di Squalene, SqualeneCOOH, ACV, AraC, PTX e dei prodrug Aciclovir-Squalene e AraC-Squalene e PTX-Squalene a differenti frazioni molarie (0,0; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12).

Per quanto riguarda l'Aciclovir, a causa della sua scarsa solubilità in cloroformio, si è seguita una procedura di preparazione particolare che consiste nelle seguenti fasi:

1. La DMPC è stata solubilizzata in cloroformio/metanolo (1:1 V:V);
2. Aliquote a concentrazione nota di DMPC (0,010325 mmoli) sono state poste in tubi da saggio;
3. Il solvente è stato allontanato sotto flusso di azoto;
4. I film fosfolipidici così ottenuti sono stati essiccati sotto vuoto;

5. L'Aciclovir è stato solubilizzato in Tris pH 7,4 e aggiunto ai film di DMPC in modo da avere la frazione molare desiderata;
6. I film sono stati posti a 37 °C per 1 minuto e agitati per 1 minuto, per 3 volte, quindi, lasciati a 37 °C per 60 minuti per ottenere la ripartizione fosfolipidi/fase acquosa.

Per tutti gli altri composti (Squalene, SqualeneCOOH, Aciclovir-Squalene, AraC, PTX, AraC-Squalene e PTX-Squalene) è stata seguita la procedura classica, miscelando la soluzione di DMPC in cloroformio:metanolo 1:1 con quella dei composti in esame in cloroformio, quindi sono stati ottenuti i film fosfolipidici con la stessa procedura descritta prima.

L'entità dell'interazione tra i composti ed i modelli di biomembrana può essere determinata attraverso le seguenti prove sperimentali: 120 µl di dispersione acquosa liposomiale preparata in assenza e in presenza dei composti considerati sono state posti in crogioli di alluminio da 160 µl. I crogioli sono stati chiusi ermeticamente e sottoposti ad una scansione in riscaldamento da 5 a 37 °C a 2 °C/min seguita da una scansione in raffreddamento da 37 a 5 °C a 4 °C/min; tale procedura è stata ripetuta tre volte. I valori di T_m che si ottengono (rispetto a quelli del fosfolipide puro) sono i parametri di riferimento per indicare l'effetto che una determinata frazione molare di composto causa sui liposomi di DMPC.

4.10. Cinetiche di trasferimento transmembrana

Questi esperimenti sono stati effettuati ponendo in contatto 60 µl di dispersione acquosa di MLV di DMPC pura (MLV senza composti incorporati, vuoti) e 60 µl di una sospensione equimolare di MLV di DMPC contenenti i composti in esame (MLV pieni) alla frazione molare 0,12, per tutti i composti ad eccezione del PTX e PTX-Squalene per i quali è stata scelta la frazione molare 0,06, in crogioli di alluminio da 160 µl. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a cicli calorimetrici consistenti nei tre step seguenti:

- 1) una scansione calorimetrica in riscaldamento da 5 a 37 °C (2 °C/min);
- 2) un periodo di incubazione isotermica per 60 minuti a 37 °C;
- 3) una fase di raffreddamento da 37 °C a 5 °C (4 °C/min) per poi poter ripetere il ciclo dal primo step (come nello Schema 3.1).

Lo scopo di questi esperimenti è stato quello di verificare l'eventuale capacità dei composti di migrare dagli MLV pieni a quelli vuoti per avere indicazioni sull'effetto

esercitato da un mezzo lipofilo su questo trasporto. Se i composti sono capaci di essere trasferiti dagli MLV pieni a quelli vuoti si avrà un flusso di composto che si arresterà allorché un equilibrio di concentrazione dei composti stessi sarà raggiunto (equivalente ad una frazione molare dimezzata rispetto a quella di partenza).

4.11. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)

Gli esperimenti sono stati effettuati in una vaschetta in Teflon accuratamente pulita. Come subfase è stato usato TRIS 5 mM a pH 7,4 in acqua ultrapura con resistività di 18.2 M Ω cm (ottenuta tramite un sistema Simplicity 185 Millipore).

Sono state preparate soluzioni equimolari di DMPC, Squalene, SqualeneCOOH, Aciclovir-Squalene, AraC ed AraC-Squalene, PTX e PTX-Paclitaxel in cloroformio e di Aciclovir in metanolo. Soluzioni di DMPC e dei composti sono state successivamente preparate in modo da ottenere per ogni composto le seguenti frazioni molari: 0,0; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0. Prima di depositare il campione, per essere certi dell'assenza di impurezze, la subfase è stata controllata due volte eseguendo delle compressioni ed accertando che i valori di pressione superficiale ottenuti non andassero oltre 0,10 mN/m. Mediante una siringa Hamilton, 30 μ l delle soluzioni dei componenti puri o delle soluzioni miste sono stati depositati, goccia a goccia, sulla subfase. Il volume di deposizione è stato tale da effettuare tutte le esperienze deponendo lo stesso numero di molecole sulla subfase. Si è lasciato riposare il monolayer per 15 minuti per permettere l'evaporazione del solvente. Quindi, il monolayer è stato compresso mediante le barriere alla velocità di 10 mm/min. Per assicurarsi della riproducibilità del lavoro l'esperienza è stata ripetuta per almeno 3 volte. Le misure sono state condotte alle temperature di 10 °C e 37 °C, in modo da monitorare il comportamento della DMPC sia a temperature più basse che più alte rispetto a quella di transizione di fase gel-cristallo liquido. Per ottenere la temperatura desiderata il sistema è stato collegato ad un bagno termostato.

4.12. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.12.1. Interazione MLV DMPC/composti

La Figura 4.9 mostra le curve calorimetriche dei liposomi di DMPC in assenza ed in presenza dei precursori, Squalene e SqualeneCOOH, a varie frazioni molari. Nel caso dello Squalene il picco principale non subisce spostamenti anche ad alte frazioni molari.

Il picco di pretransizione è sempre presente, ma subisce un lieve spostamento verso temperature più basse.

Nelle curve calorimetriche degli MLV di DMPC contenenti SqualeneCOOH a varie frazioni molari si può osservare che il picco principale si sposta verso temperature più basse, diventando sempre più largo con l'aumentare della frazione molare di SqualeneCOOH. Il picco di pretransizione scompare già alla più bassa frazione molare.

Nella Figura 4.10 sono mostrate le curve calorimetriche dei liposomi di DMPC preparati in presenza dei farmaci liberi (Aciclovir, AraC e Paclitaxel). L'ACV non determina sostanziali spostamenti del picco calorimetrico principale ed il picco di pretransizione è sempre presente. L'AraC determina un piccolo spostamento del picco calorimetrico principale a temperature più basse, il picco di pretransizione è sempre presente, benché, all'aumentare della frazione molare di AraC, tende a spostarsi a temperature più basse. Per quanto riguarda il Paclitaxel, la sua incorporazione all'interno degli MLV di DMPC causa la scomparsa del picco di pretransizione, ed il picco principale viene gradualmente spostato a temperatura più bassa e si allarga, fino alla frazione molare 0,06 ma ritorna ad essere netto ed a temperatura più elevata per le frazioni molari maggiori. Tuttavia quando la frazione molare di Paclitaxel è compresa tra 0,015-0,06 la transizione di fase si presenta come un sistema a due fasi, tale caratteristica del termogramma è dovuta ad una miscelazione non ideale che porta ad una distribuzione non omogenea del farmaco nel bilayer fosfolipidico ed alla formazione di zone più ricche di farmaco e quindi maggiormente perturbate, che danno il segnale a più bassa temperatura, mentre il segnale più netto a temperature più alte potrebbe rappresentare la transizione delle molecole di DMPC caratterizzate da una maggiore cooperatività per la presenza di una minore quantità di farmaco (*Lambros M.P. and Rahman Y.E., 2004*). Un picco di transizione slargato, in presenza di Paclitaxel, indica una destabilizzazione del bilayer fosfolipidico, indice dell'inserimento del farmaco all'interno del bilayer. Per frazioni molari di Paclitaxel più alte della 0,06 il farmaco non interagisce con gli MLV di DMPC probabilmente per l'incapacità di alte concentrazioni di farmaco di dissolversi. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Ali e collaboratori che hanno studiato l'interazione del Paclitaxel con la DMPC (*Ali S. et al., 2000*) e con quelli di Zhao e collaboratori che hanno studiato l'interazione del Paclitaxel con MLV di DPPC correlando gli effetti del farmaco sul comportamento termotropico del fosfolipide alla sua localizzazione nella zona più esterna del bilayer (la regione C1-C8 della catena acilica) (*Zhao L. et al., 2004*).

In Figura 4.11 sono riportate le curve calorimetriche dei liposomi di DMPC preparati in presenza di frazioni molari crescenti dei prodrug Aciclovir-Squalene, AraC-Squalene e PTX-Squalene. Nel caso dell'Aciclovir-Squalene è evidente che il picco calorimetrico principale subisce sostanziali cambiamenti quando la frazione molare di Aciclovir-Squalene presente nella dispersione acquosa degli MLV aumenta. Esso, infatti, si allarga e si sposta verso temperature più basse. Il picco di pretransizione scompare già alla frazione più bassa di Aciclovir-Squalene. In presenza di AraC-Squalene il picco calorimetrico principale subisce sostanziali cambiamenti allorché la frazione molare presente nei liposomi di DMPC aumenta. Esso, infatti, si allarga e si sposta verso temperature più basse. Il picco di pretransizione scompare già alla frazione molare più bassa di AraC-Squalene. Infine, il PTX-Squalene causa la riduzione del picco di pretransizione, lo spostamento del picco principale verso temperature più basse e contemporaneamente il suo allargamento. Inoltre, alla frazione molare 0,03 si ha la comparsa di una separazione di fase, dovuta ad una distribuzione non omogenea del pro-farmaco nel bilayer e quindi alla presenza di zone più ricche e più povere di Paclitaxel-Squalene.

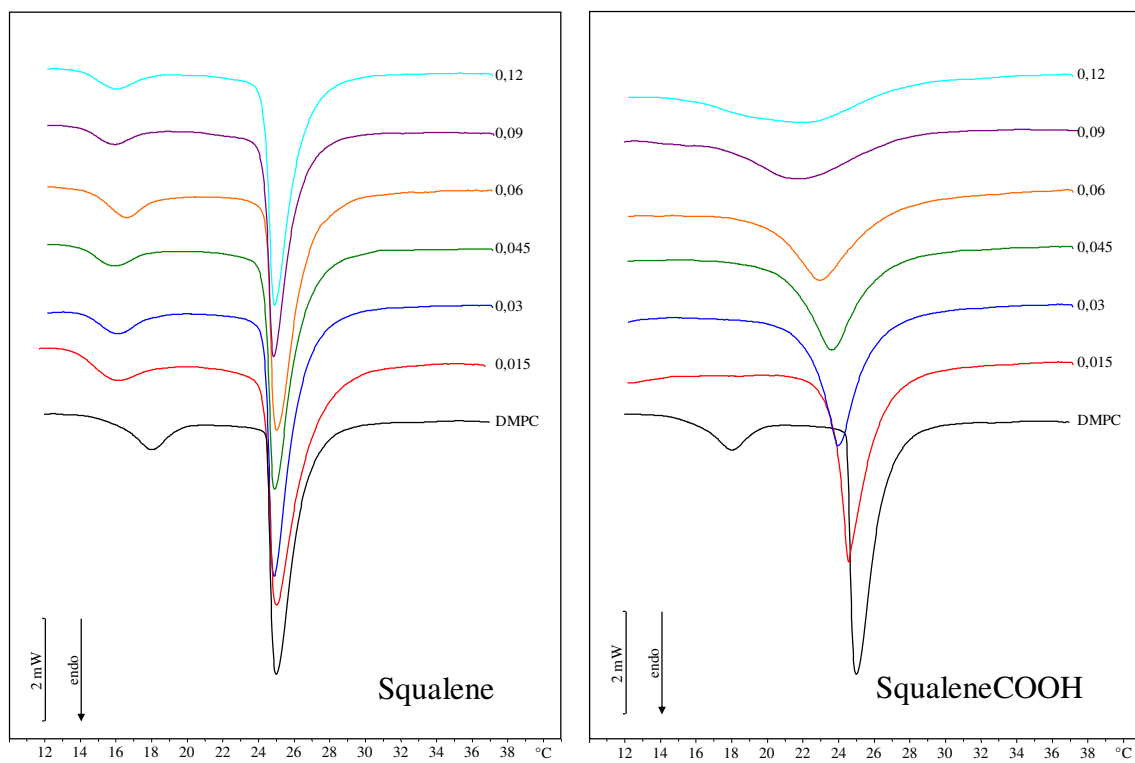


Figura 4.9. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in fase organica in presenza di Squalene e SqualeneCOOH a diverse frazioni molari.

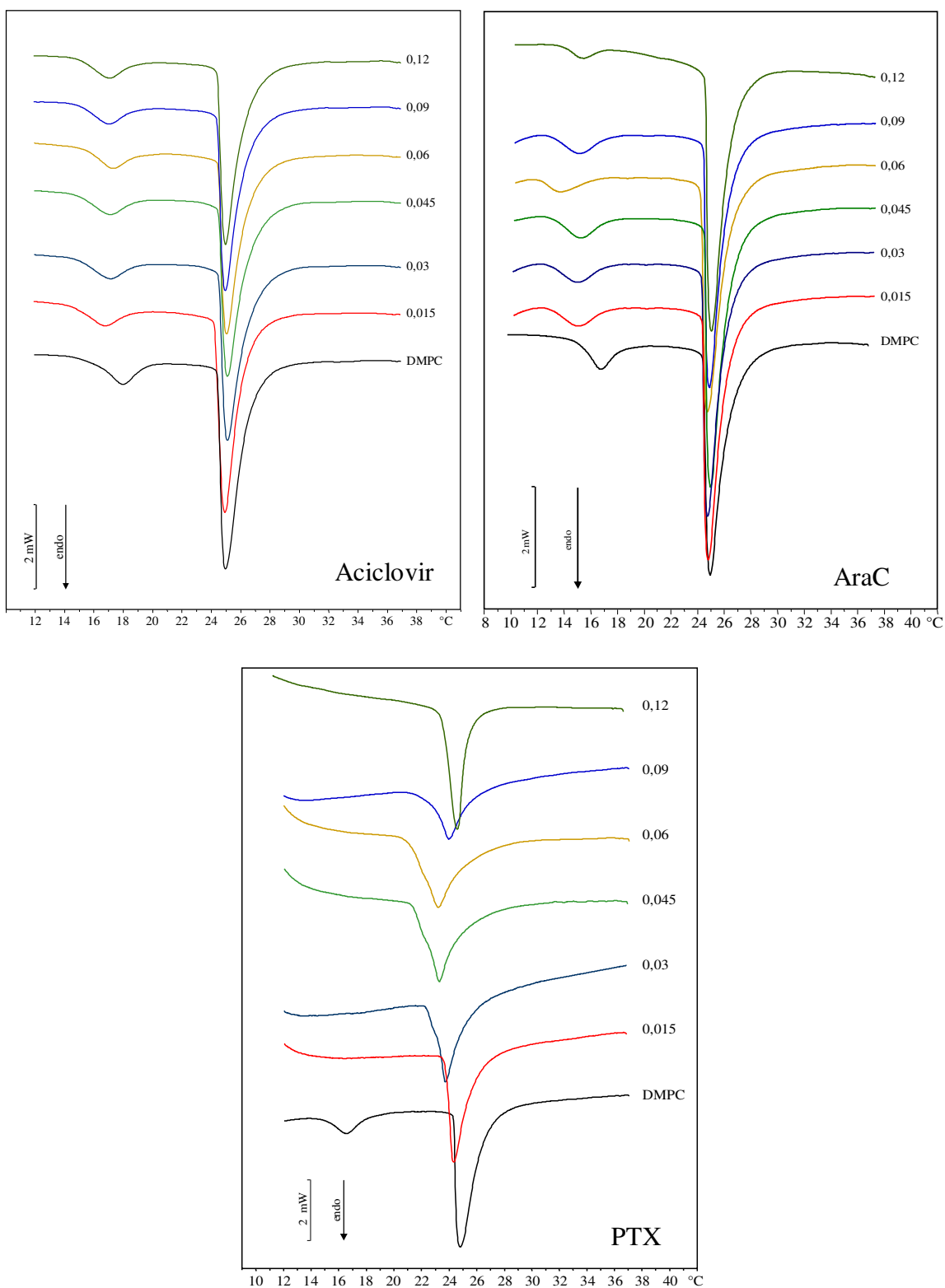


Figura 4.10. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in fase organica in presenza di Aciclovir, AraC e PTX a diverse frazioni molari.

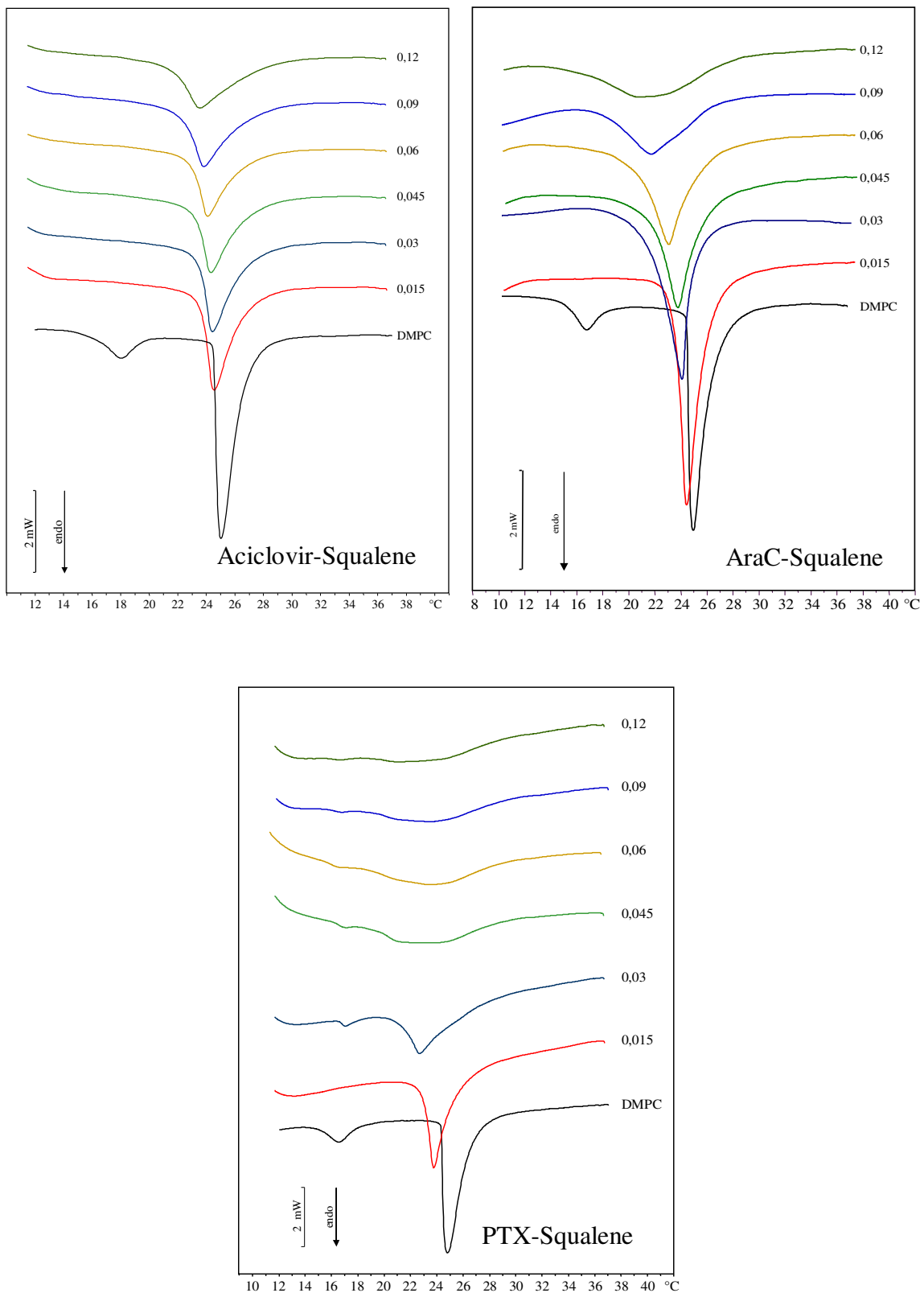


Figura 4.11. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in fase organica in presenza di Aciclovir-Squalene, AraC-Squalene e PTX-Squalene a diverse frazioni molari.

La Figura 4.12 mostra l'andamento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di Aciclovir, Squalene, SqualeneCOOH e Aciclovir-Squalene, riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura), in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV.

Gli effetti esercitati dall'Aciclovir e dallo Squalene sono molto bassi anche ad alte frazioni molari. Lo SqualeneCOOH e l'Aciclovir-Squalene, invece, tendono a deprimere la temperatura di transizione. La diminuzione della temperatura è proporzionale alla frazione molare di composto presente nei liposomi. Questi risultati indicano che l'Aciclovir e lo Squalene non sono in grado di causare variazioni significative dei parametri termotropici degli MLV di DMPC. Tale comportamento può essere spiegato considerando che i composti non sono in grado di integrarsi nel doppio strato lipidico: l'Aciclovir a causa del suo carattere idrofilico, si sistemerebbe prevalentemente nei compartimenti acquosi fra i doppi strati lipidici e nel core liposomiale; lo Squalene con il suo carattere altamente apolare potrebbe avere un'alta affinità con l'ambiente apolare delle code aciliche della DMPC, ma secondo studi condotti in precedenza (*White S.H., 1977*) la lunghezza di un idrocarburo è in stretta relazione con la sua solubilità nel doppio strato lipidico e una catena lineare di 21 atomi di carbonio dovrebbe essere totalmente immiscibile in un doppio strato. Secondo uno studio condotto da Hauß e collaboratori (*Hauß T. et al., 2002*) lo Squalene potrebbe localizzarsi al centro del doppio strato lipidico parallelamente alla superficie degli MLV. Lo SqualeneCOOH determina invece la diminuzione della temperatura di transizione che è sempre più evidente all'aumentare della frazione molare. Questi risultati sono indicativi di un effetto di destabilizzazione della membrana da parte dello SqualeneCOOH dovuto all'inserimento della molecola all'interno del doppio strato fosfolipidico. L'Aciclovir-Squalene determina una destabilizzazione del doppio strato fosfolipidico che aumenta progressivamente per tutte le frazioni molari usate, ma che è meno evidente rispetto a quella determinata dallo SqualeneCOOH.

Da sottolineare è che la presenza di SqualeneCOOH e dell'Aciclovir-Squalene causa l'allargamento del picco calorimetrico principale. Questi risultati indicano un forte effetto destabilizzante delle interazioni lipide-lipide, dovuto alla presenza del composto estraneo. La forte interazione del composto estraneo con le catene idrofobiche dei fosfolipidi rende la transizione di fase da gel a cristallo liquido del doppio strato

meno cooperativa, di conseguenza l'intensità del picco calorimetrico diminuisce e il picco stesso si allarga.

Il confronto dei risultati ottenuti dai quattro composti in esame permette di concludere che lo SqualeneCOOH e l'Aciclovir-Squalene, per tutte le frazioni molari esaminate, sono solubili all'interno del doppio strato fosfolipidico ed esercitano una forte perturbazione della struttura lipidica.

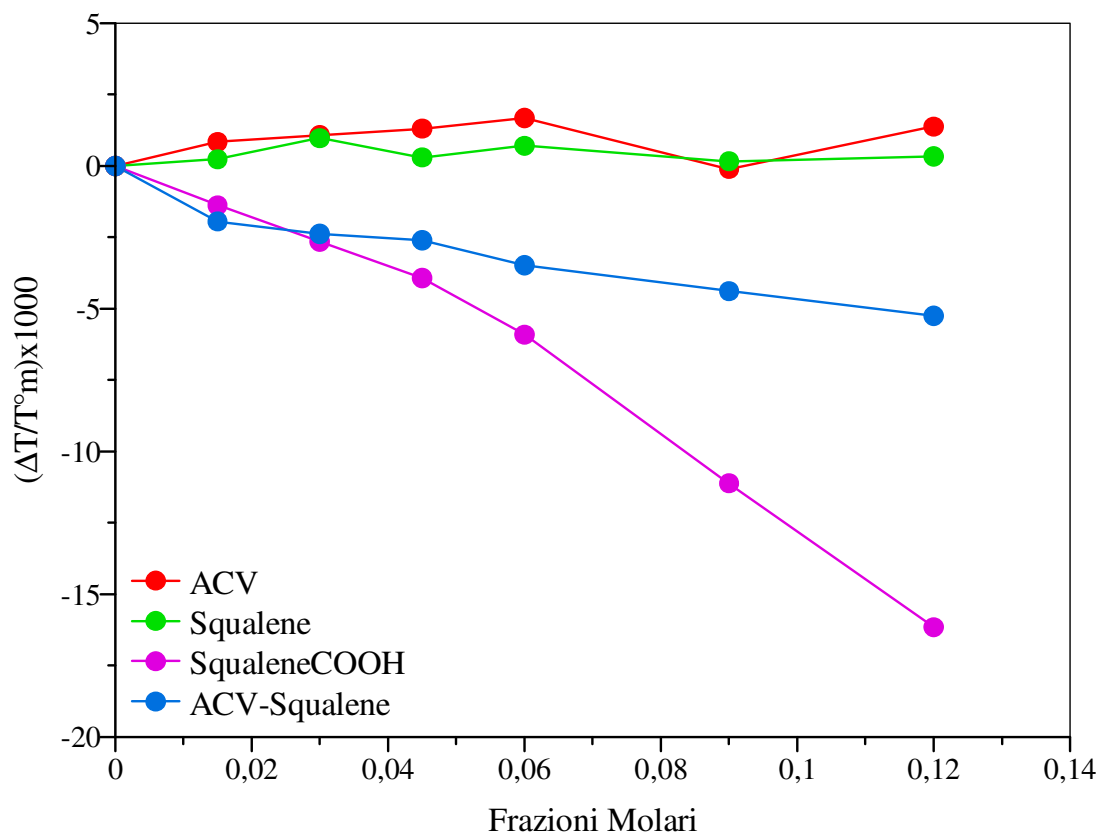


Figura 4.12. Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza di Aciclovir, Squalene, SqualeneCOOH e Aciclovir-Squalene a frazioni molari crescenti. La variazione della temperatura di transizione è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa liposomiale.

La Figura 4.13 mostra l'andamento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di AraC, Squalene, SqualeneCOOH e AraC-Squalene, riportata come $\Delta T/T_m^0$, in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV. Anche in questo caso possono essere tratte conclusioni simili, infatti, anche l'AraC ha un carattere altamente idrofilico, per cui non riesce ad interagire con i liposomi.

Da un'analisi più attenta si evince che fino alla frazione molare 0,06 l'AraC-Squalene si distribuisce uniformemente tra i bilayer lipidici, mentre a frazioni molari maggiori si aggrega formando dei domini; in tal modo si formano zone fosfolipidiche povere di AraC-Squalene e zone fosfolipidiche ricche di AraC-Squalene. Inoltre, anche nel caso dell'AraC-Squalene si verifica un sostanziale allargamento del picco calorimetrico principale che può essere spiegato considerando un forte effetto destabilizzante delle interazioni lipide-lipide, dovuto alla presenza del composto estraneo. I risultati ottenuti permettono di concludere che lo SqualeneCOOH e l'AraC-Squalene interagiscono con il doppio strato fosfolipidico: la porzione squalenica si potrebbe inserire fra le code idrocarburiche fosfolipidiche mentre la porzione -COOH (dello SqualeneCOOH) e la porzione -AraC (dell'AraC-Squalene) potrebbe protrudere nell'ambiente acquoso.

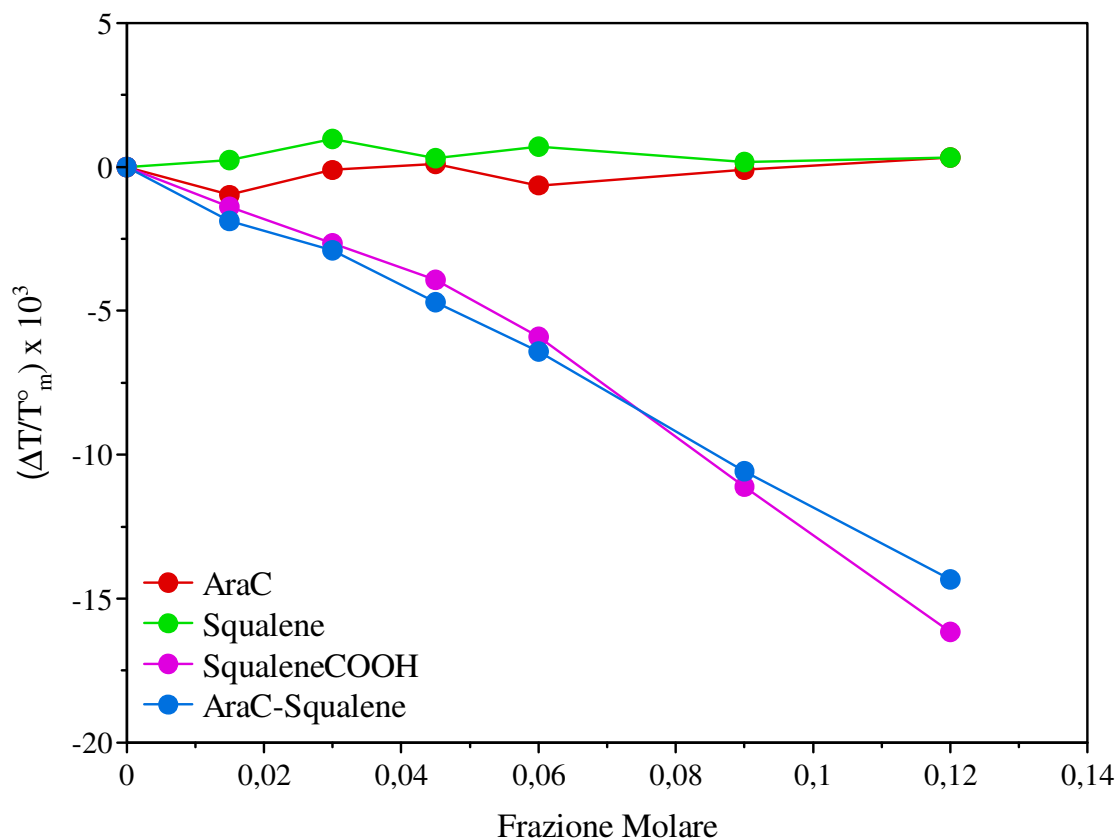


Figura 4.13. Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza di AraC, Squalene, SqualeneCOOH e AraC-Squalene a frazioni molari crescenti. La variazione della temperatura di transizione è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa liposomiale.

4.12.2. Cinetiche di trasferimento transmembrana

Questi esperimenti sono stati effettuati per verificare la capacità degli MLV di trattenere il composto incorporato e, quindi, verificare la possibilità di usare i liposomi come carrier. Per tale scopo, MLV di DMPC preparati in presenza dei composti in esame alla frazione molare 0,12 e 0,06 nel caso di Paclitaxel e Paclitaxel-Squalene (carrier, MLV pieni) sono stati messi a contatto con MLV di sola DMPC (modello di biomembrana, MLV vuoti), a tempi d'incubazione crescenti. Tali frazioni molari sono state scelte poiché i composti a queste concentrazioni hanno un notevole effetto sui liposomi di DMPC. Le curve calorimetriche di tali esperimenti sono mostrate nelle Figure 6.14-6.16 e sono confrontate con le curve dei campioni messi a contatto (MLV di sola DMPC e MLV di DMPC preparati in presenza di composto alla frazione molare 0,12 o 0,06) e con la curva degli MLV preparati in presenza di composto alla frazione molare 0,06 o 0,03 (curva r). La curva r è usata come riferimento; infatti, rappresenta la curva che si dovrebbe ottenere se il composto migrasse dagli MLV pieni agli MLV vuoti fino a raggiungere la stessa concentrazione in tutti gli MLV che è un valore medio fra i due di partenza.

Nella Figura 4.14 sono riportate le curve delle cinetiche dei precursori Squalene e SqualeneCOOH. Per lo Squalene non si osservano spostamenti del picco calorimetrico principale né variazioni della sua forma; il picco di pretransizione rimane invariato.

Nel caso dello SqualeneCOOH si può notare che il picco di pretransizione già alla prima scansione diventa meno evidente e scompare con l'aumentare del tempo di incubazione; il picco principale invece si sposta appena percettibilmente verso temperature più basse indicando che il trasferimento del composto avviene molto lentamente e non è ancora completo dopo nove scansioni consecutive.

Riguardo all'Aciclovir, Figura 4.15, per tutto il tempo d'incubazione il picco di pretransizione ed il picco principale non subiscono alcuna variazione di forma né alcuno spostamento. Nella stessa figura sono riportate le curve della cinetica dell'AraC, per tutte le scansioni successive, al crescere del tempo d'incubazione, il picco di pretransizione rimane sempre evidente pur spostandosi verso temperature più basse mentre il picco principale rimane invariato. Infine, per quanto riguarda le curve della cinetica del Paclitaxel si può osservare solo la scomparsa del picco di pretransizione, mentre il picco di transizione rimane pressoché invariato.

In Figura 4.16 sono riportate le curve delle cinetiche di trasferimento effettuate con i pro-farmaci; per quanto riguarda l'Aciclovir-Squalene la curva calorimetrica relativa alla prima scansione è costituita da un picco di pretransizione, un picco principale alla temperatura di circa 24,8 °C, attribuibile agli MLV vuoti, e una spalla a circa 23,7 °C, attribuibile agli MLV pieni. Il picco di pretransizione scompare del tutto già dopo un'ora di incubazione (2^a Scan); il picco principale si sposta leggermente verso temperature più basse; la spalla diviene meno evidente all'aumentare del tempo di incubazione e scompare quasi del tutto dopo le nove scansioni consecutive. La presenza di due picchi è indice dell'incapacità dell'Aciclovir-Squalene di passare dagli MLV pieni a quelli vuoti in brevi tempi; infatti anche all'aumentare del tempo di contatto solo parte del composto riesce a trasferirsi. Anche nel caso dell'AraC-Squalene, in ogni curva si possono evidenziare tre segnali calorimetrici: il picco di pre-transizione, il picco principale e una spalla a circa 20 °C. Nella curva calorimetrica relativa alla prima scansione è presente il picco di pretransizione, che diventa sempre meno evidente con il passare del tempo d'incubazione, e da altri due picchi, uno molto largo a circa 20 °C (attribuibile agli MLV contenenti l'AraC-Squalene) l'altro molto netto a circa 25 °C (attribuibile agli MLV di DMPC pura). La presenza di due picchi è indice dell'incapacità dell'AraC-Squalene di passare velocemente dagli MLV pieni a quelli vuoti. Con l'aumentare del tempo d'incubazione il picco a temperatura più bassa diventa meno evidente indicando che solo parte del composto riesce a trasferirsi. Anche nelle curve del Paclitaxel-Squalene possiamo individuare tre segnali calorimetrici costituiti da un picco di pretransizione a circa 17 °C, da una larga spalla tra 21-24 °C, segnale dovuto alla presenza degli MLV pieni, ed infine il picco relativo agli MLV vuoti a circa 25 °C.

La lentezza con cui avviene il trasferimento dello SqualeneCOOH e di tutti e tre i prodrug dagli MLV pieni a quelli vuoti può essere attribuita al carattere lipofilo dei composti che avendo un'elevata affinità per le catene aciliche fosfolipidiche se ne allontanano con difficoltà.

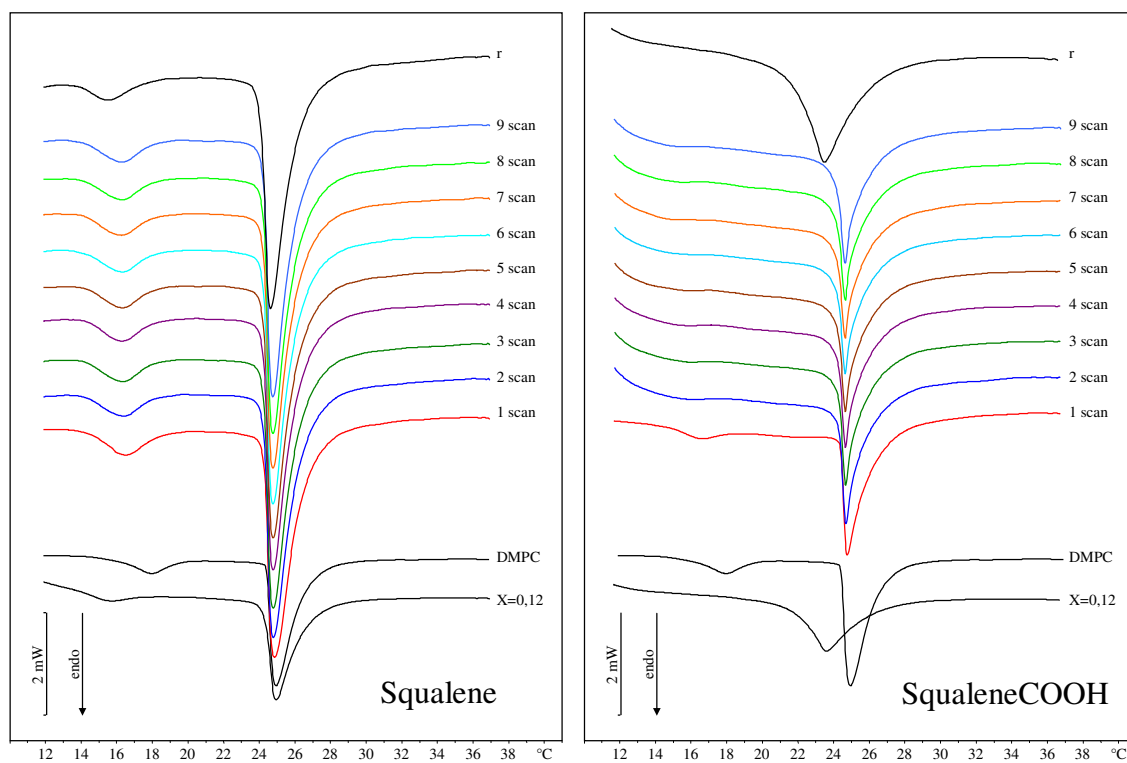


Figura 4.14. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti Squalene e SqualeneCOOH alla frazione molare 0,12 a differenti tempi d'incubazione.
 r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,06.

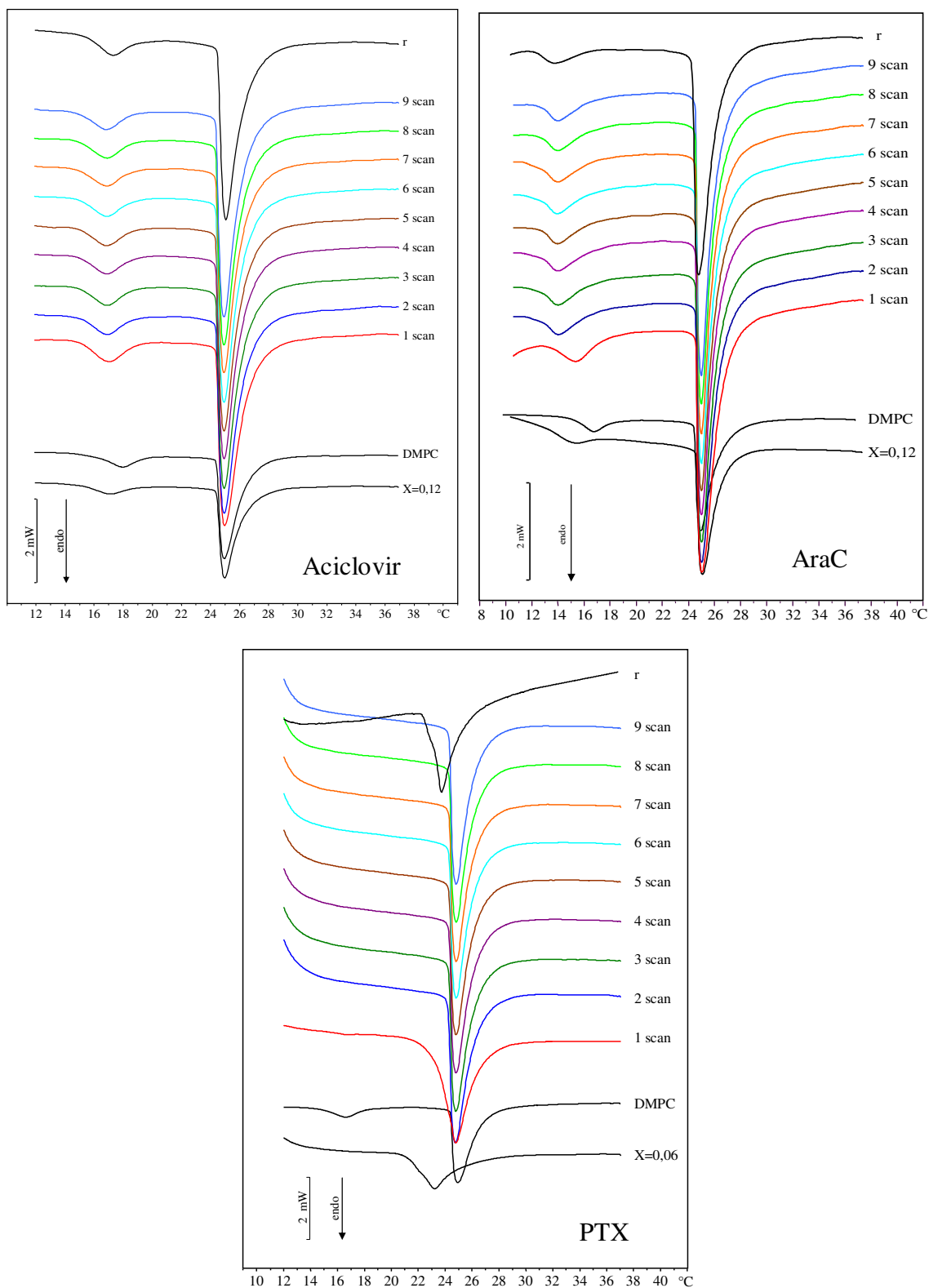


Figura 4.15. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti Aciclovir ed AraC, alla frazione molare 0,12, e Paclitaxel alla frazione molare 0,06 a differenti tempi d'incubazione.
 r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,06 (per Aciclovir ed AraC) e 0,03 (per Paclitaxel).

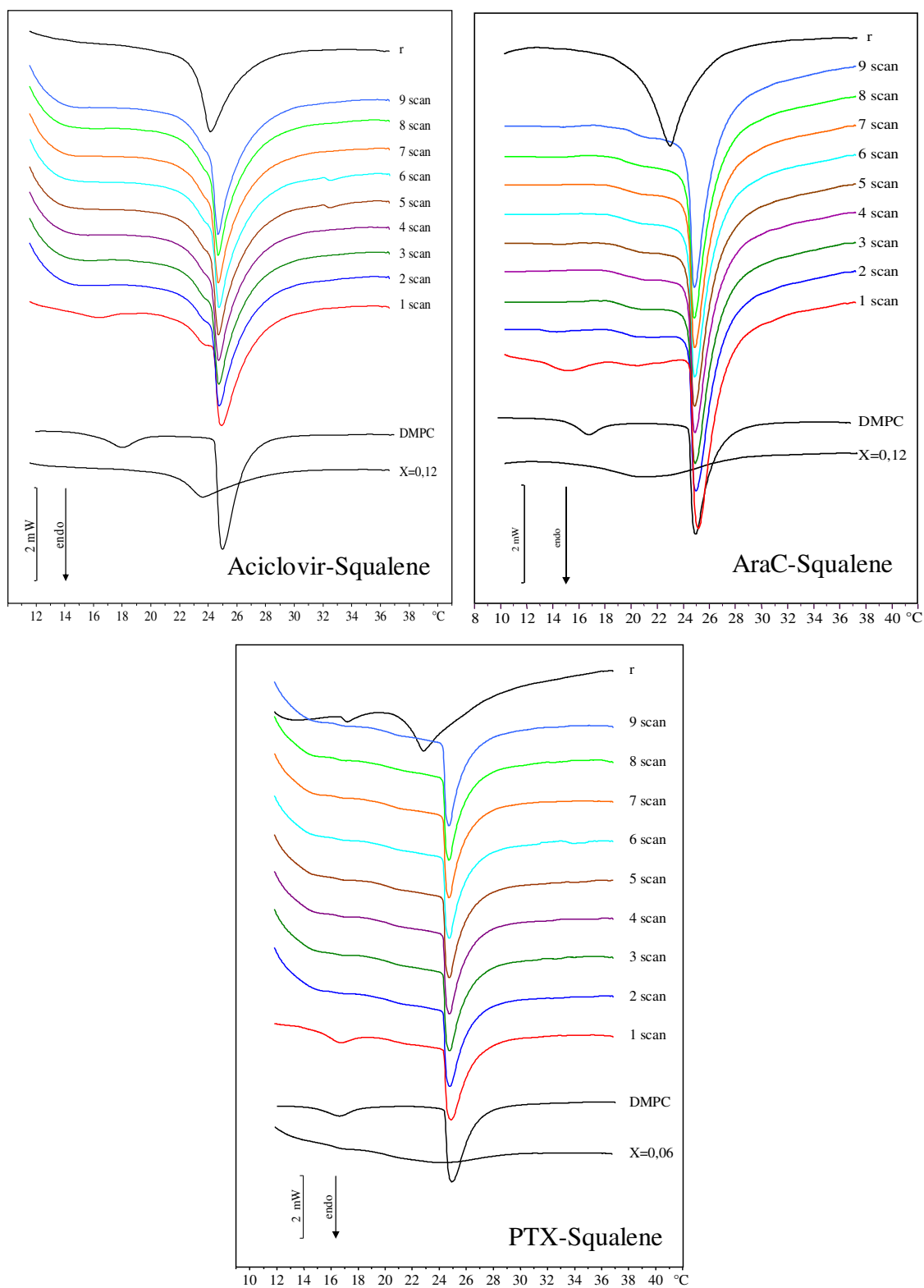


Figura 4.16. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti Aciclovir-Squalene ed AraC-Squalene, alla frazione molare 0,12, e Paclitaxel-Squalene alla frazione molare 0,06 a differenti tempi d'incubazione. r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,06 (per Aciclovir-Squalene ed AraC-Squalene) e 0,03 (per Paclitaxel-Squalene).

4.12.3. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)

La Figura 4.17a riporta le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dello Squalene e delle miscele DMPC/Squalene a varie frazioni molari, registrate a 10 °C. La curva isoterma dello Squalene puro indica che la sostanza si trova, da 130 a circa 40 \AA^2 , in uno stato gassoso, mentre, a valori più bassi d'area molecolare, si trova in uno stato di liquido espanso. Le isoterme delle miscele DMPC/Squalene, rispetto all'isoterma della DMPC pura, per frazioni molari di Squalene comprese fra 0,015 e 0,25, sono spostate verso valori più elevati di area per molecola, mentre, per frazioni molari di Squalene più alte, sono spostate verso valori più bassi di area per molecola. Con l'aumentare della quantità di Squalene presente nella miscela, la transizione LE/LC della DMPC si sposta verso valori leggermente più elevati di pressione superficiale, mentre la sua entità diminuisce sensibilmente, fino a scomparire.

Nella Figura 4.17b mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dello Squalene e delle miscele DMPC/Squalene a varie frazioni molari a 37 °C. L'isoterma dello Squalene indica che esso si trova in uno stato gassoso per valori di area per molecola da 130 a 35 \AA^2 e in uno stato liquido-espanso per valori minori di area per molecola. Le isoterme delle miscele si trovano in uno stato di liquido-espanso e, rispetto all'isoterma della DMPC, sono spostate verso valori d'area per molecola più alti per frazioni molari di Squalene da 0,015 a 0,09; la frazione molare 0,12 non provoca sostanziali spostamenti, mentre frazioni molari di Squalene più alte provocano spostamento a valori d'area per molecola più bassi.

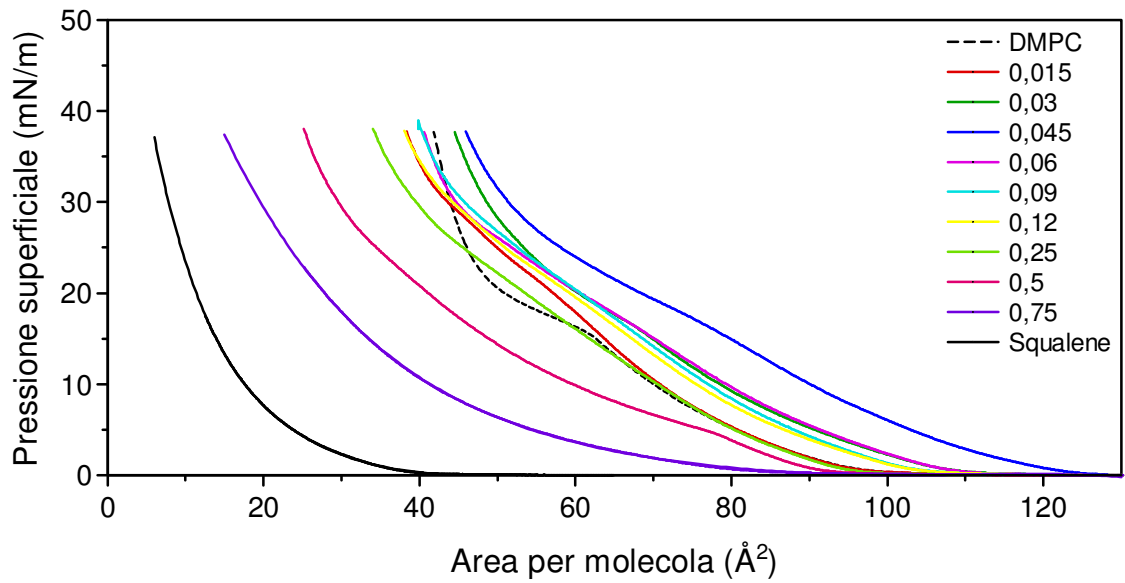


Figura 4.17a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Squalene a diverse frazioni molari.

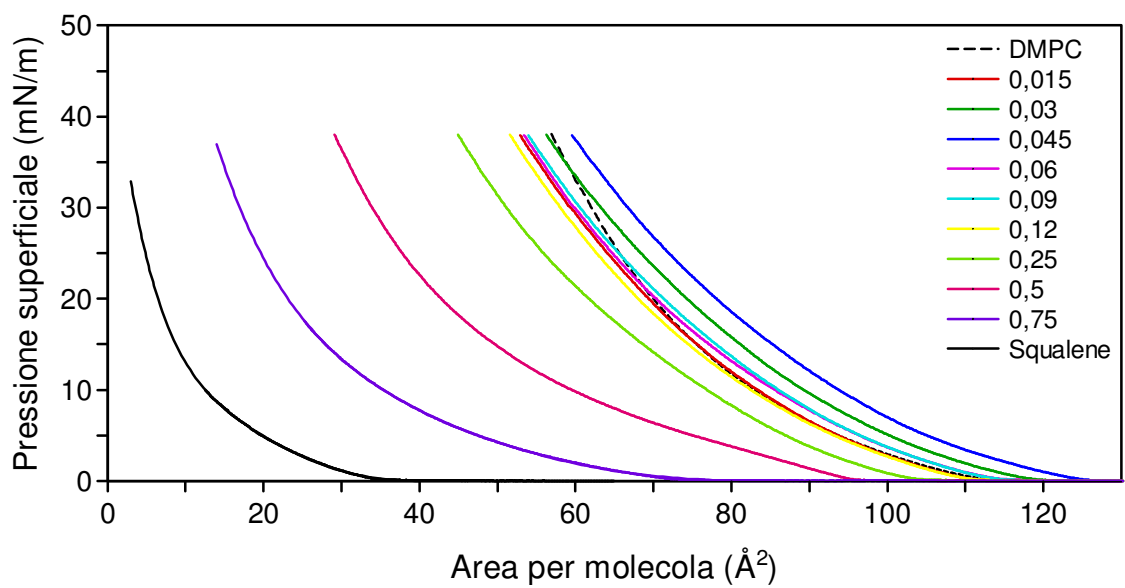


Figura 4.17b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Squalene a diverse frazioni molari.

La Figura 4.18a mostra le curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dello SqualeneCOOH e delle miscele DMPC/SqualeneCOOH a 10 °C. L'isoterma dello SqualeneCOOH indica che tale composto si trova in uno stato di gas per valori di area per molecola compresi fra 130 e 80 \AA^2 e in uno stato di liquido espanso per valori più bassi di area per molecola. Rispetto all'isoterma della DMPC, quelle delle miscele DMPC/SqualeneCOOH fino alla frazione molare 0,12 non mostrano variazioni significative; l'isoterma della frazione molare 0,25 è spostata verso valori maggiori di area molecolare, a frazioni molari più elevate le isoterme si spostano verso aree molecolari minori.

La Figura 4.18b mostra le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dello SqualeneCOOH e delle miscele DMPC/SqualeneCOOH a 37 °C. A tale temperatura lo SqualeneCOOH si trova in uno stato gassoso per valori di area per molecola compresi fra 130 e 60 \AA^2 e in uno stato di liquido espanso per valori di area molecolare minori. Rispetto all'isoterma della DMPC pura, tutte le isoterme della miscela DMPC/SqualeneCOOH sono spostate a valori d'area per molecola minori; lo spostamento aumenta con l'aumentare della frazione molare di SqualeneCOOH.

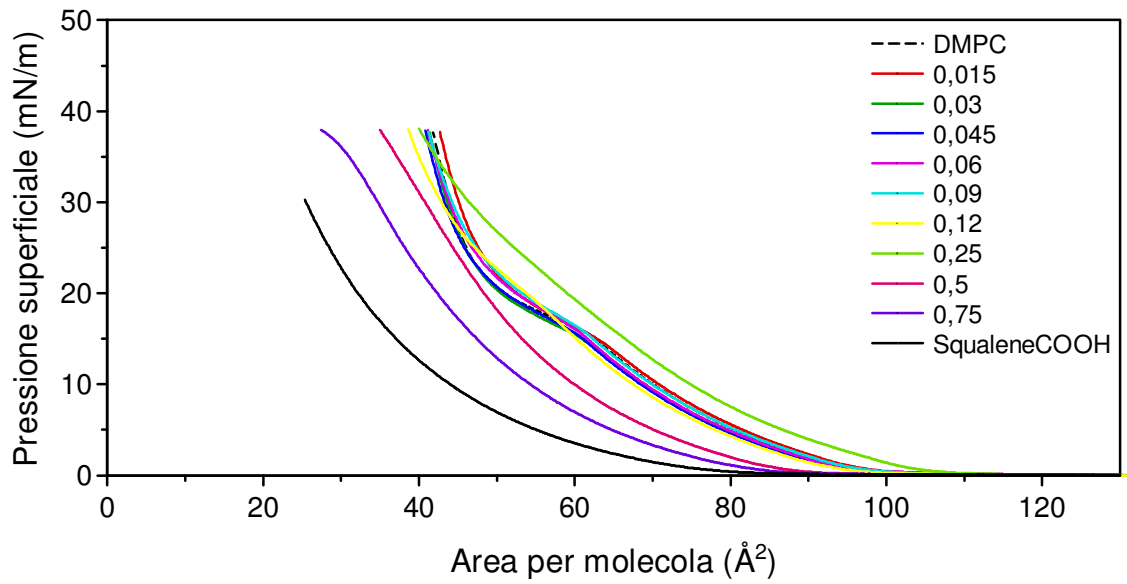


Figura 4.18a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di SqualeneCOOH a diverse frazioni molari.

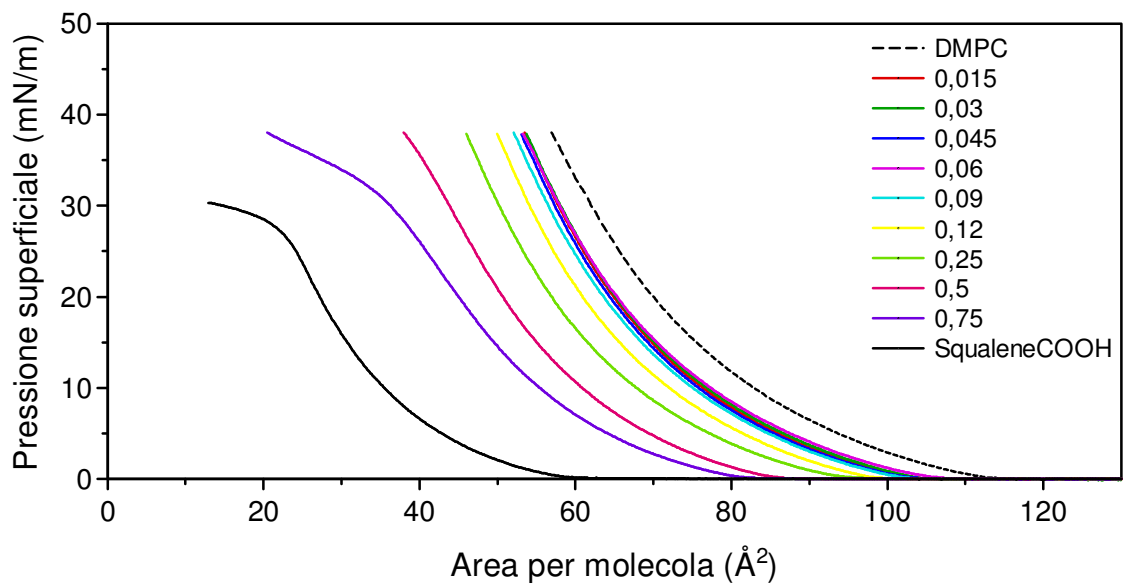


Figura 4.18b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di SqualeneCOOH a diverse frazioni molari.

La Figura 4.19a riporta le curve isoterme di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) a 10 °C della DMPC, dell'Aciclovir e delle miscele DMPC/Aciclovir a varie frazioni molari di Aciclovir. Si nota che l'Aciclovir, probabilmente per la mancanza di un carattere anfifilico, non riesce a formare un monolayer ed anche ad elevati valori di compressione non si osserva alcuna isoterma. Esaminando le curve isoterme dei monolayer, formati dalle miscele DMPC/Aciclovir, a varie frazioni molari, si nota che l'aggiunta dell'Aciclovir provoca variazioni nell'andamento delle isoterme del fosfolipide. L'Aciclovir fino alla frazione molare 0,09 provoca piccoli spostamenti dell'isoterma verso valori più bassi d'area per molecola rispetto all'isoterma della DMPC; a frazioni molari maggiori invece il principio attivo determina un notevole spostamento delle curve isoterme verso valori d'area per molecola minori. La transizione LE/LC tende a diventare sempre meno evidente con l'aumentare della frazione molare; inoltre essa si sposta verso valori leggermente più elevati di pressione superficiale alla frazione molare 0,5.

La Figura 4.19b riporta le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'Aciclovir e delle miscele DMPC/Aciclovir a varie frazioni molari di Aciclovir, a 37 °C. Non si osserva alcuna isoterma dell'Aciclovir. A questa temperatura, rispetto alle isoterme della DMPC, quelle delle miscele DMPC/Aciclovir sono spostate verso valori più alti d'area per molecola per basse frazioni molari (0,015; 0,03, 0,045) e verso valori più bassi d'area per molecola per frazioni molari più elevate.

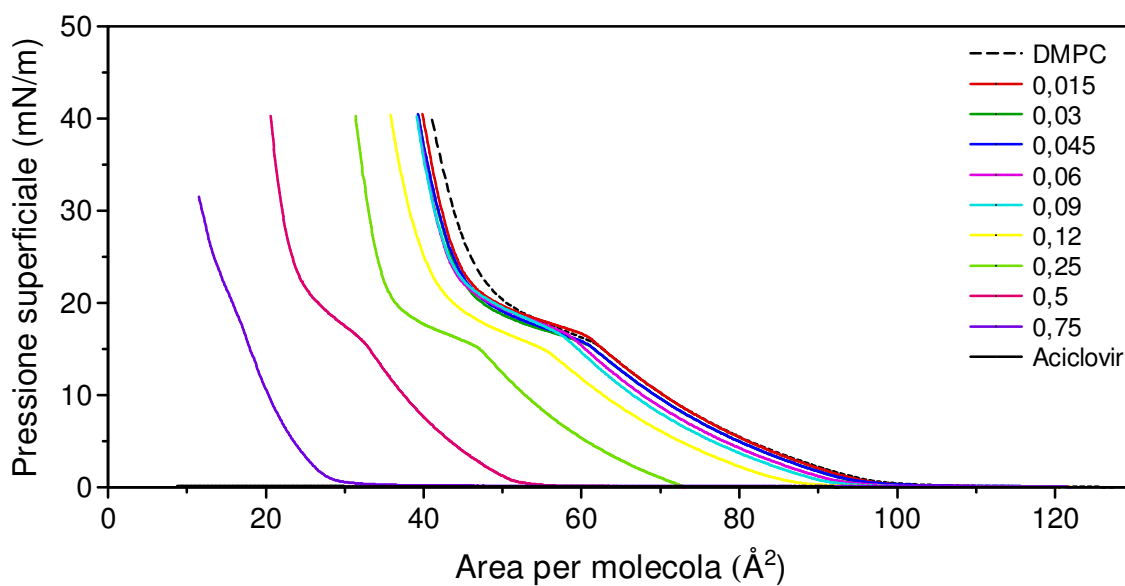


Figura 4.19a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Aciclovir a diverse frazioni molari.

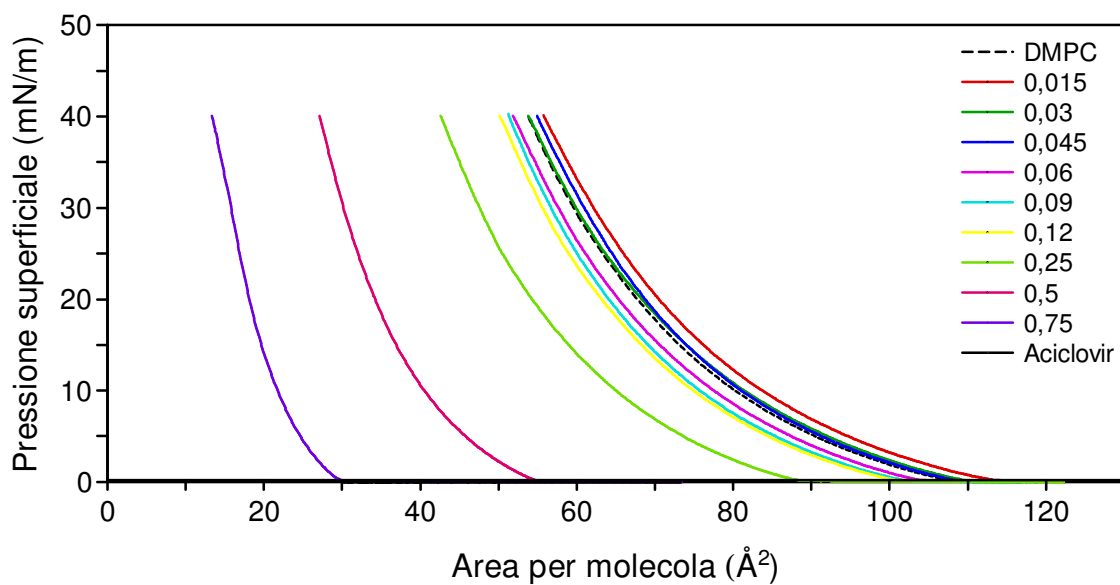


Figura 4.19b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Aciclovir a diverse frazioni molari.

La Figura 4.20a mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'Aciclovir-Squalene e delle miscele DMPC/Aciclovir-Squalene a varie frazioni molari a 10 °C. L'Aciclovir-Squalene fino a 60\AA^2 si trova in uno stato gassoso; per valori di area per molecola compresi tra 60 e circa 32\AA^2 si trova in uno stato di liquido espanso; da circa 32 a circa 28\AA^2 si osserva una transizione e per valori minori di 28\AA^2 si trova in uno stato di liquido condensato. Confrontando le isoterme della DMPC con quelle delle miscele DMPC/Aciclovir-Squalene, a varie frazioni molari, si osserva che l'Aciclovir-Squalene fino alla frazione molare 0,12 determina uno spostamento leggero delle curve verso valori più alti di area per molecola; a frazioni molari maggiori sposta le isoterme verso valori di area per molecola minori.

La Figura 4.20b mostra le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'Aciclovir-Squalene e delle miscele DMPC/Aciclovir-Squalene a varie frazioni molari a 37 °C. L'Aciclovir-Squalene fino a 55\AA^2 si trova in uno stato gassoso; per valori di area per molecola compresi tra 55 e circa 30\AA^2 si trova in uno stato di liquido espanso; da circa 30 a circa 22\AA^2 si osserva una transizione e per valori minori di 22\AA^2 si trova in uno stato di liquido condensato. Per basse frazioni molari (0,015-0,09) le isoterme delle miscele si trovano a valori di area per molecola simili a quelli della DMPC pura. Dalla frazione molare 0,12 si ha spostamento delle isoterme verso valori maggiori di area per molecola ed inoltre si osserva la transizione tipica dell'ACV-Squalene che si sposta verso più bassi valori di pressione superficiale all'aumentare della quantità di composto presente nel monolayer.

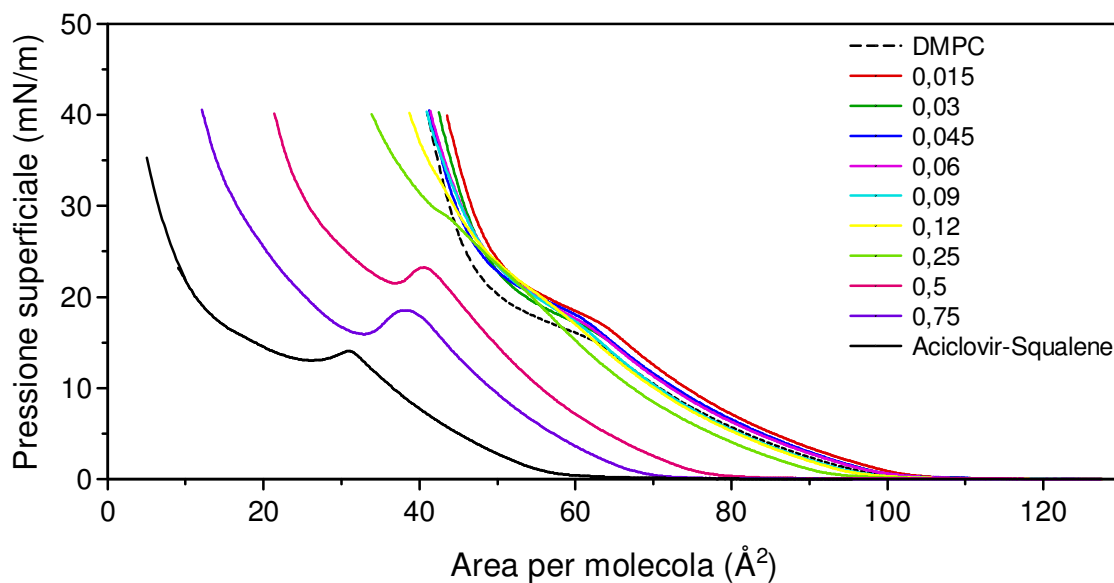


Figura 4.20a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Aciclovir-Squalene a diverse frazioni molari.

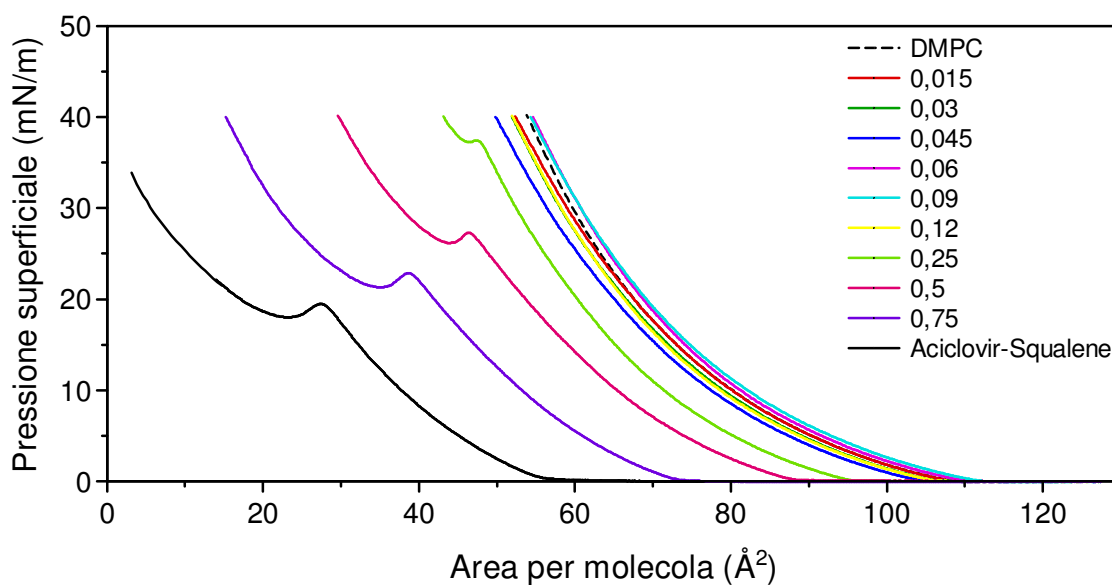


Figura 4.20b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Aciclovir-Squalene a diverse frazioni molari.

La Figura 4.21a riporta le curve isoterme di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) a 10 °C della DMPC, dell'AraC e delle miscele DMPC/AraC a varie frazioni molari di AraC. Si nota che l'AraC, per valori di area per molecola compresi tra 120 e circa 10 \AA^2 si trova in uno stato gassoso, mentre a valori più alti di compressione si trova in uno stato di liquido espanso. Esaminando le curve isoterme dei monolayers, formati dalle miscele DMPC/AraC, a varie frazioni molari, si nota che l'aggiunta dell'AraC provoca variazioni nell'andamento delle isoterme del fosfolipide. L'AraC fino alla frazione molare 0,12 provoca piccoli spostamenti dell'isoterma rispetto a quella della DMPC; a frazioni molari maggiori invece il principio attivo determina un notevole spostamento delle curve isoterme verso valori d'area per molecola minori. La transizione LE/LC tende a diventare sempre meno evidente con l'aumentare della frazione molare; inoltre essa si sposta verso valori leggermente più elevati di pressione superficiale a partire dalla frazione molare 0,25.

La Figura 4.21b riporta le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'AraC e delle miscele DMPC/AraC a varie frazioni molari di AraC, a 37°C. Anche ad elevati livelli di compressione non si osserva alcuna isoterma dell'AraC, ciò vuol dire che il composto non forma monolayer o rimane in uno stato gassoso anche ad alti livelli di compressione. Tale comportamento può essere spiegato, probabilmente dalla mancanza di un carattere anfifilico. Rispetto alle isoterme della DMPC, le isoterme delle miscele DMPC/AraC, a 37 °C, sono spostate verso valori più alti d'area per molecola per basse frazioni molari (0,015; 0,03, 0,045 e 0,06) e verso valori più bassi d'area per molecola per frazioni molari più elevate.

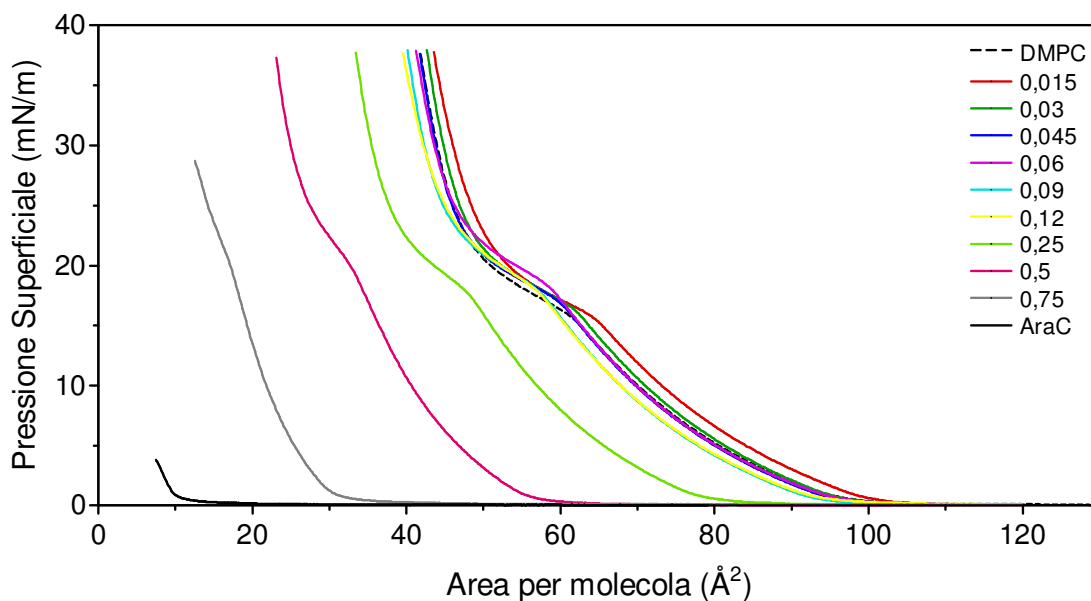


Figura 4.21a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di AraC a diverse frazioni molari.

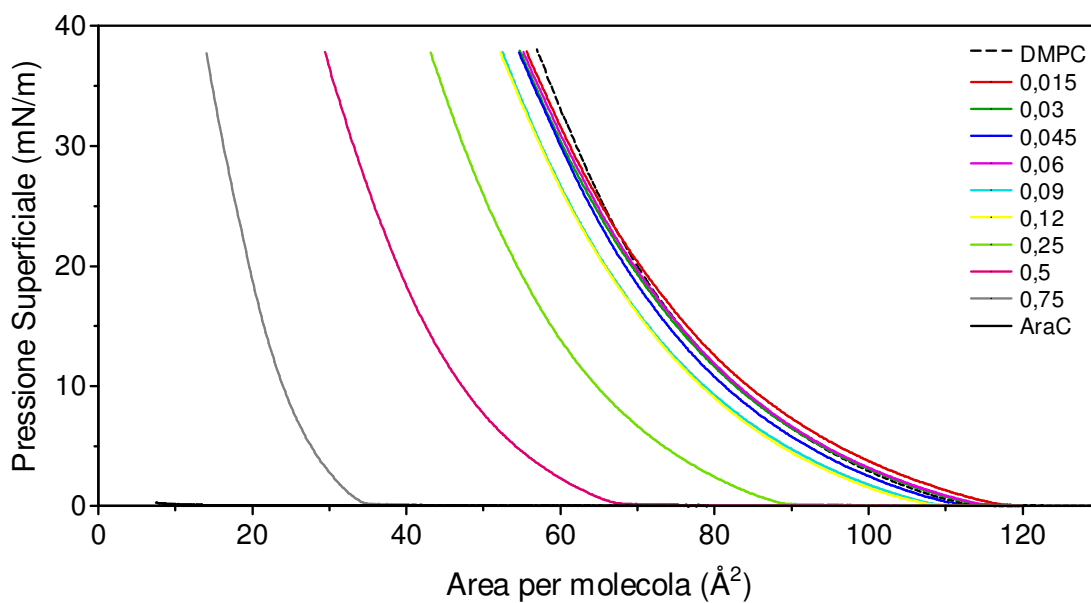


Figura 4.21b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di AraC a diverse frazioni molari.

La Figura 4.22a mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'AraC-Squalene e delle miscele DMPC/AraC-Squalene a varie frazioni molari a 10 °C. L'AraC-Squalene fino a 105\AA^2 si trova in uno stato gassoso; per valori di area per molecola minori si trova in uno stato di liquido espanso. Confrontando le isoterme della DMPC con quelle delle miscele DMPC/AraC-Squalene, a varie frazioni molari, si osserva che l'AraC-Squalene fino alla frazione molare 0,5 determina uno spostamento delle curve verso valori più alti di area per molecola; a frazioni molari maggiori sposta le isoterme verso valori di area per molecola minori. Inoltre, la presenza nella miscela di maggiori quantità del coniugato AraC-Squalene causa una scomparsa della transizione LE-LC.

La Figura 4.22b mostra le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'AraC-Squalene e delle miscele DMPC/AraC-Squalene a varie frazioni molari a 37 °C. L'AraC-Squalene fino a 90\AA^2 si trova in uno stato gassoso; mentre, per valori di area per molecola minori si trova in uno stato di liquido espanso. Per basse frazioni molari (0,015-0,12) le isoterme delle miscele si trovano leggermente spostate a valori di area per molecola maggiori o comunque molto simili a quelli della DMPC pura. Dalla frazione molare 0,25 si ha lo spostamento delle isoterme verso valori maggiori di area per molecola.

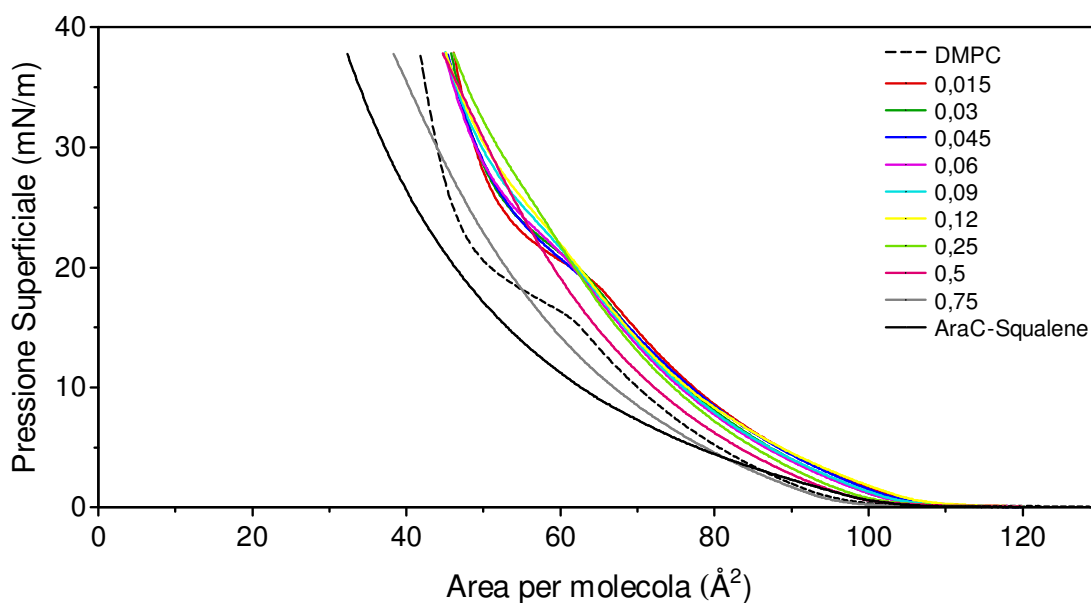


Figura 4.22a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di AraC-Squalene a diverse frazioni molari.

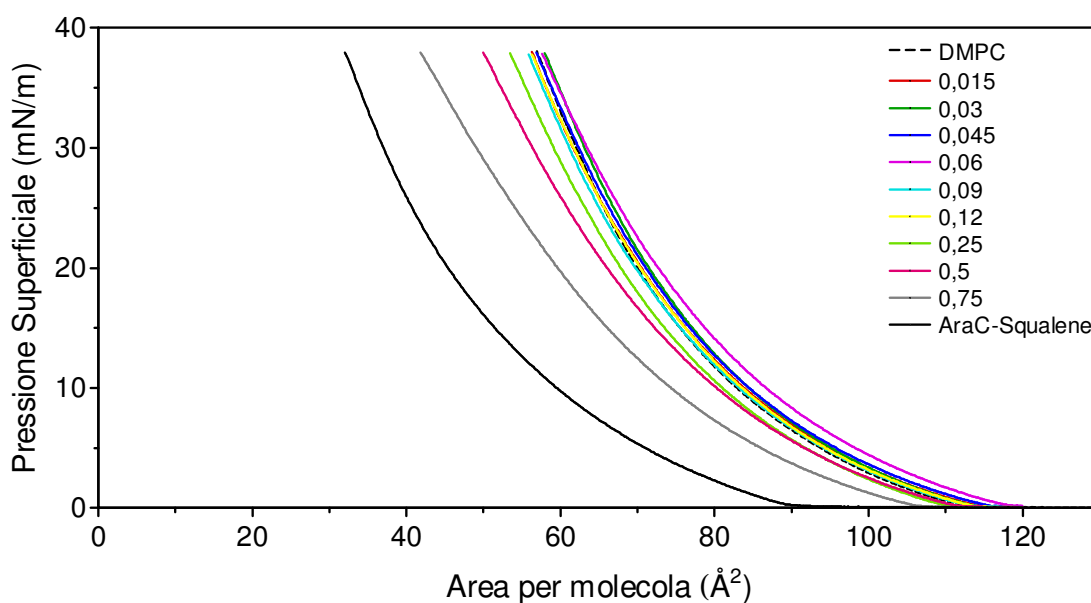


Figura 4.22b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di AraC-Squalene a diverse frazioni molari.

Nella Figura 4.23a sono riportate le curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del Paclitaxel e delle miscele DMPC/Paclitaxel a varie frazioni molari del farmaco, registrate a 10 °C. Il Paclitaxel riesce a formare un monolayer, raggiungendo il valore di pressione superficiale di 10 mN/m. L'aggiunta del Paclitaxel già per le più basse frazioni molari provoca variazioni nell'andamento dell'isoterma pressione superficiale/area per molecola della sola DMPC. Dalla frazione molare 0,015 alla frazione molare 0,06 si nota uno spostamento delle isoterme a valori più alti di area per molecola rispetto all'isoterma del fosfolipide puro. Per quanto riguarda la transizione LE/LC questa tende a spostarsi verso valori poco più elevati di pressione superficiale e a diventare sempre meno evidente. Le isoterme delle frazioni molari più alte (0,5 e 0,75) si trovano in uno stato gassoso fino a circa 120\AA^2 e per valori inferiori di area per molecola si trovano in uno stato di liquido espanso e la forma delle due isoterme è simile a quella del composto puro.

Nella Figura 4.23b sono riportate le curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del Paclitaxel e delle miscele DMPC/Paclitaxel a varie frazioni molari di Paclitaxel condotte a 37 °C. Il Paclitaxel sino a circa 20\AA^2 si trova nello stato gassoso, per valori di area per molecola (\AA^2) più bassi si trova in uno stato di liquido espanso, raggiungendo il valore di pressione superficiale di 10 mN/m. Le isoterme delle miscele DMPC/Paclitaxel per frazioni molari di composto comprese tra 0,015 e 0,12 non si discostano molto sia per quanto riguarda l'andamento che per quanto riguarda il valore di area per molecola (\AA^2) dall'isoterma della sola DMPC. A partire dalla frazione molare 0,25 si ha un progressivo spostamento delle isoterme verso valori di area per molecola (\AA^2) più bassi.

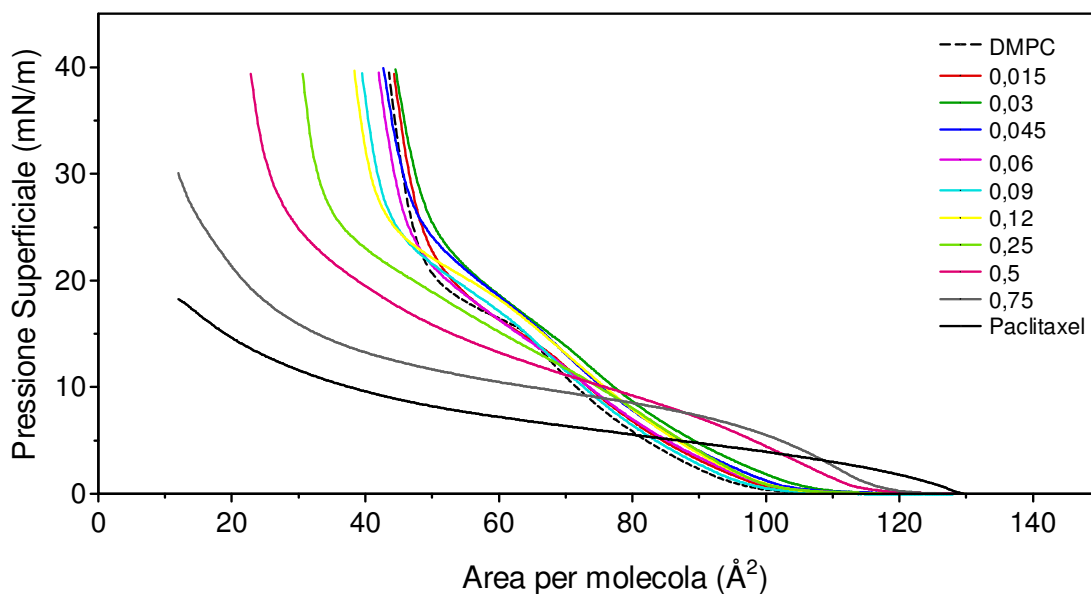


Figura 4.23a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Paclitaxel a diverse frazioni molari.

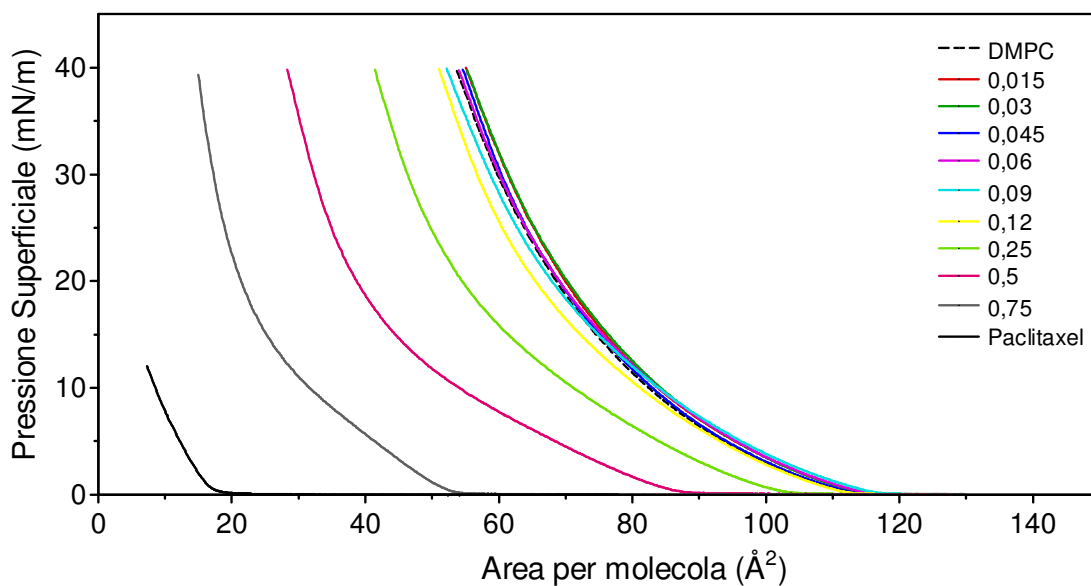


Figura 4.23b. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å²), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Paclitaxel a diverse frazioni molari.

Nella Figura 4.24a sono riportate le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del Paclitaxel-Squalene e delle miscele DMPC/Paclitaxel-Squalene a varie frazioni molari, registrate a 10 °C. L'isoterma del solo Paclitaxel-Squalene occupa un'area maggiore rispetto a quella occupata dal solo fosfolipide e il prodrug si trova in uno stato gassoso sino a circa 90\AA^2 e per valori di area per molecola (\AA^2) più bassi si trova in uno stato di LE. A partire dalla frazione molare 0,015 la transizione LE/LC si sposta verso valori di pressione superficiale più alti rispetto a quelli della DMPC diventando sempre meno evidente. Le isoterme comprese tra la frazione molare 0,015 e 0,12 occupano valori di area per molecola (\AA^2) progressivamente maggiori rispetto a quella della DMPC. Le isoterme relative alle frazioni molari più alte (0,25; 0,5 e 0,75) sono quelle che occupano la maggiore area per molecola (\AA^2) e nelle quali si evidenzia un maggiore spostamento della transizione verso valori di pressione superficiale più elevati.

La Figura 4.24b mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, del Paclitaxel-Squalene e delle miscele DMPC/Paclitaxel-Squalene a varie frazioni molari a 37 °C. Il Paclitaxel-Squalene si trova in uno stato gassoso sino a circa 125\AA^2 ; da 125 a circa 60\AA^2 si trova in uno stato di liquido espanso e a circa 60\AA^2 si ha la transizione LE/LC; il composto si trova nello stato di LC sino a circa 25\AA^2 e per valori di area per molecola minori si trova nello stato solido. Le isoterme delle miscele DMPC/Paclitaxel-Squalene, per frazioni molari comprese fra 0,015 e 0,12 si spostano verso valori di area per molecola maggiori rispetto all'isoterma della DMPC. Nelle isoterme delle frazioni molari più alte (0,5 e 0,75) lo stato di LE si ha sempre a valori di area per molecola maggiori rispetto alla DMPC, e l'andamento di tali isoterme è simile a quello del prodrug puro.

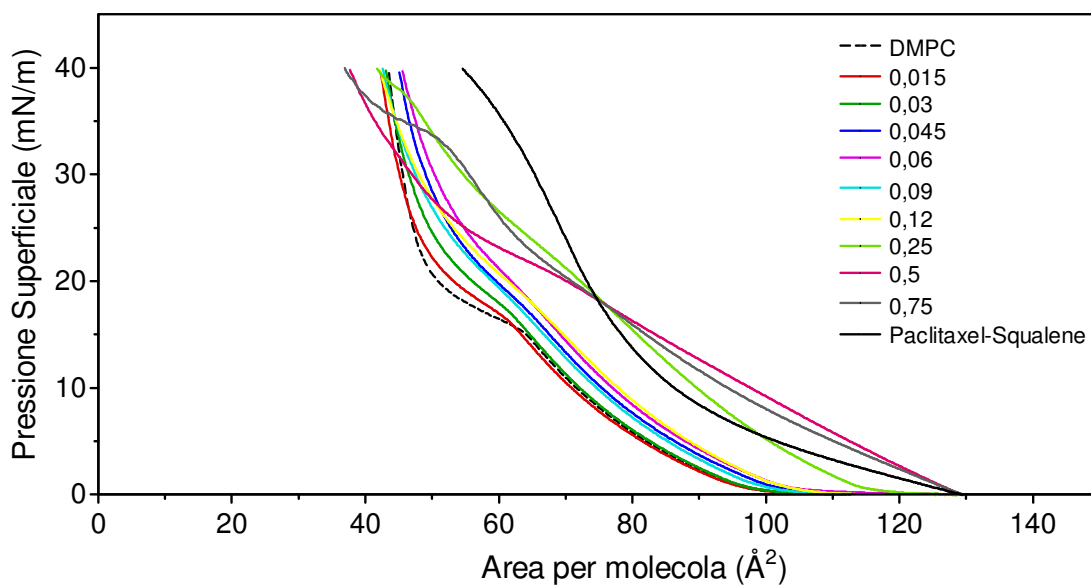


Figura 4.24a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Paclitaxel-Squalene a diverse frazioni molari.

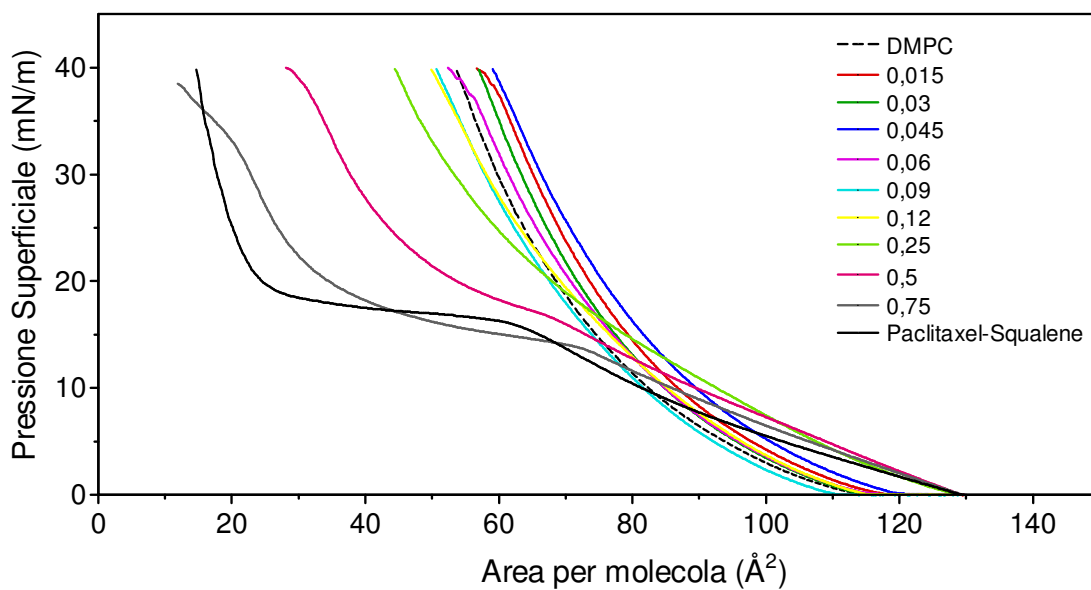


Figura 4.24a. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Paclitaxel-Squalene a diverse frazioni molari.

Riportando in grafico i dati relativi all'area media per molecola, a differenti valori di pressione superficiale in funzione delle frazioni molari di Squalene, SqualeneCOOH, Aciclovir, Aciclovir-Squalene, AraC, AraC-Squalene, Paclitaxel e Paclitaxel-Squalene si possono ricavare maggiori informazioni sul tipo d'interazioni intermolecolari che si instaurano nei monolayers misti di DMPC/composti in esame.

Le Figure 4.25 a - b mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/Squalene in funzione della frazione molare di Squalene alla temperatura di 10 °C e 37 °C e alle pressioni superficiali di 10, 20 e 30 mN/m. La retta tratteggiata ci indica i valori di area per molecola ad un determinato valore di pressione superficiale per un monolayer a due componenti con comportamento ideale. Essa si ottiene congiungendo il valore dell'area per molecola della DMPC pura (frazione molare pari a 0,00 del composto considerato) al valore ottenuto per il composto puro (frazione molare pari a 1 del composto considerato) ad un dato valore di pressione superficiale.

Lo Squalene, alla temperatura di 10 °C, per tutte le frazioni molari, causa una notevole deviazione positiva, soprattutto a 10 e 20 mN/m. Molto simile è il comportamento che si osserva a 37 °C. Anche in questo caso tale deviazione positiva si verifica a causa dell'attrazione fra le molecole di Squalene e quelle di DMPC. Lo Squalene, a causa dei doppi legami, è caratterizzato dalla presenza di ripiegamenti che gli conferiscono un elevato ingombro che spazia le catene idrofobiche della DMPC. Con l'aumento della compressione, l'ingombro offerto dallo Squalene diminuisce.

Le Figure 4.26 a - b mostrano i valori di area per molecola delle miscele di DMPC/SqualeneCOOH, a 10 e a 37 °C rispettivamente, rispetto alla frazione molare di SqualeneCOOH. A 10 °C a basse frazioni molari di SqualeneCOOH i valori sperimentali sono sovrapponibili a quelli ideali, mentre a frazioni molari maggiori si osserva una deviazione positiva dei valori di area per molecola. A 37 °C, lo SqualeneCOOH, fino alla frazione molare 0,25, causa deviazioni negative per tutte le pressioni superficiali riportate, mentre a più alte frazioni molari la deviazione è positiva. A basse frazioni molari il comportamento dello SqualeneCOOH è diverso da quello osservato per lo Squalene e poiché l'unica differenza fra le due molecole è data dalla presenza di un gruppo carbossilico nello SqualeneCOOH, il diverso comportamento si può addurre al gruppo carbossilico.

Probabilmente nel monolayer si formano legami idrogeno fra il gruppo carbossilico dello Squalene e le teste polari della DMPC che tengono vicine le molecole coinvolte nel legame e le interazioni idrofobiche aumentano.

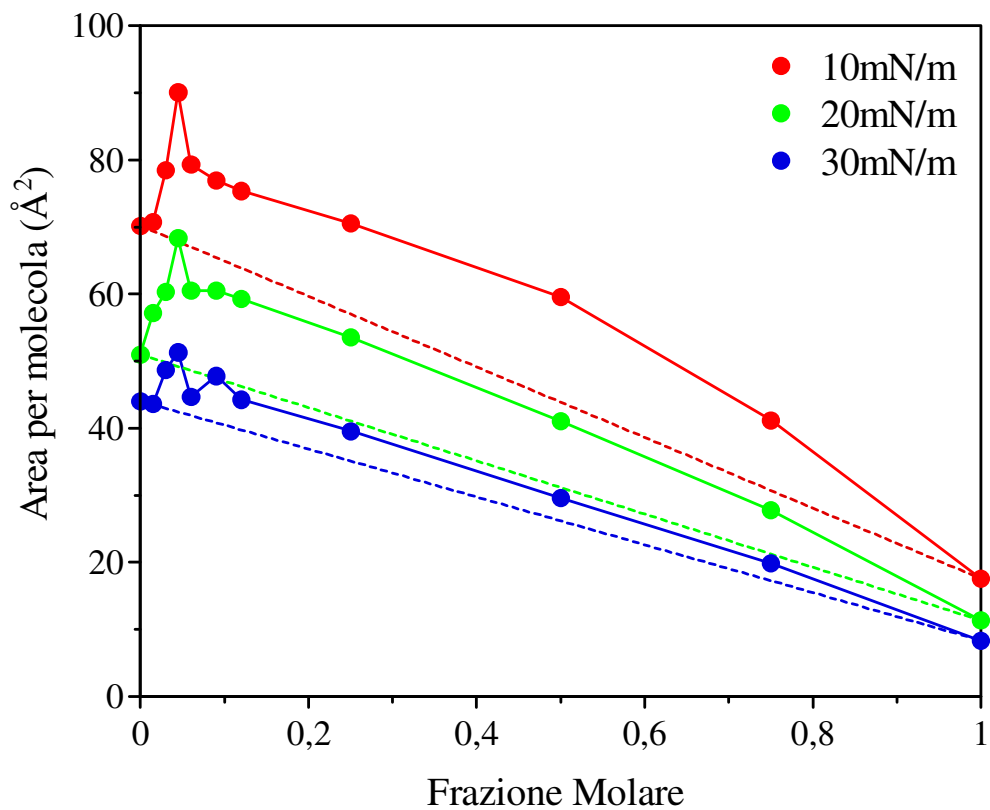


Figura 4.25a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Squalene a frazioni molari crescenti di Squalene, a 10 °C.

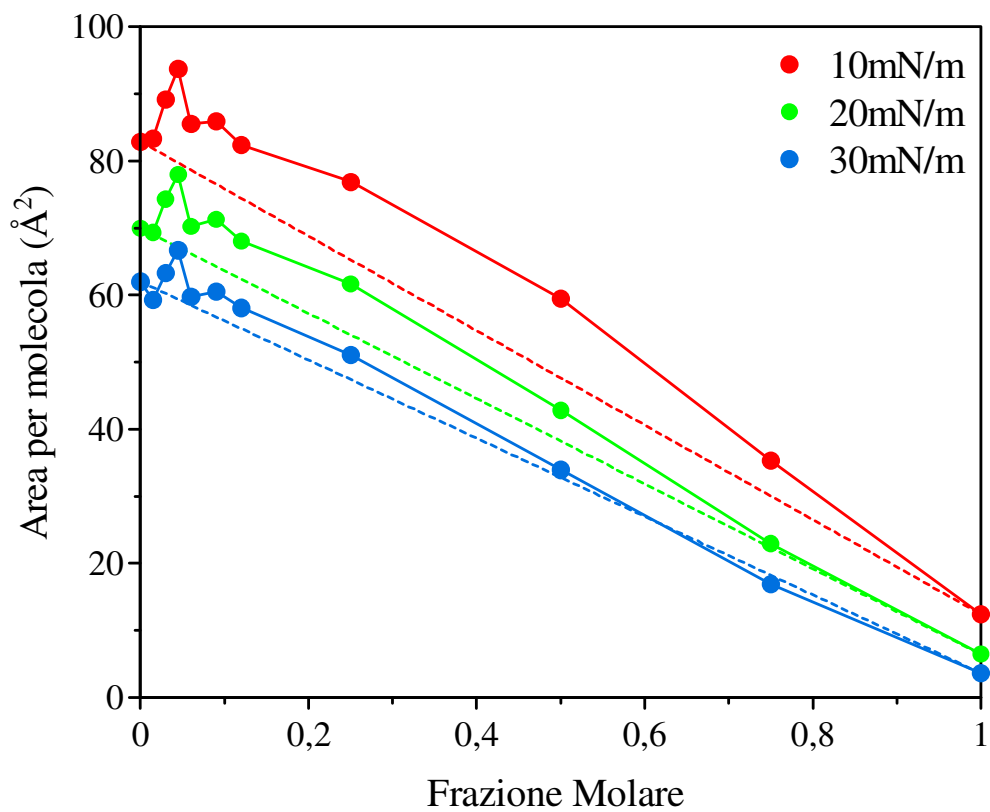


Figura 4.25b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Squalene a frazioni molari crescenti di Squalene, a 37 °C.

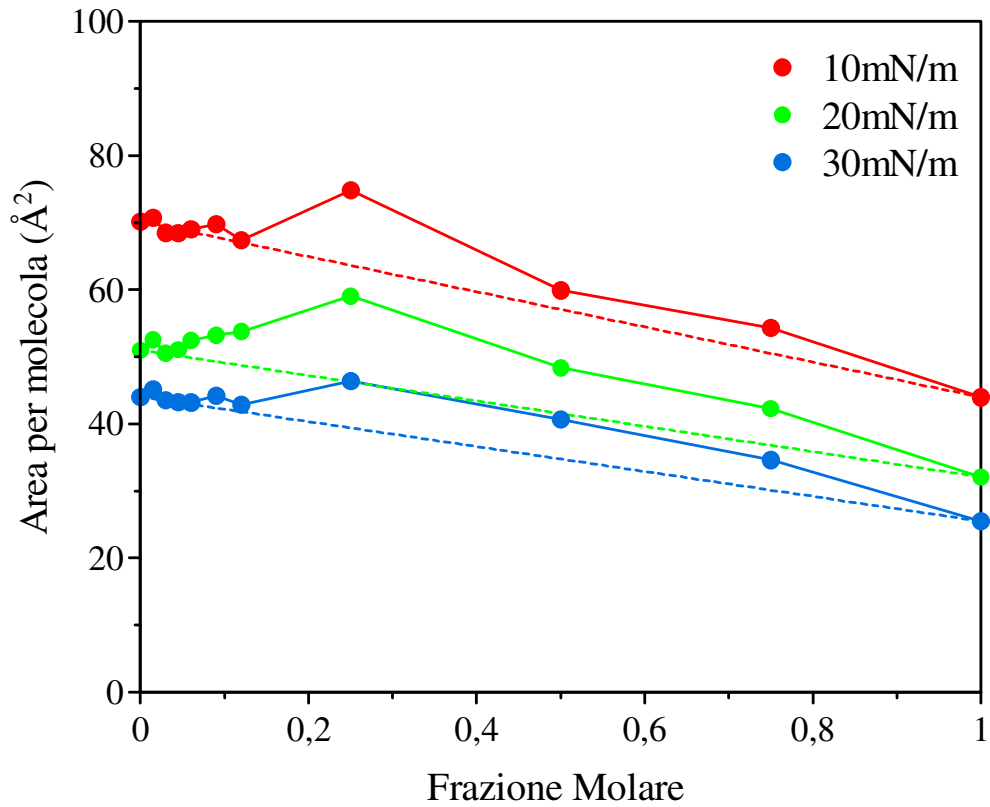


Figura 4.26a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/SqualeneCOOH a frazioni molari crescenti di SqualeneCOOH, a 10 °C.

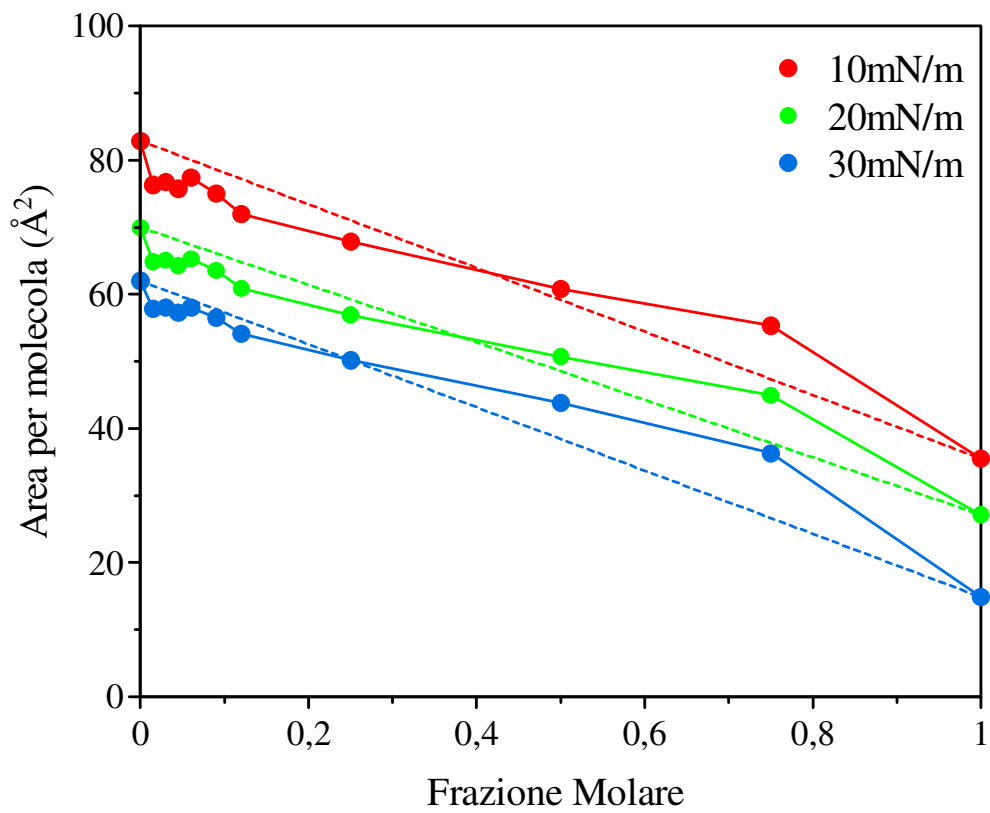


Figura 4.26b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/SqualeneCOOH a frazioni molari crescenti di SqualeneCOOH, a 37 °C.

Le Figure 4.27 a – b mostrano i valori di area per molecola delle miscele DMPC/Aciclovir in funzione della frazione molare di Aciclovir alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Per le miscele DMPC/Aciclovir alla temperatura di 10 °C, considerando la pressione di 10 mN/m, si osserva per basse frazioni molari una piccolissima deviazione positiva rispetto ai valori ideali; alla frazione molare 0,25 il valore sperimentale si sovrappone a quello ideale, a frazioni molari maggiori si osserva ancora una deviazione positiva. A pressioni di 20 e 30 mN/m, a basse frazioni molari i valori sperimentali coincidono quasi con quelli ideali, ad elevate frazioni molari si osserva una leggera deviazione positiva. Questo comportamento indica piccole interazioni repulsive fra DMPC e Aciclovir per quasi tutte le frazioni molari a 10 mN/m. A 20 e 30 mN/m le interazioni repulsive sono presenti solo ad alte frazioni molari mentre non sembrano esserci interazioni per le altre frazioni molari.

Alla temperatura di 37 °C, a 10 N/m, 20 mN/m e 30 mN/m, si nota una deviazione positiva dei valori di area molecolare rispetto alla retta ideale per tutte le frazioni molari ad eccezione della 0,5 in cui i valori di area per molecola si sovrappongono a quelli della retta ideale. Questi risultati indicano interazioni repulsive tra le molecole del bilayer misto per tutte le frazioni molari, ad eccezione della 0,5.

Le Figure 4.28 a - b mostrano l'andamento dell'area per molecola, in funzione della frazione molare di Aciclovir-Squalene delle miscele DMPC/Aciclovir-Squalene, alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. I valori delle miscele DMPC/Aciclovir-Squalene alla temperatura di 10 °C indicano una notevole deviazione positiva per tutte le frazioni molari di Aciclovir-Squalene alla pressione superficiale di 20 mN/m.

Alla temperatura di 37 °C, a basse frazioni molari (fino alla 0,045) i valori sperimentali si sovrappongono a quelli ideali indicando che non si ha interazione tra Aciclovir-Squalene e DMPC; ad alte frazioni molari si osserva una deviazione positiva dei valori di area per molecola che indica repulsione tra le molecole nel monolayer misto.

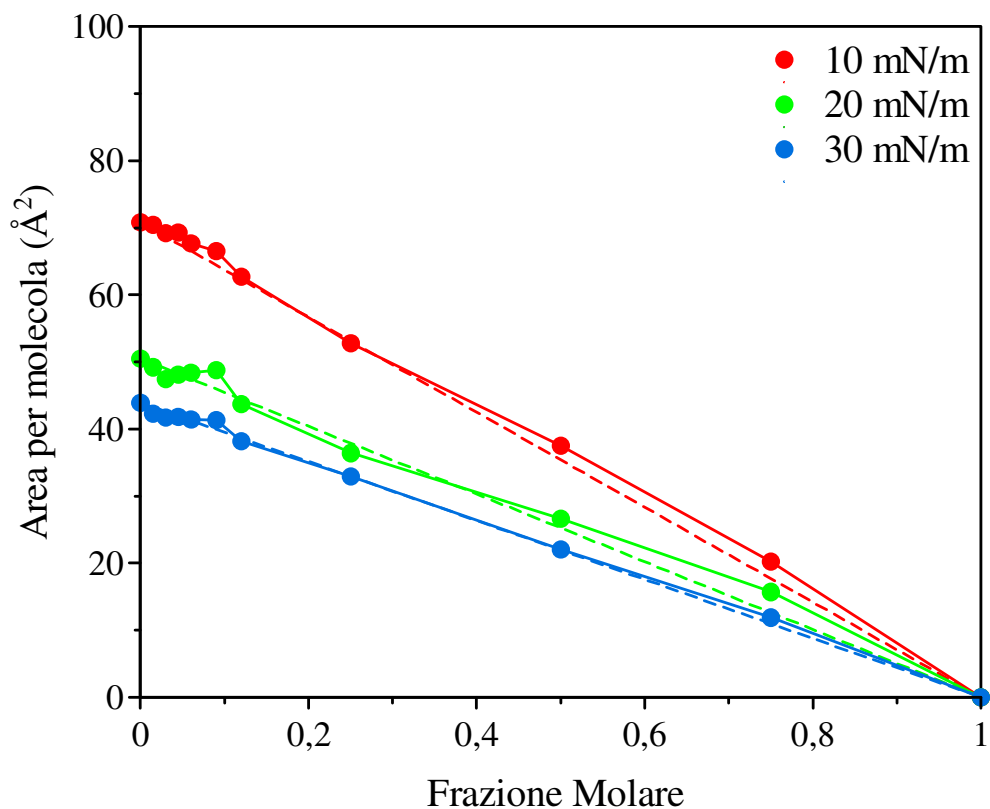


Figura 4.27a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Aciclovir a frazioni molari crescenti di Aciclovir, a 10 °C.

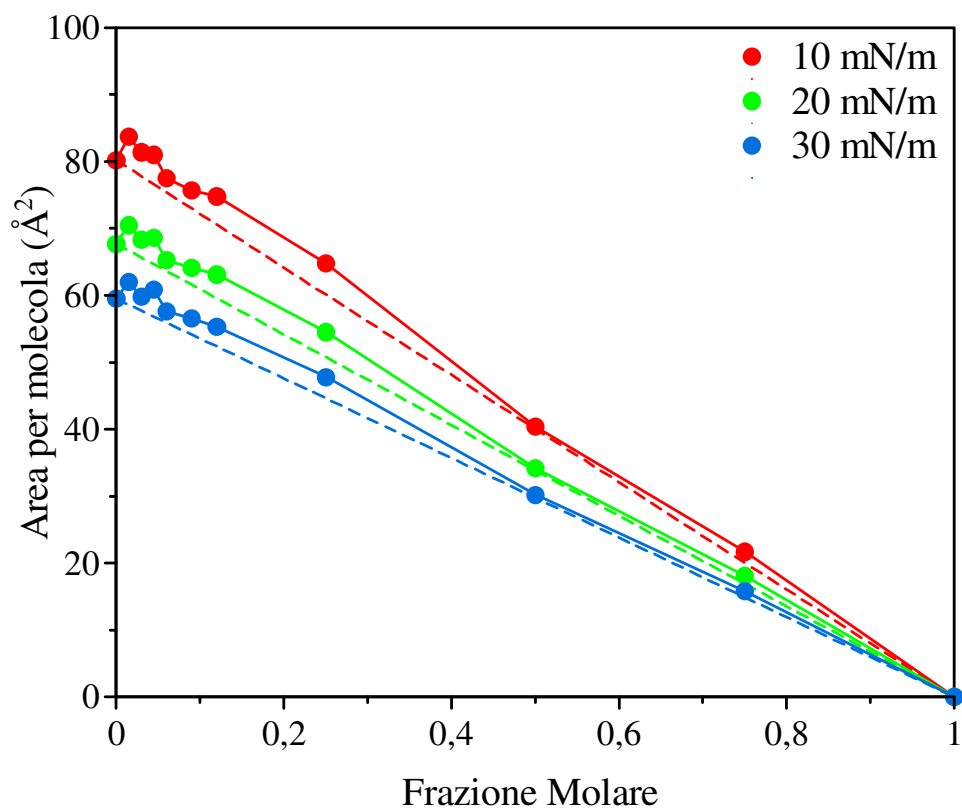


Figura 4.27b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Aciclovir a frazioni molari crescenti di Aciclovir, a 37 °C.

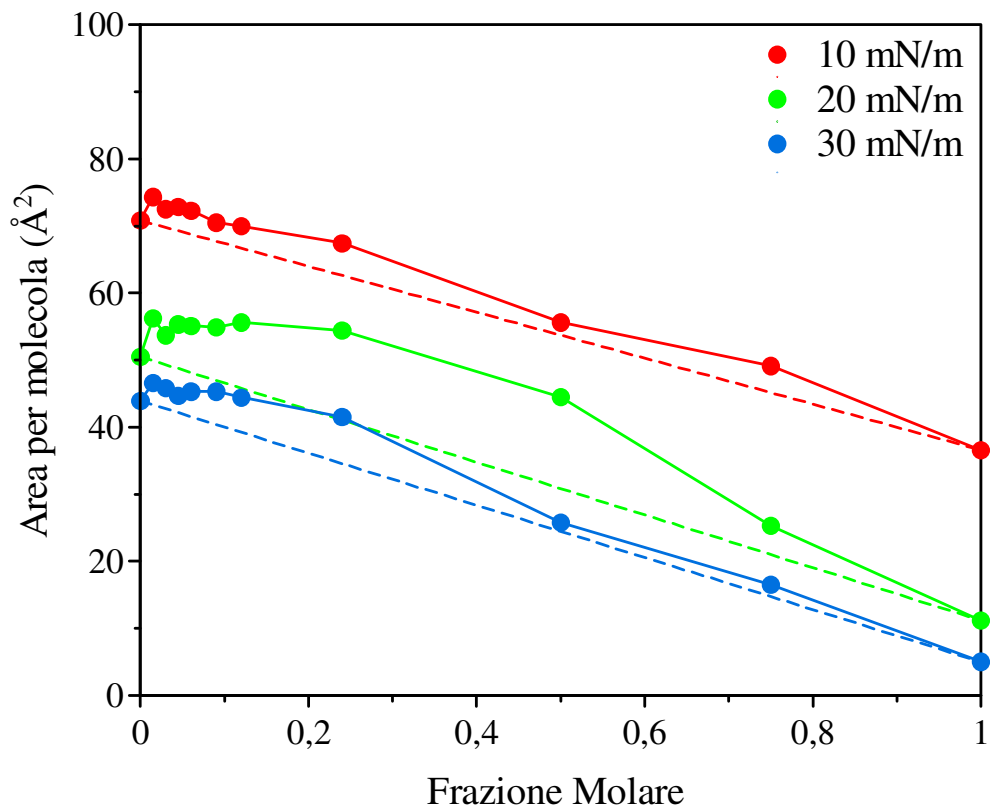


Figura 4.28a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Aciclovir-Squalene a frazioni molari crescenti di Aciclovir-Squalene, a 10 °C.

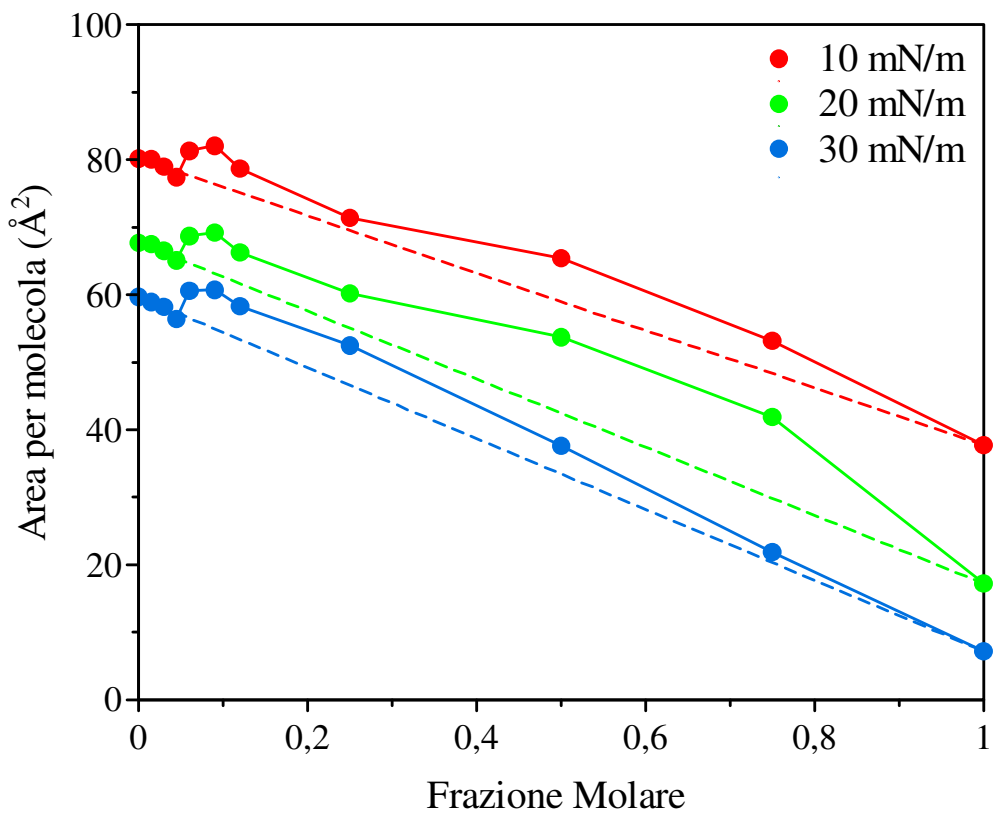


Figura 4.28b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Aciclovir-Squalene a frazioni molari crescenti di Aciclovir-Squalene, a 37 °C.

Le Figure 4.29 a – b mostrano i valori di area per molecola delle miscele DMPC/AraC in funzione della frazione molare di AraC alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Per le miscele DMPC/AraC alla temperatura di 10 °C, considerando la pressione di 10 e di 30 mN/m, si osserva che, per basse frazioni molari, i valori sperimentali di area per molecola sono pressoché sovrapponibili a quelli ideali; dalla frazione molare 0,09 si osserva, invece, una deviazione positiva dei valori di area per molecola. Tale deviazione è maggiore alla pressione di 20 mN/m. Questo comportamento è indice dell'instaurarsi di piccole interazioni repulsive fra DMPC e AraC per le frazioni molari più alte a 10, 30 e, soprattutto a 20 mN/m. Alla temperatura di 37 °C, per tutte le pressioni considerate, si nota una sovrapponibilità dei valori di area per molecola sperimentali a quelli ideali, fino alla frazione molare 0,045, dalla frazione 0,06 in poi si ha una piccola deviazione positiva dei valori di area molecolare che diventa più evidente al crescere della frazione molare di AraC presente nella miscela. Questi risultati indicano interazioni repulsive tra le molecole del bilayer misto per tutte le frazioni molari.

Le Figure 4.30 a – b mostrano i valori di area per molecola delle miscele DMPC/AraC-Squalene in funzione della frazione molare di AraC-Squalene alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. I valori delle miscele DMPC/AraC-Squalene alla temperatura di 10 °C indicano una deviazione positiva per tutte le frazioni molari di AraC-Squalene soprattutto alla pressione superficiale di 20 mN/m.

Anche alla temperatura di 37 °C, già dalle basse frazioni molari si può osservare una piccola deviazione positiva che diviene molto più evidente ad alte frazioni molari.

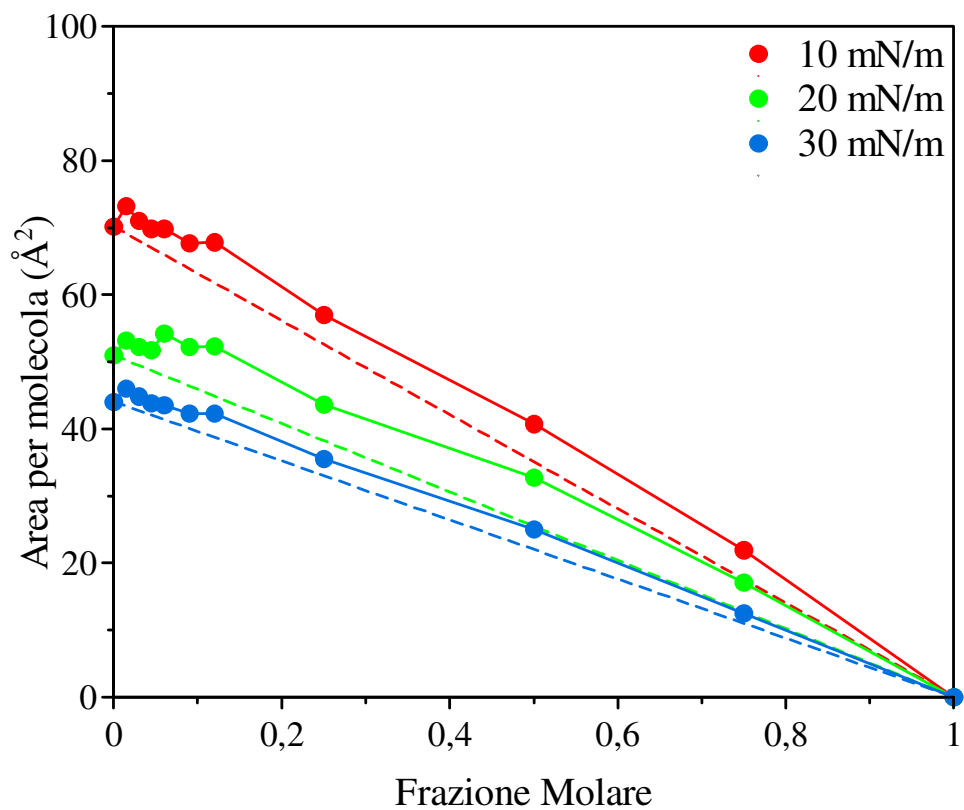


Figura 4.29a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/AraC a frazioni molari crescenti di AraC, a 10 °C.

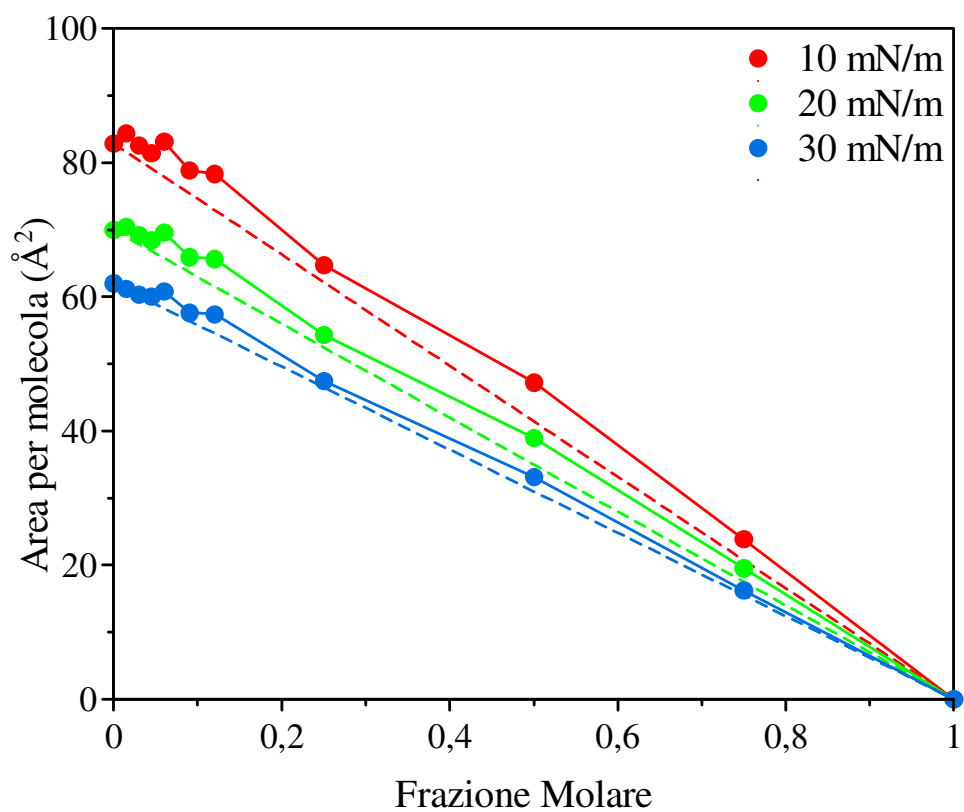


Figura 4.29b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/AraC a frazioni molari crescenti di AraC, a 37 °C.

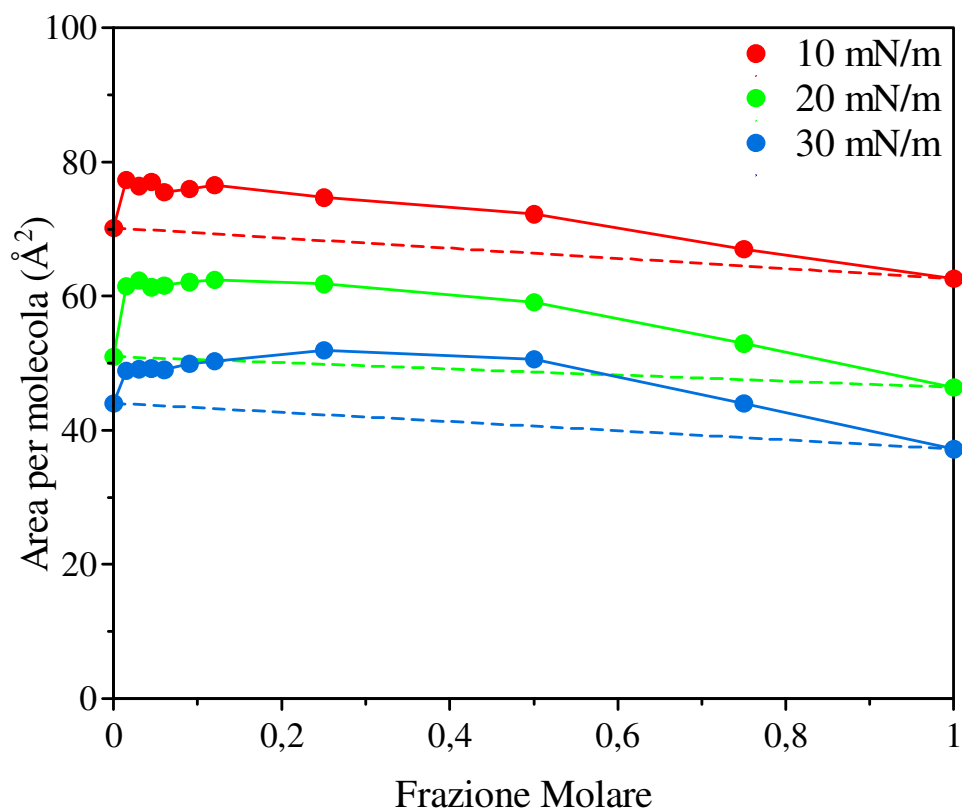


Figura 4.30a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/AraC-Squalene a frazioni molari crescenti di AraC-Squalene, a 10 °C.

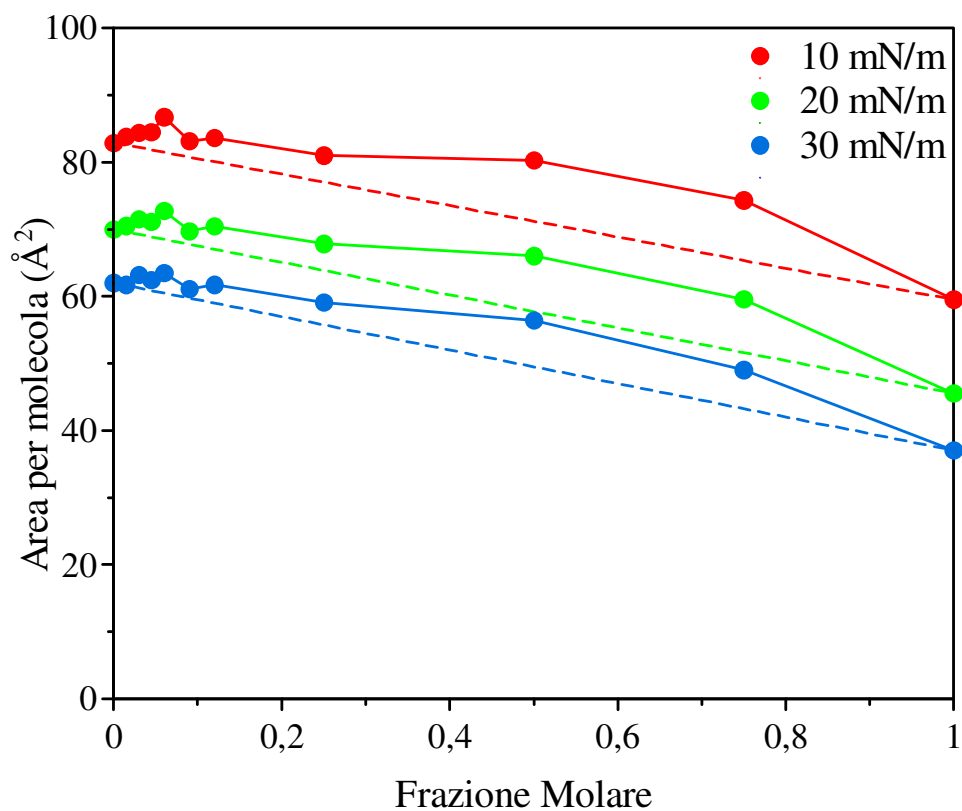


Figura 4.30b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/AraC-Squalene a frazioni molari crescenti di AraC-Squalene, a 37 °C.

Le Figure 4.31 a - b mostrano i valori di area per molecola dei monolayers delle miscele DMPC/Paclitaxel in funzione della frazione molare di Paclitaxel a tre diverse pressioni superficiali, (10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m) registrati a 10 e a 37 °C.

Gli esperimenti effettuati a 10 °C mostrano che il Paclitaxel provoca una deviazione positiva rispetto ai valori ideali. Tale deviazione inizia già alla frazione molare 0,015 e subisce poi un lieve decremento alle frazioni molari 0,06 e 0,09 per poi aumentare nuovamente e mantenersi costante per le frazioni molari più elevate. Questo comportamento è evidente per le pressioni superficiali di 10 e 20 mN/m, mentre a 30 mN/m è possibile notare quasi una sovrapposizione dei valori sperimentali con quelli ideali. Gli esperimenti effettuati alla temperatura di 37 °C mostrano che il Paclitaxel, già alle frazioni molari più basse, causa deviazioni positive rispetto alla retta ideale che indicano lievi interazioni negative tra le molecole del farmaco e quelle della DMPC. Tali deviazioni positive sono più evidenti a 10 mN/m.

Le Figure 4.32 a - b mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/Paclitaxel-Squalene in funzione della frazione molare di Paclitaxel-Squalene alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

Alla temperatura di 10 °C, il prodrug provoca deviazioni positive rispetto alla retta ideale, che diventano più evidenti per le frazioni molari più alte alla pressione superficiale di 10 mN/m. Analogo comportamento è osservabile a 20 mN/m anche se a partire dalla frazione molare 0,25 si nota una diminuzione dei valori di area per molecola. A 30 mN/m per frazioni molari più basse si ha una sovrapposizione dei valori sperimentali a quelli della retta ideale; alla frazione molare 0,25 si ha una lieve deviazione positiva ma per le frazioni molari più alte si hanno deviazioni negative rispetto alla retta tratteggiata. Un analogo comportamento del Paclitaxel-Squalene si ha alla temperatura di 37 °C anche se le deviazioni dalla retta ideale sono meno evidenti.

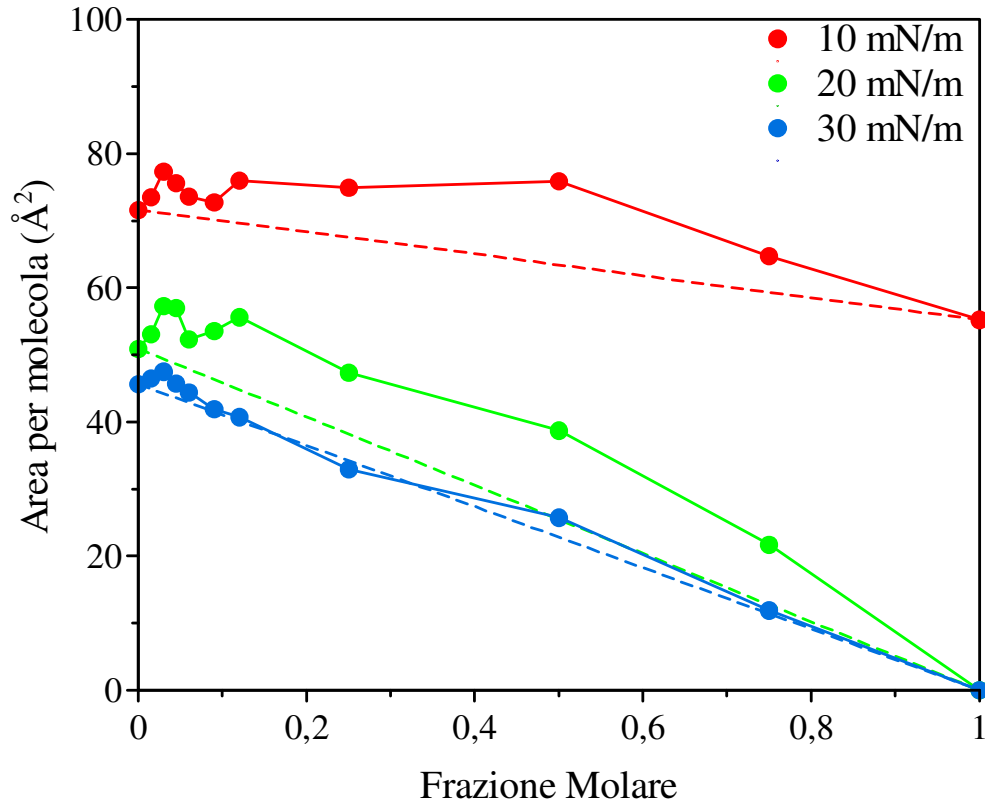


Figura 4.31a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Paclitaxel a frazioni molari crescenti di Paclitaxel, a 10 °C.

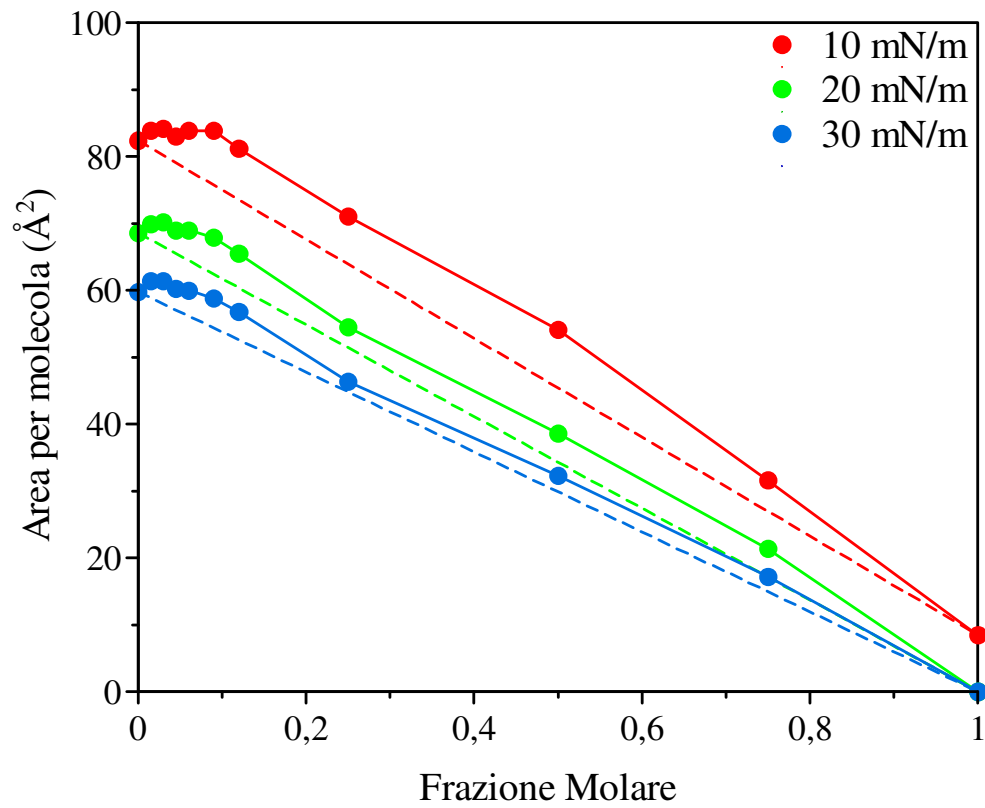


Figura 4.31b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Paclitaxel a frazioni molari crescenti di Paclitaxel, a 37 °C.

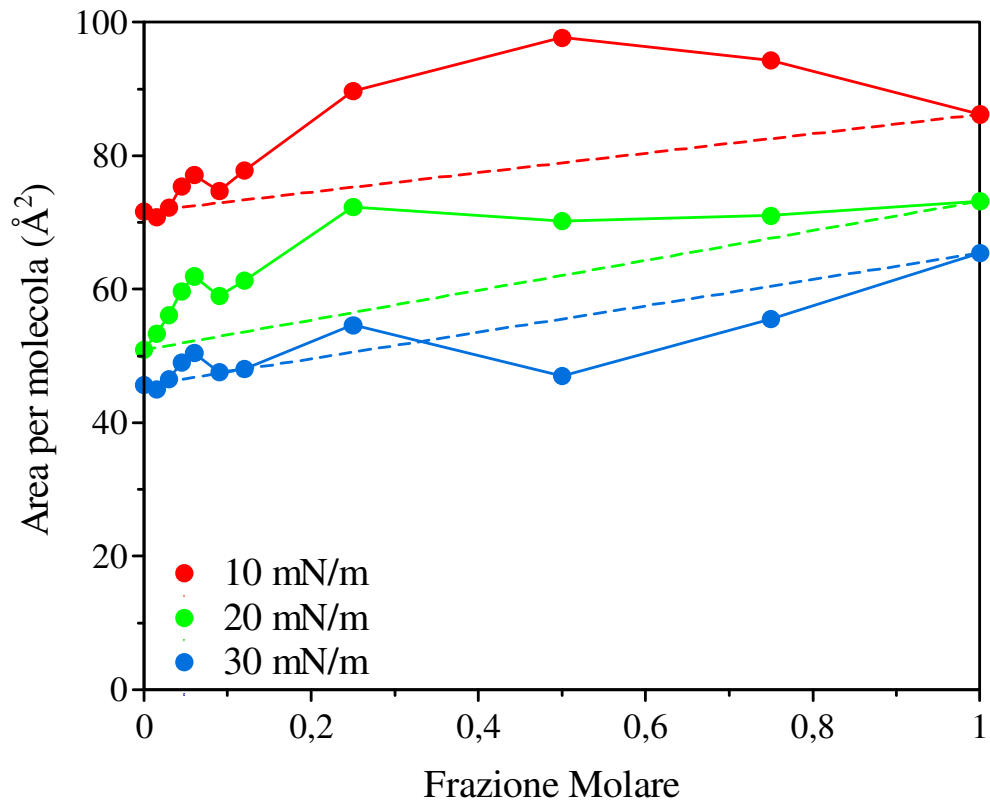


Figura 4.32a. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Paclitaxel a frazioni molari crescenti di Paclitaxel-Squalene, a 10 °C.

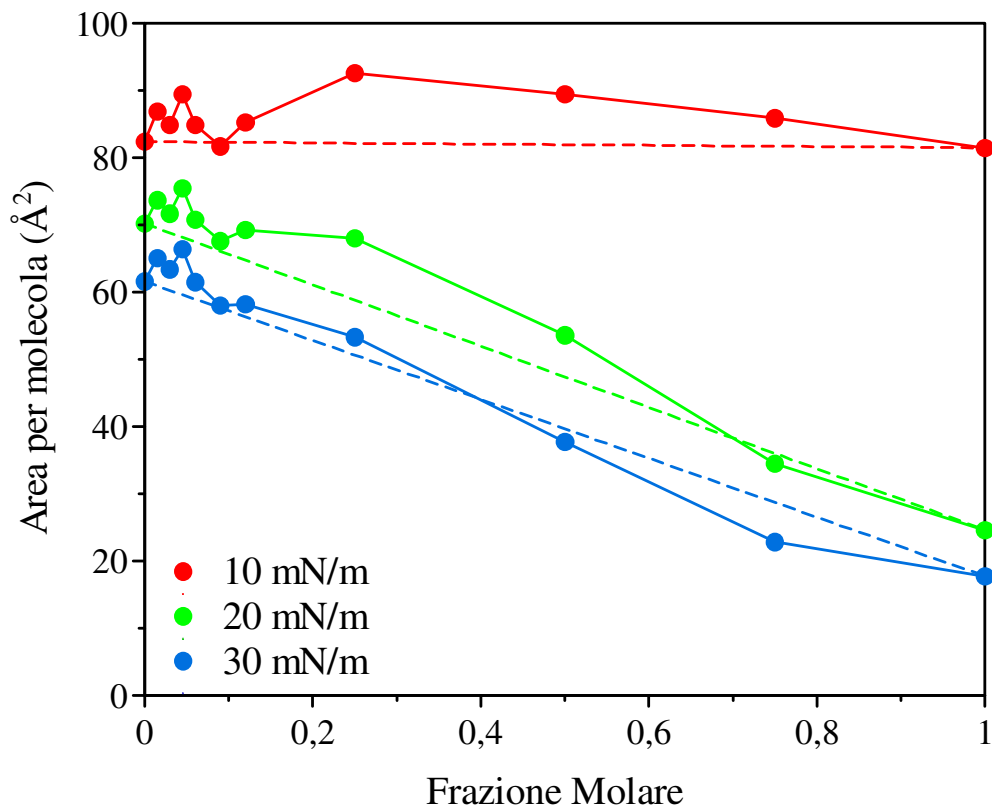


Figura 6.32b. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Paclitaxel a frazioni molari crescenti di Paclitaxel-Squalene, a 37 °C.

CAPITOLO 5

Assorbimento di idrocarburi policiclici aromatici nitrosostituiti attraverso modelli di biomembrana: effetto della lipofilia del mezzo.

5.1. Idrocarburi Policiclici Aromatici Nitrosostituiti (nitro-IPA)

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici nitrosostituiti (nitro-IPA) sono prodotti diretti o indiretti della combustione incompleta degli IPA essi contengono due o più anelli aromatici condensati sono, quindi, costituiti da atomi di carbonio ed idrogeno (*Pitts J.N. et al., 1978; Li Y.S. et al., 2000*). Solo alcuni nitro-IPA (nitronaftalene 1,5-dinitronaftalene, 1,8-dinitronaftalene e 5-nitroacenaftene) sono prodotti industrialmente, in quanto sono impiegati come intermedi per la produzione di sostanze come i coloranti.

I nitro-IPA sono presenti nell'ambiente come miscele di IPA ed un centinaio di altri composti organici, sia liberi nell'aria che adsorbiti a materiale particolato, (*Ohnishi Y. et al., 1985*). Essi sono insolubili o poco solubili in acqua ma molto solubili nei solventi organici. Questi composti sono stati ritrovati anche nelle emissioni d'impianti riscaldanti al cherosene, e nei bruciatori di benzina e GPL. Nonostante un'ampia varietà di batteri, funghi e alghe degradino gli IPA contenenti da due a cinque anelli, quelli nitrosostituiti sono solo parzialmente degradati da microrganismi e possono persistere nel suolo e nei sedimenti. La persistenza dei nitro-IPA ad alto peso molecolare è dovuta oltre che al forte assorbimento al materiale organico del suolo, alla loro bassa solubilità, all'elevato peso molecolare e al carattere polare del nitro gruppo (*Malejka-Giganti D., et al., 1999; Purohit V. and Basu A.K., 2000*).

Diversi studi sono stati eseguiti monitorando alcuni isomeri dei nitro-IPA, infatti, ci sono molte evidenze sperimentali che dimostrano la loro azione mutagena sia sulle cellule procariote che eucariote (*Pedersen D.U. et al., 2005*), hanno anche attività carcinogena (*Beije B. and Moller L., 1988; Purohit V. and Basu A.K., 2000; Lewtas J., 2007*), essi vengono metabolizzati in derivati che legano il DNA e le proteine (*King L.C. et al., 1983; Landvik N.E. et al., 2007*), inducono sintesi di DNA non programmata (*Campbell J. et al., 1981*), scambio di cromatidi fratelli (*Marshall T.C. et al., 1982*). Per tali motivi, e per la loro ampia presenza nell'ambiente, questi composti possono rappresentare un rischio per la salute. Per sortire la loro attività mutagena questi composti devono superare la membrana citoplasmatica, in letteratura non sono presenti molti studi riguardanti gli effetti dei nitro-IPA su biomembrane modello (*Castelli F. et al., 2002*) per ciò ci siamo occupati in particolare di alcuni nitro-IPA, 2-nitrofluorene,

2,7-dinitrofluorene e 3-nitrofluorantene (Figura 5.1) che sembrano avere una maggiore importanza nell'impatto ambientale o come agenti cancerogeni.

Per meglio chiarire la relazione tra le strutture degli idrocarburi policiclici aromatici e il loro effetto sulle biomembrane, abbiamo studiato l'influenza dei tre nitro-IPA strutturalmente simili, sopra citati, sul comportamento termotropico di vescicole multilamellari (MLV) di dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), scelti come modelli di membrane biologiche, mediante la calorimetria a scansione differenziale.

Inoltre, sono state studiate le cinetiche di assorbimento dei composti stessi da parte dei modelli di biomembrana, per comprendere l'effetto svolto dall'idrofilia o dalla lipofilia del mezzo in tale processo.

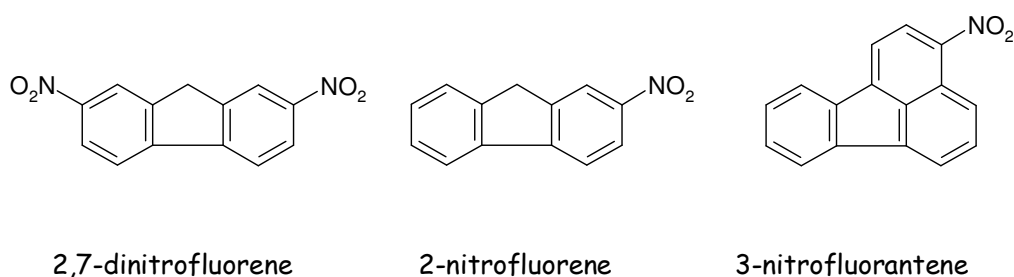


Figura 5.1. Formule di struttura dei composti studiati.

5.2. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata ottenuta dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). La purezza della DMPC, determinata tramite cromatografia su strato sottile ad alta pressione (HPTLC), è 99,0%. La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo presente (*Rouser G. et al., 1970*). 2-nitrofluorene (purezza: 98%) e 3-nitrofluorantene (purezza: 90%) sono stati forniti dalla Sigma (Germania), il 2,7-dinitrofluorene (purezza: 98%) è stato fornito dalla Alfa Aesar (Germania). La soluzione tampone utilizzata consiste di Tris 50 mM, aggiustata a pH = 7,4 con acido cloridrico.

5.3. Interazione MLV DMPC/nitro-IPA

Sono state preparate soluzioni di lipide e nitro-IPA in cloroformio:metanolo 1:1 (DMPC, 2-nitrofluorene, 3-nitrofluorantene) o in cloroformio (2,7-dinitrofluorene). Successivamente appropriate aliquote di lipide e di ognuno dei nitro-IPA sono state

miscelate in tubi da saggio per ottenere 0,010325 mmoli di DMPC e le seguenti frazioni molari di nitro-IPA: 0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15 e 0,18. Quindi sono stati preparati film di DMPC, contenenti i composti in esame, che sono stati in seguito idratati con una soluzione di Tris 50 mM con la stessa procedura descritta in precedenza (Schema 1.1). I campioni sono stati sottoposti ad analisi DSC, eseguita usando un sistema Mettler TA Star^e provvisto di cella DSC 822, i campioni sono stati sottoposti per almeno tre volte (per verificare la riproducibilità dei dati) alla seguente procedura:

- 1) un riscaldamento tra 5 e 37 °C a 2 °C/min;
- 2) un raffreddamento da 37 a 5 °C a 4 °C/min.

È stata impiegata la massima sensibilità possibile ed è stato usato come riferimento una soluzione di Tris(idrossimetil)-amminometano (Tris pH = 7,4; 50 mM).

Il sistema calorimetrico è stato calibrato nella temperatura di transizione e nella variazione di entalpia usando indio, acido stearico e cicloesano seguendo la procedura dello strumento DSC 822 Mettler TA STAR^e.

Dopo l'analisi calorimetrica, aliquote di tutti i campioni sono state estratte dal crogiolo di alluminio e usate per la determinazione dell'esatta quantità di fosfolipide mediante l'analisi del fosforo (*Rouser G. et al., 1970*).

5.4. Cinetiche di permeazione

Un'esatta quantità (corrispondente alla frazione molare 0,09) di composto in esame è stata pesata sul fondo del crogiolo e a questa sono stati aggiunti 120 µl (0,007375 mmoli) di MLV di DMPC (come nello Schema 2.4). Il crogiolo è stato ermeticamente chiuso e sottoposto alla seguente analisi calorimetrica:

- un riscaldamento tra 5 e 37 °C, ad una velocità di 2 °C/min;
- un'isoterma a 37 °C, per un'ora;
- un raffreddamento da 37 a 5 °C, a 4 °C.

La procedura è stata ripetuta per otto volte al fine di rilevare una qualche variazione nelle curve calorimetriche al variare del tempo di incubazione.

5.5. Cinetiche di trasferimento transmembrana

Questi esperimenti sono stati effettuati per studiare l'abilità dei composti in esame di trasferirsi da liposomi di DMPC caricati con una data frazione molare di composto (MLV pieni) a liposomi di sola DMPC (MLV vuoti). Una quantità pari a 60 µl di

liposomi multilamellari di DMPC (0,003687 mmoli) è stata posta in un crogiolo di alluminio di 160 μ l e ad essa sono stati aggiunti 60 μ l di una sospensione equimolare di liposomi multilamellari di DMPC pura (Schema 3.1). Il crogiolo è stato chiuso ermeticamente e sottoposto alla stessa analisi calorimetrica descritta per le cinetiche di permeazione. Se il composto è capace di trasferirsi dai liposomi pieni a quelli vuoti, si avrà un flusso che si arresterà allorché si raggiungerà un equilibrio, ovvero quando tutti i liposomi presenti conterranno la stessa frazione molare di composto, pari a una quella intermedia (0,045) fra le due di partenza (0,00 e 0,09). Si potrà rilevare, alla fine dell'esperimento, un effetto simile a quello ottenuto dall'analisi calorimetrica del campione contenente la frazione molare 0,045 del composto in esame, preparato come descritto nella sezione "Interazione MLV DMPC/nitro-IPA".

5.6. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.6.1. Interazione MLV DMPC/nitro-IPA

I nitro-IPA studiati sono stati selezionati sulla base delle loro proprietà tossiche e delle differenze strutturali, per valutare gli effetti che questa loro differente struttura ha sulle proprietà termotropiche della DMPC come la cooperatività, la variazione della temperatura della pretransizione e della transizione di fase principale e la variazione di entalpia. In Figura 5.2 sono riportate le curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in presenza di crescenti frazioni molari di nitro-IPA. Per quanto riguarda il picco di pretransizione, ci sono grandi differenze tra il 2,7-dinitrofluorene, con due gruppi NO₂, e gli altri composti, con un nitro gruppo. In presenza del 2,7-dinitrofluorene (Figura 5.2 A), il picco di pretransizione è chiaramente evidente per tutte le frazioni molari ma si sposta verso temperature più basse. Nel caso del 2-nitrofluorene (Figura 5.2 B), la pretransizione è scarsamente evidente mentre per il 3-nitrofluorantene (Figura 5.2 C) è evidente fino alla frazione molare 0,03 ed è ampiamente spostato verso più basse temperature. Per quanto concerne il picco principale, il 2,7-dinitrofluorene non causa evidenti variazioni né nella forma né nelle dimensioni per tutte le frazioni molari esaminate, e la temperatura di transizione rimane pressoché invariata; il 2-nitrofluorene causa un decremento del picco principale e la temperatura di transizione diminuisce e poi aumenta nuovamente all'aumentare delle frazioni molari; il 3-nitrofluorantene determina piccoli slargamenti e uno shift del picco principale a più basse temperature.

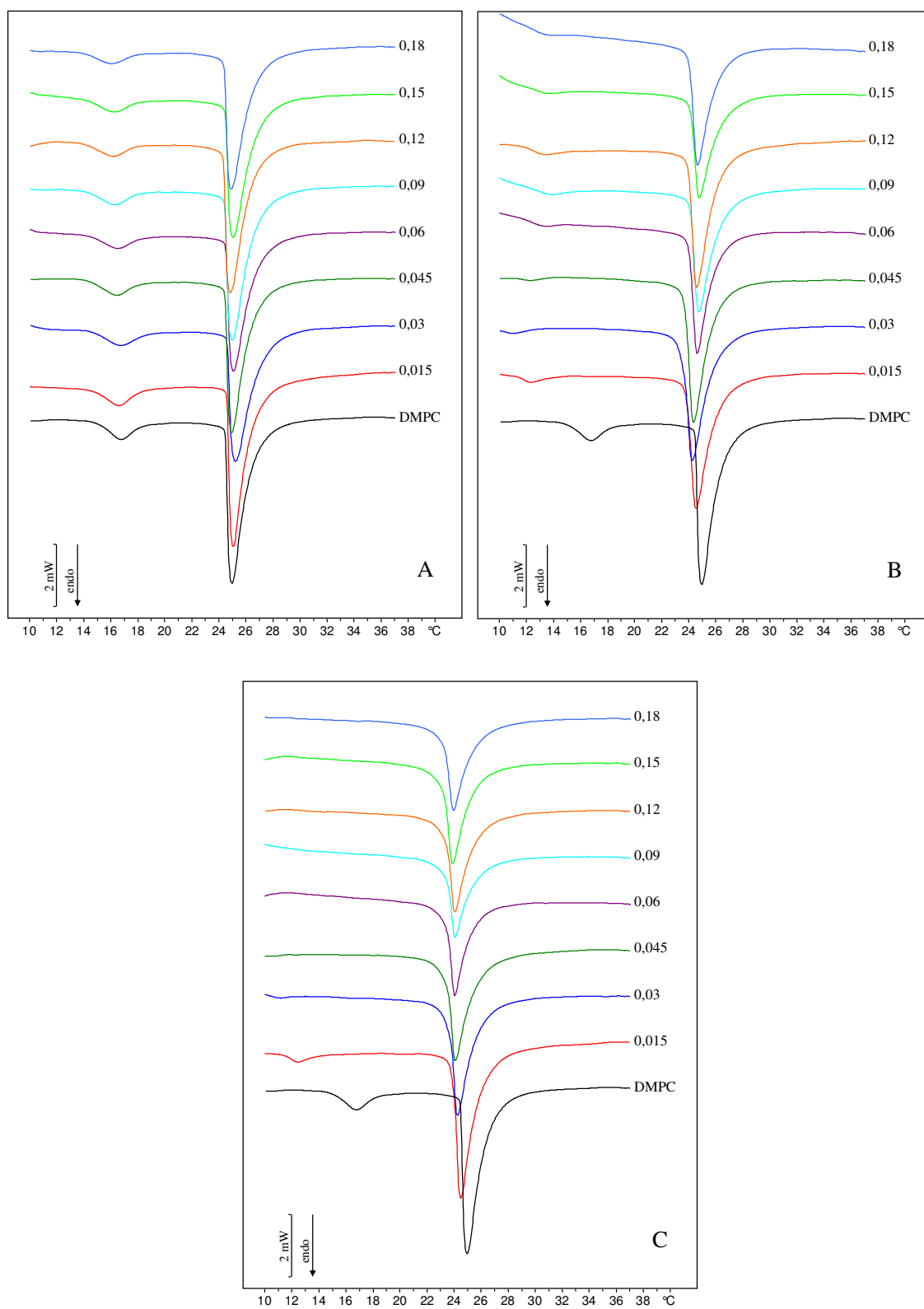


Figura 5.2. Curve calorimetriche in riscaldamento, degli MLV di DMPC preparati in presenza di crescenti frazioni molari di (A) 2,7-dinitrofluorene, (B) 2-nitrofluorene e (C) 3-nitrofluorantene.

L'effetto dei composti studiati sulla temperatura di transizione è mostrato in Figura 5.3 dove la variazione di temperatura è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza dei nitro-IPA e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC) in funzione della frazione molare crescente. Il 2,7-dinitrofluorene esercita il più debole effetto sulla temperatura di transizione, il più forte decremento è causato dal 3-nitrofluorantene, seguito dal 2-nitrofluorene. Una parte del profilo del 2,7-dinitrofluorene è pressoché piatta, per gli altri composti la temperatura di transizione diminuisce fino ad una determinata frazione molare (che è la 0,03 per 2-nitrofluorene e la 0,06 per 3-nitrofluorantene) oltre non sono osservabili variazioni per il 3-nitrofluorantene, mentre per il 2-nitrofluorene la variazione della temperatura di transizione aumenta nuovamente.

E' evidente una chiara relazione tra i composti, la loro struttura e l'interazione con i modelli di biomembrana. Infatti, i derivati del fluorantene esercitano un maggior effetto rispetto ai derivati del fluorene. Inoltre, tra i due derivati del fluorene, il 2-nitrofluorene mostra una più forte interazione con gli MLV di DMPC rispetto al 2,7-dinitrofluorene. Un decremento della T_m indica un aumento della fluidità del doppio strato fosfolipidico, il 3-nitrofluorantene, tra i composti studiati, esercita il massimo effetto fluidificante. All'interno del doppio strato fosfolipidico, i composti possono agire da impurezze interstiziali, intercalandosi tra le molecole di fosfolipidi causando un decremento della T_m e nessun cambiamento nei valori di ΔH , o come impurezze sostituzionali piazzandosi tra le molecole di fosfolipide e causando un decremento della T_m e dell'entalpia (*Jorgensen K. et al., 1991; Tenchov, 1991; Castelli F. et al., 1992*). Il 2,7-nitrofluorene non determina evidenti variazioni nella temperatura di transizione e nella variazione di entalpia (dati non riportati) mentre il 2-nitrofluorene e il 3-nitrofluorantene causano un abbassamento della temperatura di transizione come pure dell'entalpia (dati non mostrati) e quindi è possibile dire che si comportano come impurezze sostituzionali. I risultati ottenuti da queste misure si possono considerare come la massima interazione tra i composti studiati e i modelli di biomembrana e saranno usati come riferimento negli esperimenti successivi.

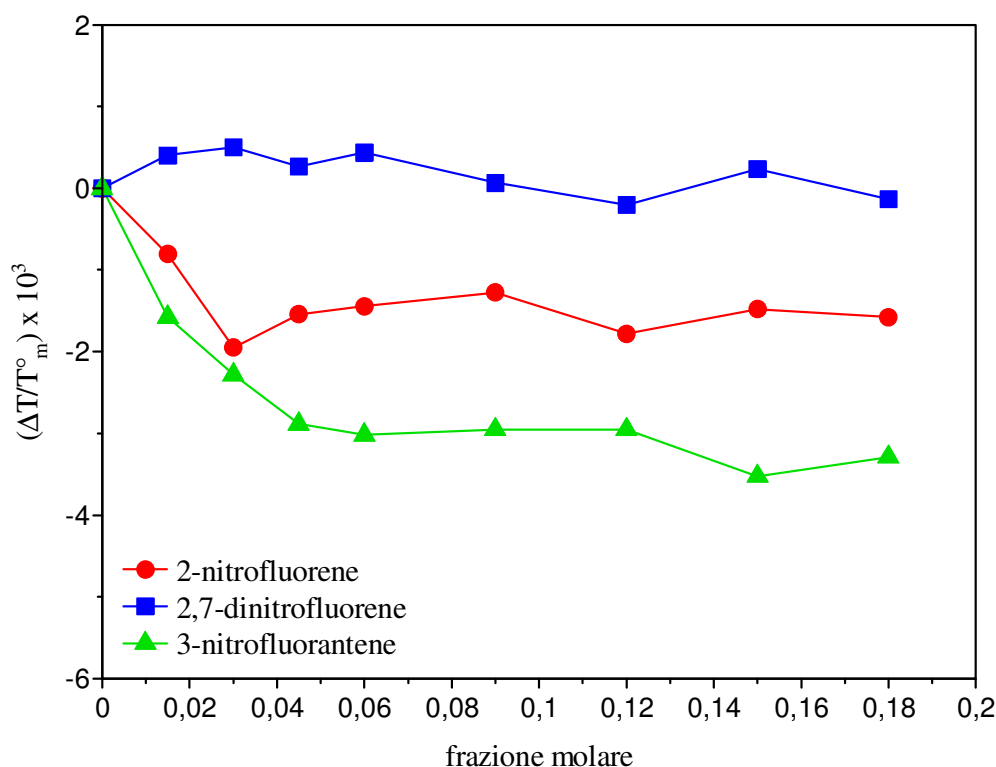


Figura 5.3. Variazione della temperatura di transizione, espressa come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura e T_m è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza dei composti), in funzione della frazione molare di composto nella dispersione degli MLV.

5.6.2. Cinetiche di permeazione

Per avere informazioni sull'assorbimento dei nitro-IPA attraverso le membrane, mediato da un mezzo acquoso, sono stati condotti esperimenti in cui una quantità fissa di nitro-IPA (frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide) è stata pesata sul fondo del crogiolo e addizionata con la dispersione fosfolipidica monitorando così l'interazione tra i nitro-IPA e il doppio strato fosfolipidico all'aumentare del tempo di incubazione. Le curve calorimetriche sono riportate in Figura 5.4. La curva r rappresenta la massima interazione possibile tra i nitro-IPA e il doppio strato fosfolipidico. Se i composti sono capaci di attraversare il mezzo acquoso, raggiungere la superficie degli MLV e interagire con il doppio strato fosfolipidico, le curve calorimetriche dovrebbero assomigliare sempre più alla curva r. Le curve calorimetriche del 2,7-dinitrofluorene (Figura 2.6 A) e 3-nitrofluorantene (Figura 5.4 C) non mostrano alcuna variazione nel picco di pretransizione né in quello principale. Nel caso del 2-nitrofluorene (Figura 5.4 B), si può solo osservare un piccolo decremento del picco di pretransizione, mentre rimane invariato il picco principale; la curva r non è raggiunta.

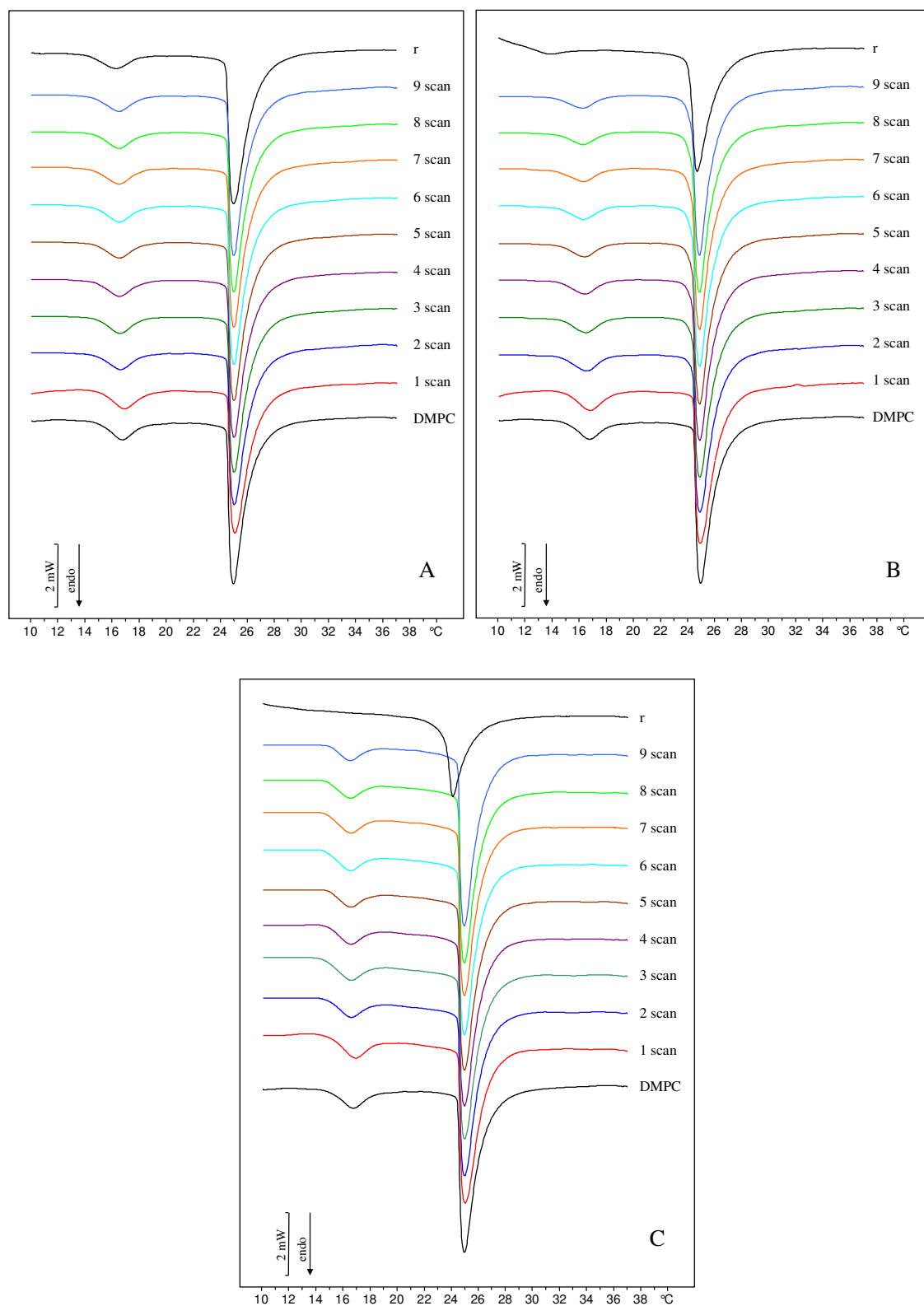


Figura 5.4. Curve calorimetriche in riscaldamento, degli MLV di DMPC lasciati in contatto con la frazione molare 0,09 di (A) 2,7-dinitrofluorene, (B) 2-nitrofluorene e (C) 3-nitrofluorantene a crescenti tempi di incubazione. La curva r appartiene agli MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 di composto.

La temperatura di transizione è stata riportata come $\Delta T/T_m^0$, in Figura 5.5 in funzione del tempo d'incubazione. Al crescere del tempo di incubazione non si notano importanti variazioni ma solo un piccolo decremento della variazione di temperatura di transizione. Dai risultati ottenuti si riscontra che i nitro-IPA studiati, probabilmente per la loro natura altamente lipofila, non sono capaci di dissolversi nel mezzo acquoso e quindi non raggiungono la superficie degli MLV, non interagendo con essi. Quindi, l'assorbimento dei nitro-IPA attraverso le membrane fosfolipidiche è impedito dal mezzo acquoso.

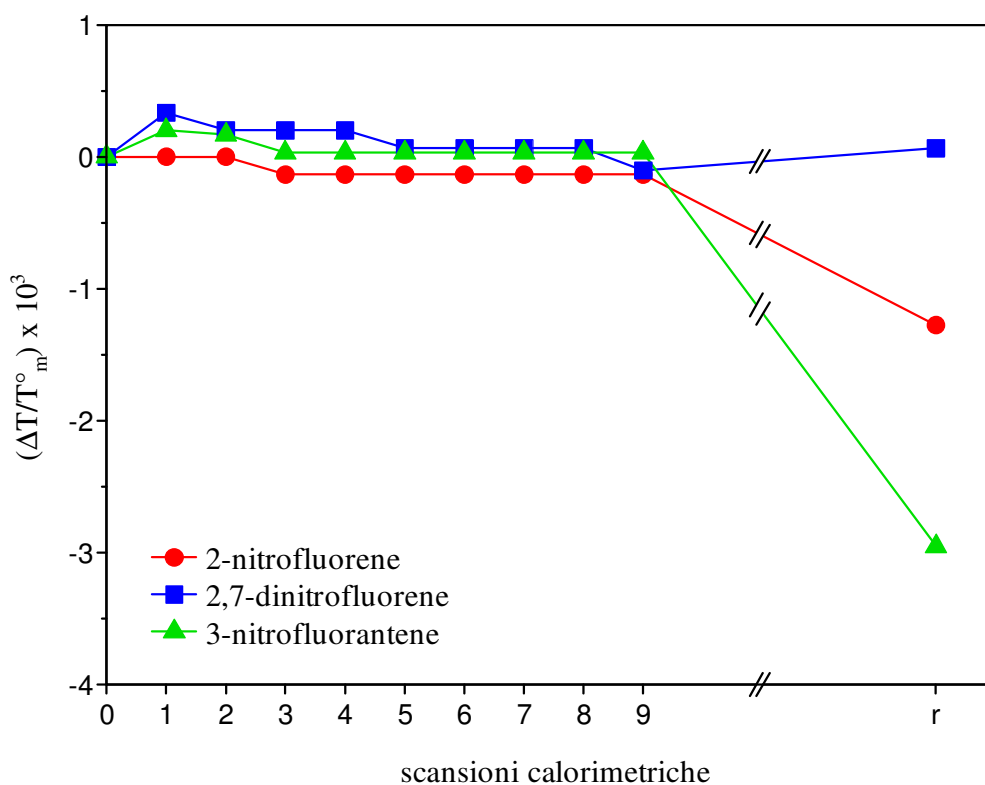


Figura 5.5. Variazione della temperatura di transizione, espressa come $\Delta T/T_m^0$, degli MLV di DMPC lasciati in contatto con la frazione molare 0,09 di composto, in funzione del tempo di incubazione. Il valore r rappresenta la variazione della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 di composto e che può essere considerata la massima interazione tra il composto e gli MLV.

5.6.3. Cinetiche di trasferimento transmembrana

Una serie di esperimenti sono stati condotti per verificare se il mezzo lipofilo può favorire l'assorbimento dei nitro-IPA attraverso i modelli biomembrana. A questo scopo, i nitro-IPA caricati negli MLV di DMPC (frazione molare 0,09), che mimano il

mezzo lipofilo, sono stati messi a contatto con MLV vuoti ed è stato monitorato il trasferimento dei nitro-IPA dagli MLV carichi agli MLV vuoti mediante analisi DSC a tempi di incubazione crescenti. Le curve calorimetriche sono state comparate con quelle degli MLV preparati in presenza dei nitro-IPA alla frazione molare 0,045 che è considerata la curva di riferimento (curva r) (Figura 5.6). Se il nitro-IPA si trasferisce completamente dagli MLV carichi a quelli vuoti alla fine del processo tutti gli MLV dovranno contenere una frazione molare di composto pari alla 0,045 e quindi si dovrebbe ottenere una curva finale quanto più simile alla curva r. Per quanto concerne il 2,7-dinitrofluorene (Figura 5.6 A) non sono osservabili importanti variazioni, infatti, sia il picco di pretransizione che quello principale rimane invariato. Le curve calorimetriche relative al 2-nitrofluorene (Figura 5.6 B) mostrano la scomparsa del picco di pretransizione già alla prima scansione ed uno shift del picco principale verso temperature più basse, raggiungendo la curva r. Simile è il comportamento del 3-nitrofluorantene (Figura 5.6 C): infatti, il picco di pretransizione non è più presente dalla seconda scansione (dopo un'ora di incubazione) ed il picco principale si sposta a più basse temperature. La curva r è quasi raggiunta.

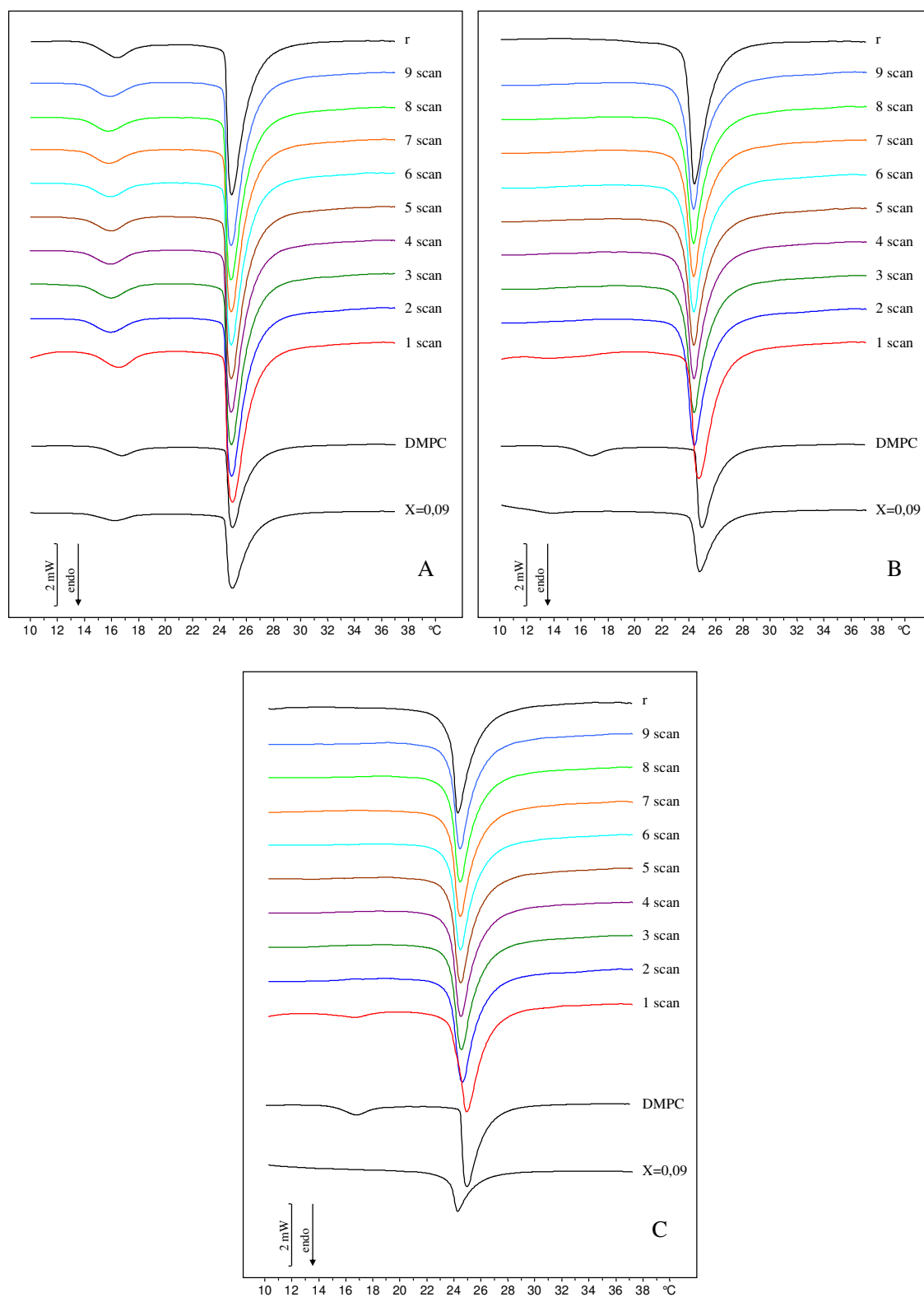


Figura 5.6. Curve calorimetriche in riscaldamento, degli MLV di DMPC lasciati in contatto con una quantità equimolare di MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 di (A) 2,7-dinitrofluorene, (B) 2-nitrofluorene e (C) 3-nitrofluorantene a crescenti tempi di incubazione. Le curve r appartengono agli MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,045 dei composti.

La temperatura di transizione di queste curve è riportata in Figura 5.7, come $\Delta T/T_m^0$, in funzione del tempo di incubazione. Il valore r rappresenta i risultati ottenuti dalle curve preparate in presenza della frazione molare 0,045 di composto. Una linea quasi piatta si ottiene per il 2,7-dinitrofluorene. Per quanto riguarda il 2-nitrofluorene, durante la prima ora d'incubazione, la temperatura di transizione diminuisce notevolmente e poi rimane costante, ad ogni modo il valore r è pressoché raggiunto. Per il 3-nitrofluorantene, la temperatura di transizione decresce gradualmente fino a cinque ore d'incubazione, poi rimane costante senza raggiungere il valore r. Questi risultati suggeriscono che i nitro-IPA si trasferiscono dagli MLV carichi a quelli vuoti e quindi che il loro assorbimento attraverso le membrane modello è favorito dal mezzo lipofilo piuttosto che da quello acquoso.

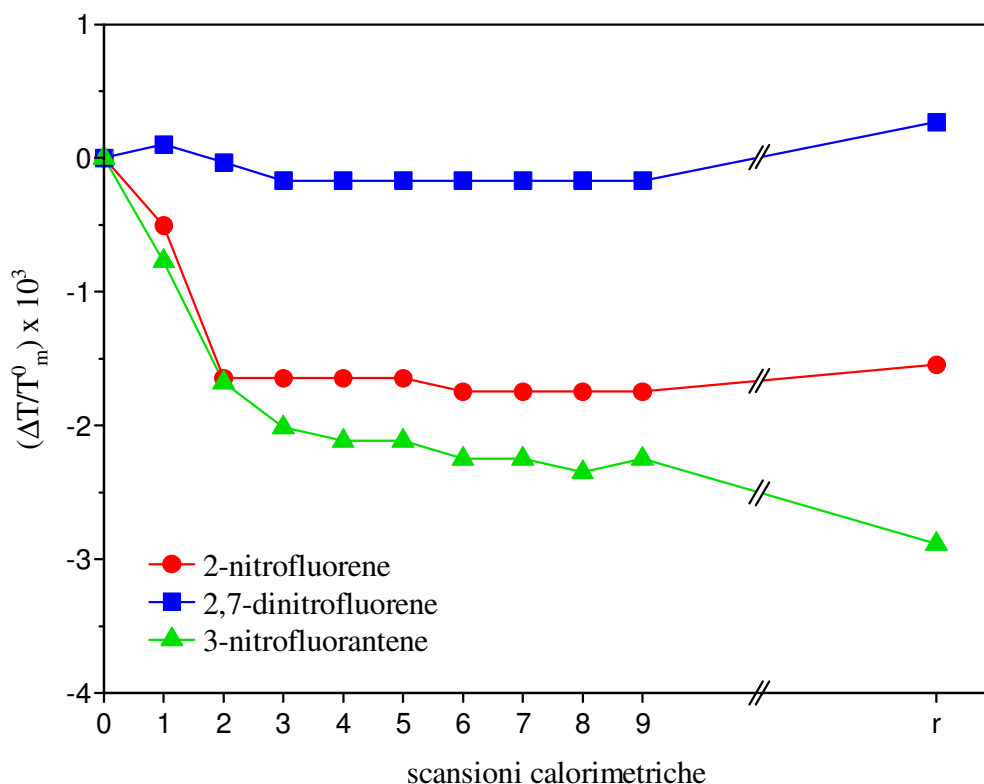


Figura 5.7. Variazione della temperatura di transizione, espressa come $\Delta T/T_m^0$, degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con una quantità equimolare di MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,09 di composto, in funzione del tempo di incubazione. Il valore r rappresenta la temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza della frazione molare 0,045 di composto che può essere considerata la massima interazione tra il composto e gli MLV.

5.7. CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata studiata l'interazione di 2,7-dinitrofluorene, 2-nitrofluorene e 3-nitrofluorantene con modelli di biomembrana allo scopo di rilevare la relazione tra le differenze strutturali dei composti studiati e gli effetti sulle membrane modello. Dai risultati ottenuti possiamo dedurre: (a) il seguente ordine d'interazione: 3-nitrofluorantene>2-nitrofluorene>2,7-dinitrofluorene; (b) uno scarso assorbimento dei nitro-IPA attraverso i modelli di biomembrana nel mezzo acquoso (c) un notevole assorbimento dei nitro-IPA attraverso i modelli biomembrana mediato dal mezzo lipofilo.

CAPITOLO 6

Interazione di cumarine con biomembrane modello: studio mediante Calorimetria a Scansione Differenziale e Langmuir-Blodgett

6.1 Le cumarine

Da secoli molte sostanze fitochimiche attive sono state utilizzate per scopi medicinali, ed ancora oggi si assiste ad un grande interesse per l'uso delle erbe come rimedi. Circa un terzo dei farmaci più venduti nel mondo sono prodotti naturali o loro derivati; inoltre, sono ampiamente riconosciuti nel settore farmaceutico per la loro ampia diversità strutturale, come pure per la loro vasta gamma di attività farmacologiche. Tra le molecole di origine naturale, le cumarine rappresentano un gruppo eterogeneo di composti aventi diverse proprietà farmacologiche e terapeutiche, sono molto rappresentate nel regno vegetale (*Egan D. et al., 1990; Egan D. and O'Kennedy R. 1992; Finn G. et al., 2002*), specialmente nelle *Rutaceae* e nelle *Umbelliferae* (*Keating G. and O'Kennedy R., 1997*) e ciò sembra essere correlato alla loro capacità di agire come *fitoalessine*, vale a dire sostanze che si formano, nel corso del processo di appassimento, in risposta ad una lesione traumatica delle piante, si accumulano sulla superficie delle foglie, frutti e semi e inibiscono la crescita e la sporulazione dei funghi patogeni e agiscono come repellenti contro gli scarafaggi e altri invertebrati terrestri. Le cumarine sono attive anche nel metabolismo vegetale partecipando alla regolazione della crescita della pianta (*Weimann I. 1997; Matern U. et al., 1999*). Le cumarine appartengono ad un gruppo di composti noti come benzopirani, ognuno dei quali è costituito da un anello benzenico unito ad un pirone. (*Keating G.J. and O'Kennedy R., 1997*). Tutte le cumarine presenti in natura derivano dall'1-benzopirano-2-pirone e sono presenti sia in forma libera che glicosidica (eterosidi). Sono contenute in diverse parti della pianta, soprattutto nelle foglie, nei frutti, nei semi e nelle radici.

La cumarina, in seguito a somministrazione orale, viene rapidamente assorbita nel tratto gastrointestinale ed estesamente metabolizzata nel fegato, solo una percentuale compresa tra il 2-6 % raggiunge la circolazione sistemica intatta (*Keating G.J. and O'Kennedy R., 1997*). Tra le attività farmacologiche delle cumarine possiamo elencare: attività vasodilatatrice, antiproliferativa, (*Chen Y.L. et al., 1994*), antimicrobica, analgesica (*Soine T.O., 1964*), antitumorale (*Fujioka T. et al., 1999*) ed antiossidante (*Shaw C.Y. et al., 2003*).

Lo scopo del lavoro è quello di acquisire informazioni sull'interazione della Scopoletina (7-idrossi-6-metossi-2H-1-benzopirano-2-one), dell'Esculetina (6,7-diidrossi-2H-1-benzopirano-2-one) e dell'Esculina (6-(β -D-glucopiranosilossi)-7-idrossi-2H-1-benzopirano-2-one), (Figura 6.1) con modelli di biomembrana mediante la tecnica della Calorimetria a Scansione Differenziale e di Langmuir-Blodgett.

Poiché è stato dimostrato che le cumarine sono completamente assorbite nel tratto gastrointestinale dopo somministrazione orale (*Lacy A. and O'Kennedy R., 2004*) le misure sono state condotte a pH 4 scelto poiché è il pH più vicino a quello gastrico considerando che, in un ambiente fortemente acido ($\text{pH} \leq 3$), l'impacchettamento delle catene del fosfolipide (DMPC) si modifica (*Tocanne J.F. and Teissière J., 1990*).

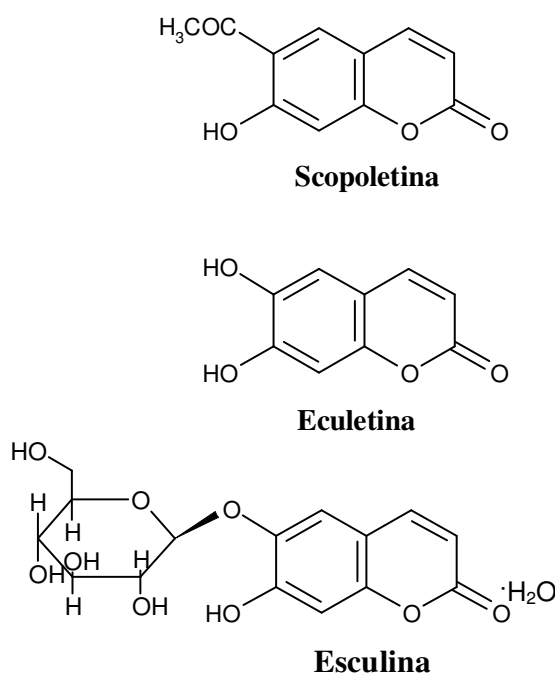


Figura 6.1. Formule di struttura delle cumarine studiate.

6.2. Interazione MLV DMPC/cumarine

Sono state preparate soluzioni di DMPC e dei composti in esame in cloroformio/metanolo 1:1 v:v, successivamente appropriate aliquote di lipide e di ognuno dei derivati cumarinici sono state miscelate in tubi da saggio per ottenere 0,010325 mmoli di DMPC e le seguenti frazioni molari di cumarine: 0,00; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09. Quindi sono stati preparati film di DMPC, contenenti i composti in esame, che sono stati idratati con una soluzione di Tris 50 mM, con la stessa procedura

descritta in precedenza (Schema 1.1). I campioni sono stati sottoposti ad analisi consistente in una scansione in riscaldamento da 5 a 37 °C a 2 °C/min e ad una scansione in raffreddamento da 37 a 5 °C a 4 °C/min, per tre volte. I valori di T_m e ΔH (rispetto al fosfolipide puro) che si ottengono sono i parametri di riferimento per indicare l'effetto che una determinata frazione molare di composto causa sui liposomi di DMPC.

6.3. Cinetiche di permeazione

Queste misure sono state effettuate per verificare la capacità dei composti di attraversare il mezzo acquoso, interagire con le membrane modello ed eventualmente penetrare nelle stesse. Tali esperienze sono state eseguite ponendo aliquote di 120 μ l di sospensione acquosa di MLV di DMPC in crogioli di alluminio da 160 μ l, sul cui fondo era presente una quantità pesata dei composti tali da avere una frazione molare $X = 0,09$ dei campioni rispetto al fosfolipide. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a leggera agitazione per 10 secondi, e quindi a cicli calorimetrici consistenti di tre step:

- 1) una scansione in riscaldamento da 5 a 37 °C (2 °C/min);
- 2) un periodo di incubazione isoterma per 60 minuti a 37 °C;
- 3) una fase di raffreddamento da 37 °C a 5 °C (4°C/min) per poi poter ripetere il ciclo dal primo step, per almeno otto volte (come nello Schema 2.4).

6.4. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)

Le misure di tensione superficiale sono state eseguite con un sistema KSV Minitrough fornito dalla KSV Instruments LTd Finlandia.

Per formare il monolayer sono state preparate soluzioni di DMPC, Scopoletina, Esculetina ed Esculina in cloroformio, e miscele di DMPC/Scopoletina, DMPC/Esculetina, DMPC/Esculina, in opportune frazioni molarie (0,0; 0,024; 0,048; 0,09; 0,17; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0) le quali sono state depositate sulla superficie della subfase mediante una microsiringa Hamilton previamente pulita per tre volte con cloroformio, avvinata con la soluzione in esame e riempita fino ad un volume di 30 μ l delle soluzioni dei componenti puri e delle soluzioni miste. Si è lasciato riposare il monolayer per 15 minuti, per permettere l'evaporazione del solvente. Il volume di soluzione impiegato è tale da compiere tutte le esperienze deponendo lo stesso numero

di molecole sulla subfase. Per assicurarsi della riproducibilità del lavoro l'esperienza è stata ripetuta per almeno 3 volte. Le misure sono state eseguite a pH 4,0 ed alla temperatura di 37 °C, (superiore rispetto alla temperatura di transizione del fosfolipide) allo scopo di avere un monolayer con le caratteristiche di una membrana allo stato fluido. La variazione dell'area superficiale a disposizione delle molecole deposte è ottenuta grazie al movimento delle barriere, poste sul frame della vaschetta, che si muovono simmetricamente con una velocità di 10 mm/minuto.

6.5. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.5.1. Interazione fra MLV DMPC/cumarine

Le curve calorimetriche ottenute dall'analisi delle vescicole di DMPC pura e contenenti frazioni molari crescenti dei composti in esame sono mostrate in Figura 6.2.

Per quanto riguarda la Scopoletina, il picco di pretransizione scompare già alla più bassa concentrazione di composto. Com'è possibile evincere dalle curve, la Scopoletina, determina dei piccoli spostamenti del picco calorimetrico principale verso più basse temperature ed un altrettanto piccola variazione dell'entalpia del sistema all'aumentare della frazione molare. Anche nel caso dell'Esculetina, il picco di pretransizione scompare già alla frazione molare 0,015. All'aumentare della frazione molare di composto, il picco principale si sposta verso temperature più basse e a tale spostamento si associa uno slargamento dei picchi calorimetrici. Alla frazione molare 0,09 si nota una separazione di fase che indica una distribuzione non uniforme dell'Esculetina negli MLV di DMPC con la formazione di zone più ricche e di zone meno ricche di composto. Infine, nelle curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in presenza di Esculina a varie frazioni molari, si può evidenziare che il picco di pretransizione, all'aumentare della frazione molare, si attenua fino a scomparire alla frazione molare 0,045. L'Esculina, provoca un leggero spostamento del picco principale verso temperature più basse, mentre la forma dei picchi calorimetrici rimane pressoché invariata per tutte le frazioni molari.

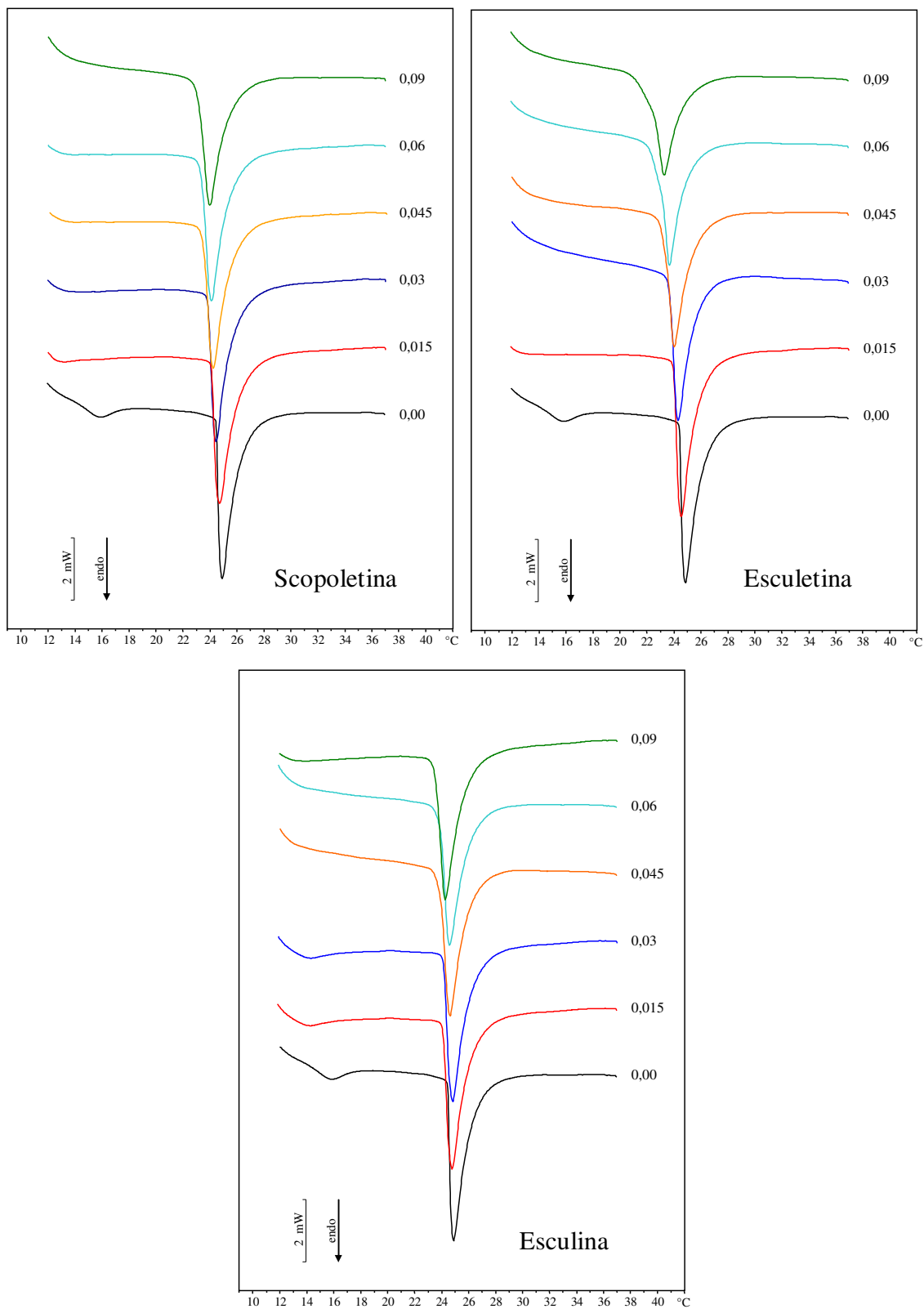


Figura 6.2. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in presenza di frazioni molari crescenti delle cumarine in esame.

La Figura 6.3 mostra l'andamento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina, Esculina, riportata come $\Delta T/T_m^0$ in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV, dove: $\Delta T = T_m - T_m^0$ (T_m = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati; T_m^0 = temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura).

Tutti i composti, ma in misura differente, determinano un decremento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC, all'aumentare della loro frazione molare. I risultati mostrano che, tra le tre molecole, l'Esculetina provoca la maggiore variazione dei parametri termotropici, mentre l'Esculina è quella che destabilizza meno il bilayer fosfolipidico di DMPC.

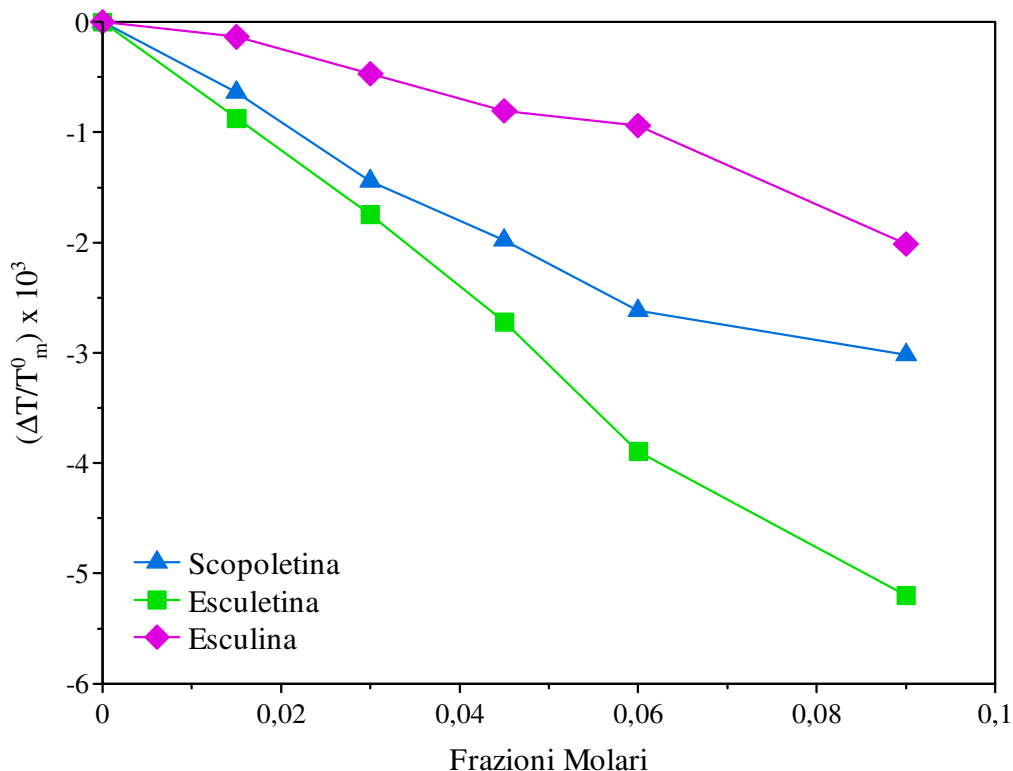


Figura 6.3. Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina a frazioni molari crescenti. La variazione della temperatura di transizione è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione della frazione molare presente nella dispersione acquosa.

La Figura 6.4 mostra l'andamento dell'entalpia degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina. La variazione dell'entalpia è riportata come $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV dove: $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$ (ΔH = entalpia degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati; ΔH^0 = entalpia degli MLV di DMPC pura) Tutte e tre le cumarine provocano un abbassamento dell'entalpia, comportamento caratteristico di composti che interagiscono e destabilizzano il bilayer fosfolipidico degli MLV di DMPC.

Il decremento della T_m e del ΔH ci consente di concludere che tutti i composti esaminati interagiscono con il bilayer fosfolipidico causandone la fluidificazione; l'Esculina, essendo la meno lipofila si posiziona vicino alle teste polari per cui tra i tre composti è quella che causa il minor effetto.

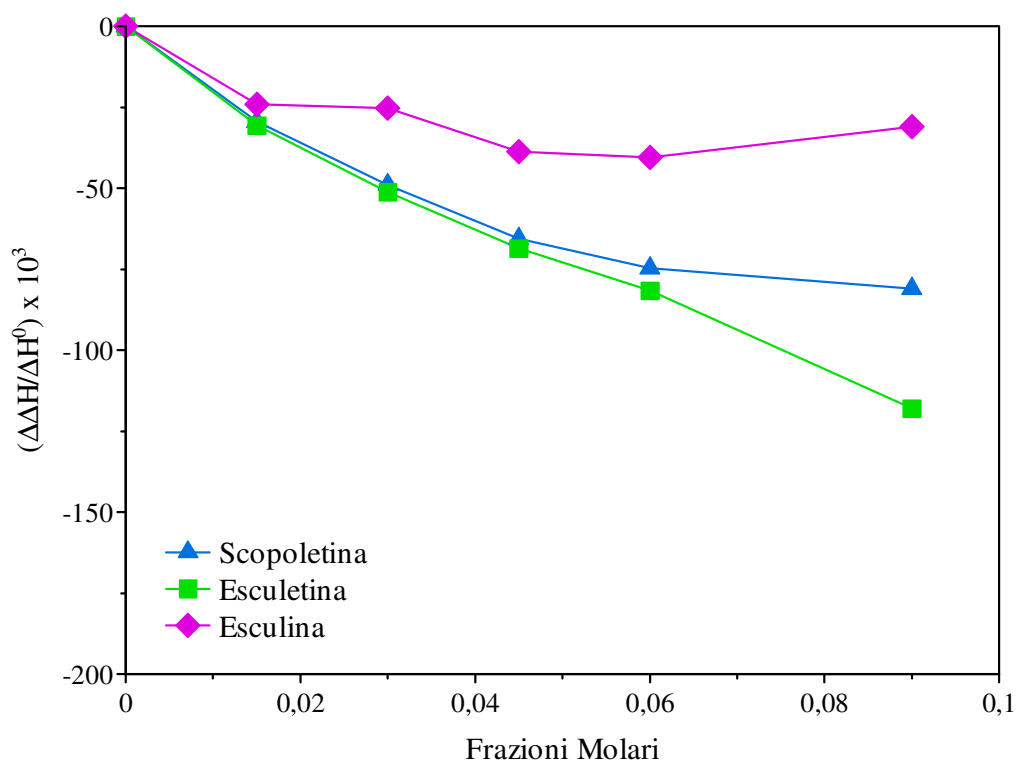


Figura 6.4. Variazione dell'entalpia dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina a frazioni molari crescenti. La variazione dell'entalpia è riportata come $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ ($\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$, dove ΔH è l'entalpia degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati e ΔH^0 è l'entalpia degli MLV di DMPC pura) in funzione della frazione molare presente nella dispersione acquosa.

6.5.2. Cinetiche di permeazione

La Figura 6.5 riporta le curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura posti a contatto, a differenti tempi di incubazione, con Scopoletina, Esculetina ed Esculina, rispettivamente, ciascuno alla frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide.

Le curve sono confrontate con la curva degli MLV di DMPC pura e con la curva degli MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09 presa come riferimento r.

La quantità di composto che passa nella fase acquosa può, in funzione delle sue caratteristiche chimico-fisiche, entrare in contatto con la superficie degli MLV e, successivamente, essere incorporata nel doppio strato lipidico (*Raudino A. and Castelli F., 1998*). Gli eventuali cambiamenti dei parametri termotropici degli MLV possono quindi essere messi in relazione con la quantità di composto che entra nel doppio strato lipidico. Se il composto si disperdesse uniformemente e completamente nel doppio strato, si otterrebbe una curva calorimetrica simile a quella ottenuta quando gli MLV sono preparati in presenza del composto alla frazione molare 0,09.

Per quanto riguarda la Scopoletina si assiste alla scomparsa del picco di pretransizione alla seconda scansione. Inoltre, all'aumentare del tempo d'incubazione, si osserva lo spostamento del picco principale a valori più bassi di temperatura fino a raggiungere la temperatura di transizione della curva di riferimento r. Anche per l'Esculetina e l'Esculina il picco di pretransizione scompare alla seconda scansione, ma il picco principale non subisce rilevanti variazioni durante il tempo d'incubazione spostandosi leggermente verso temperature più basse senza però raggiungere la curva di riferimento r.

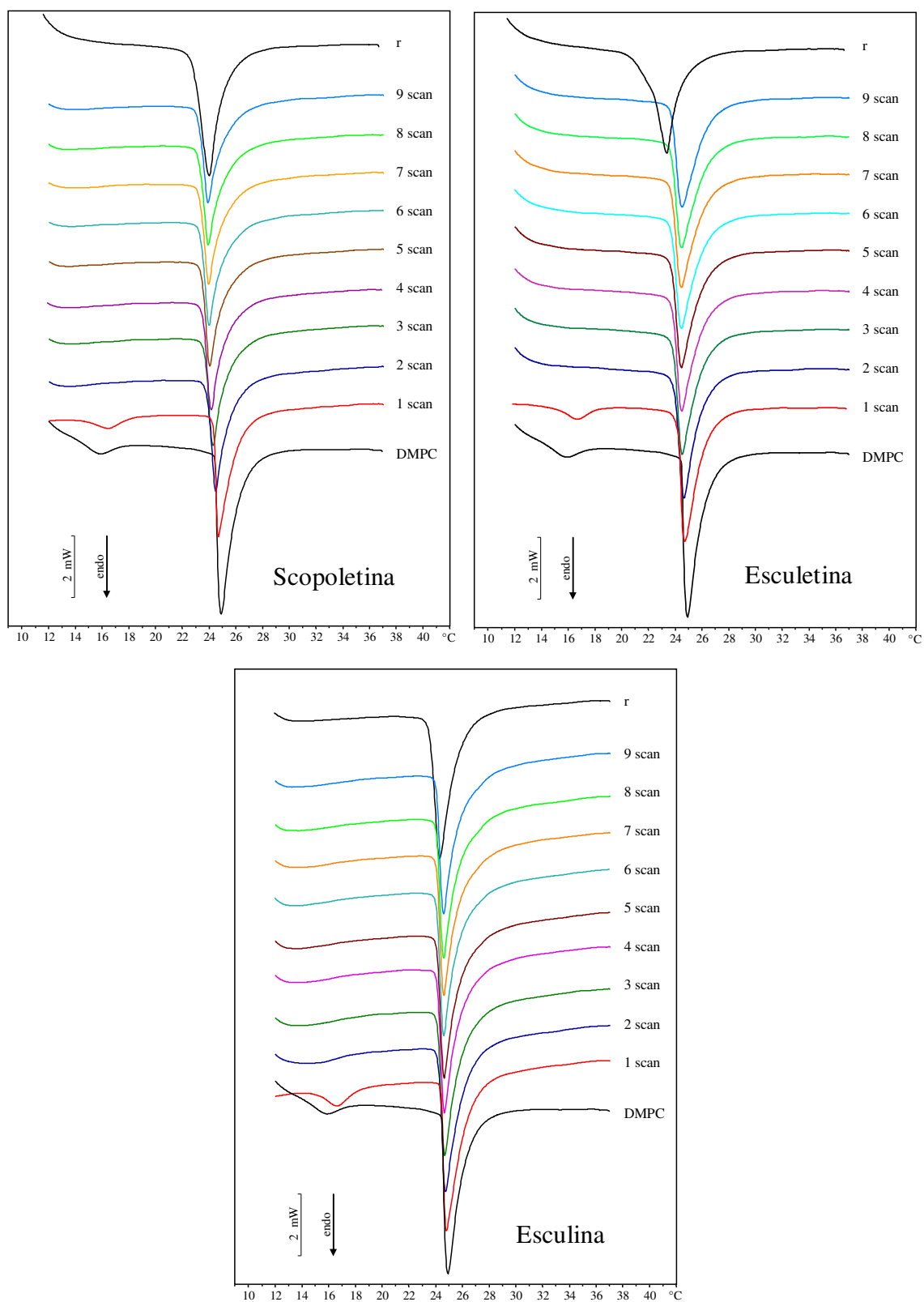


Figura 6.5. Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con le cumarine studiate, alla frazione molare 0,09, a differenti tempi d'incubazione. r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09.

La Figura 6.6 mostra i valori della variazione di temperatura di transizione dei picchi calorimetrici dei liposomi di DMPC lasciati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide in funzione del tempo d'incubazione. Il valore r rappresenta la variazione della T_m dei liposomi di DMPC preparati in presenza dei derivati cumarinici, alla frazione molare 0,09; questo corrisponde alla massima interazione possibile fra il composto e i liposomi. Dal grafico si evince che solo la Scopoletina provoca un abbassamento della temperatura di transizione fino a raggiungere il valore r ; l'Esculetina e ancor di più l'Esculetina, provocano comunque una diminuzione della T_m senza però raggiungere il valore di riferimento r che indica il completo passaggio dei composti dalla fase acquosa agli MLV di DMPC. I risultati indicano che solo la Scopoletina, probabilmente a causa di una maggiore lipofilia, è capace di raggiungere la superficie degli MLV di DMPC e interagire con i doppi strati lipidici, l'Esculetina e l'Esculetina, quando si trovano in ambiente acquoso, mostrano una minore capacità di interagire con gli MLV.

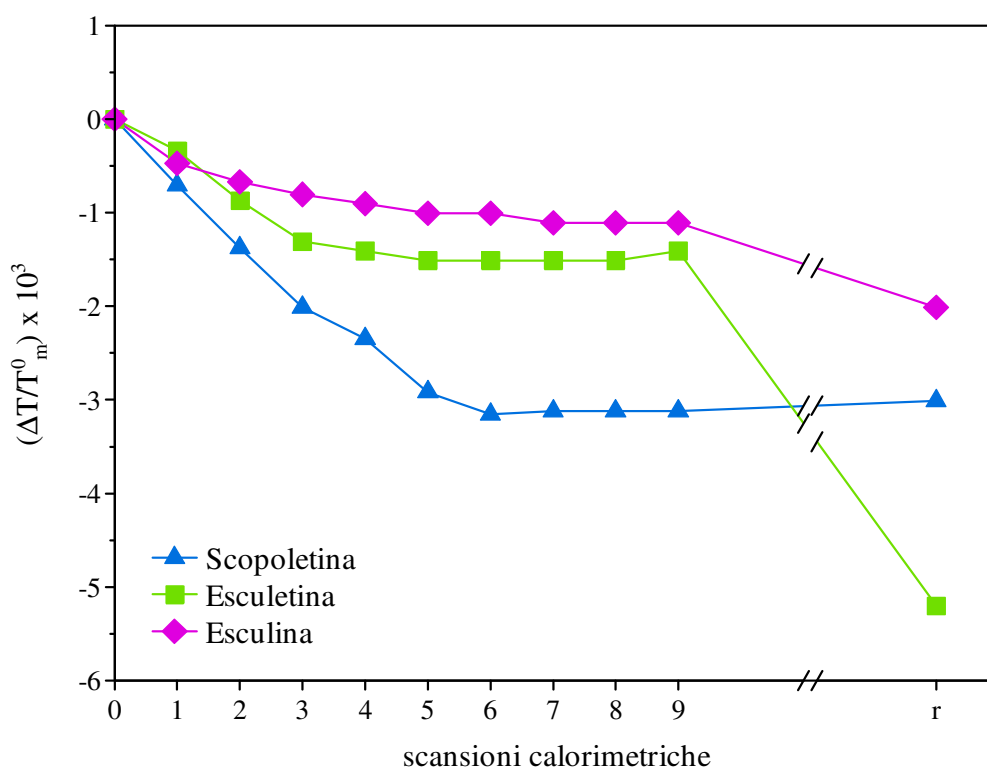


Figura 6.6. Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC lasciati in contatto con Scopoletina, Esculetina ed Esculina alla frazione molare 0,09 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come $\Delta T/T_m^0$ ($\Delta T = T_m - T_m^0$, dove T_m = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza dei composti esaminati e T_m^0 è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione delle scansioni calorimetriche.

6.5.3. Misure di tensione superficiale (Langmuir-Blodgett)

Nella Figura 6.7 sono riportate le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, della Scopoletina e delle miscele DMPC/Scopoletina a varie frazioni molari di Scopoletina a 37 °C e a pH 4. Per le miscele DMPC/Scopoletina a frazioni molari più basse 0,024 e 0,048 si osservano delle isoterme sovrapponibili a quella della sola DMPC. All'aumentare della frazione molare di composto nella miscela con la DMPC, si osservano spostamenti delle isoterme a valori più bassi di area per molecola, e tale spostamento è maggiore per le isoterme delle frazioni molari 0,5 e 0,75 di Scopoletina rispetto alla DMPC. Non si osserva la curva isoterma della Scopoletina pura.

La Figura 6.8 mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'Esculetina e delle miscele DMPC/Esculetina a varie frazioni molari a 37 °C e a pH 4. All'aumentare della frazione molare si osserva una diminuzione progressiva del valore di area per molecola (\AA^2) delle isoterme delle miscele DMPC/Esculetina rispetto all'isoterma della sola DMPC. Anche nel caso dell'Esculetina, non si osserva nessuna isoterma per il composto puro.

La Figura 6.9 mostra le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2) della DMPC, dell'Esculina e delle miscele DMPC/Esculina a 37 °C e a pH 4. Rispetto all'isoterma della DMPC pura, le isoterme della miscela DMPC/Esculina alle frazioni molari comprese tra 0,024 e 0,17 sono leggermente spostate a valori d'area per molecola minori; tale spostamento diventa più evidente per le frazioni molari maggiori (0,5 e 0,75).

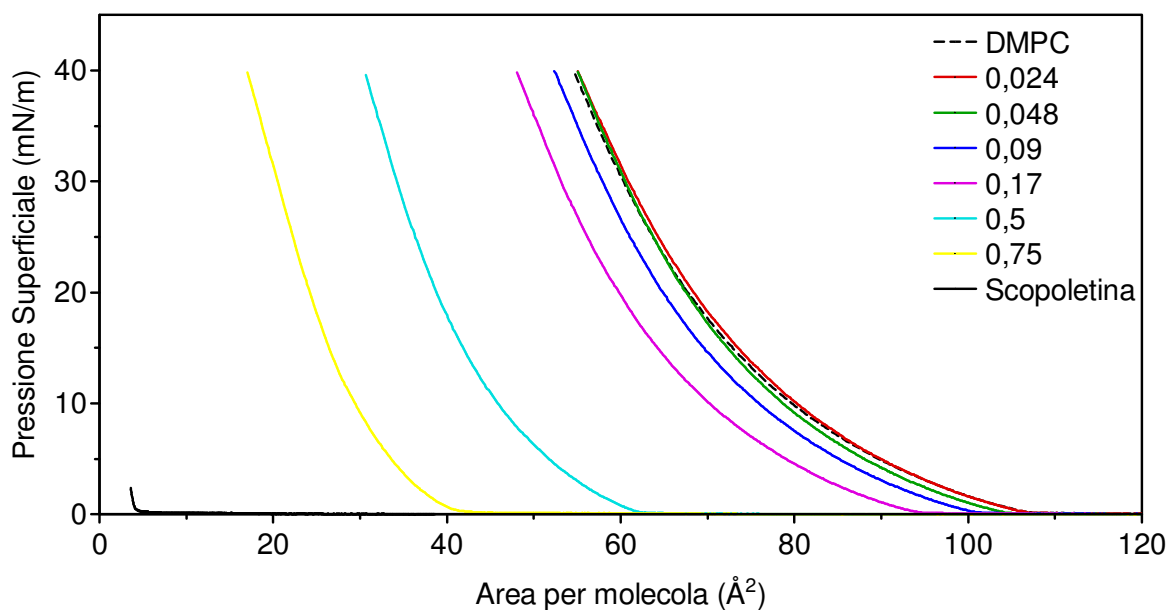


Figura 6.7. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Scooletina a diverse frazioni molari.

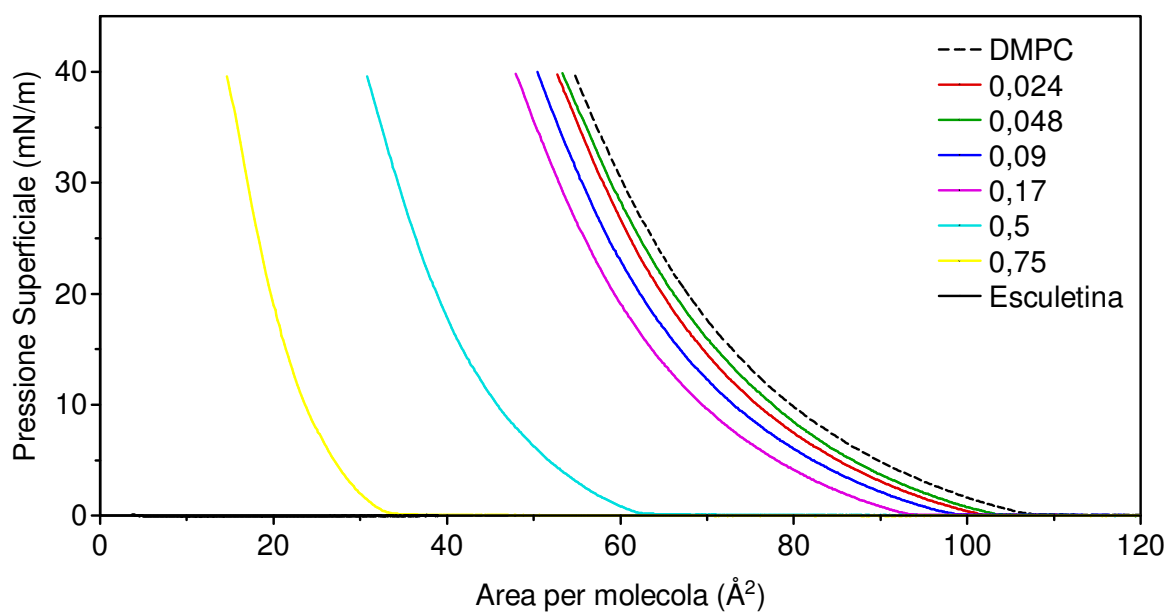


Figura 6.8. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Esculetina a diverse frazioni molari.

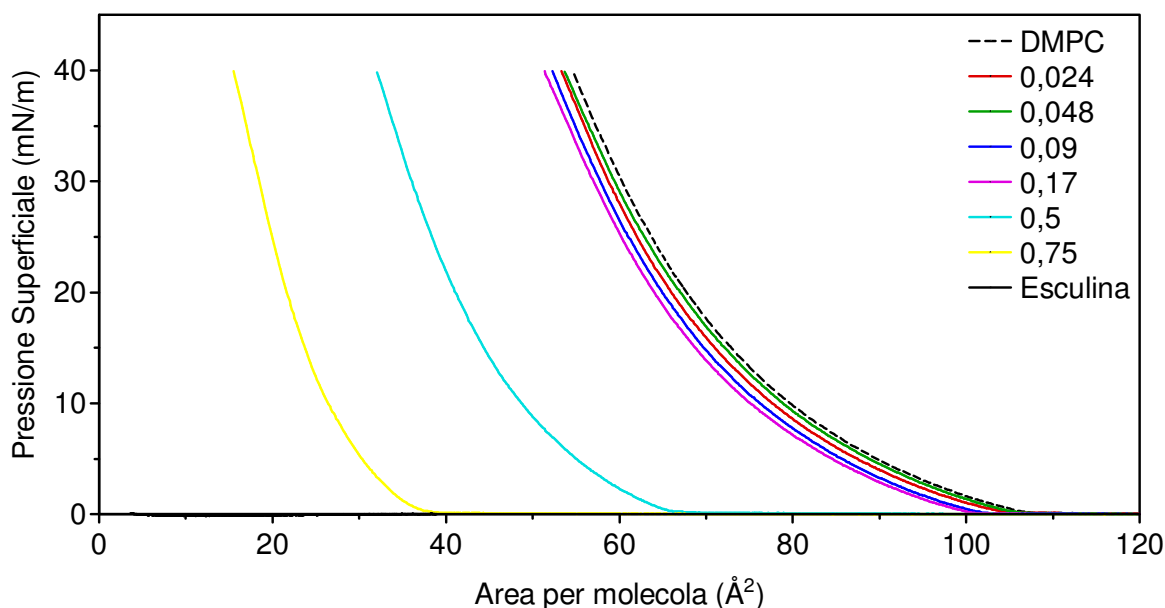


Figura 6.9. Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola (\AA^2), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di Esculina a diverse frazioni molari.

Riportando in grafico i dati relativi all'area media per molecola, a differenti valori di pressione superficiale, in funzione delle frazioni molari di Scopoletina, Esculetina ed Esculina si possono ricavare maggiori informazioni sul tipo di interazioni che si instaurano nei monolayers misti DMPC/composti. La retta tratteggiata, riportata nelle figure, indica i valori di area per molecola ad un determinato valore di pressione superficiale per un monolayer a due componenti con comportamento ideale.

Essa si ottiene congiungendo il valore dell'area per molecola di DMPC pura (frazione molare pari a 0,0 del composto considerato) al valore ottenuto per il composto puro (frazione molare pari a 1 del composto considerato) a determinati valori di pressione superficiale (10 mN/m; 20 mN/m; 30 mN/m).

La Figura 6.10 mostra l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/Scopoletina in funzione della frazione molare di Scopoletina alla temperatura di 37 °C, a pH 4 e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Per le miscele DMPC/Scopoletina si nota una deviazione positiva dei valori di area molecolare rispetto alla retta ideale, maggiore per le frazioni molari più alte, con un andamento simile a 10, a 20 e a 30 mN/m. Tale deviazione è indice di interazioni repulsive tra il composto e la DMPC.

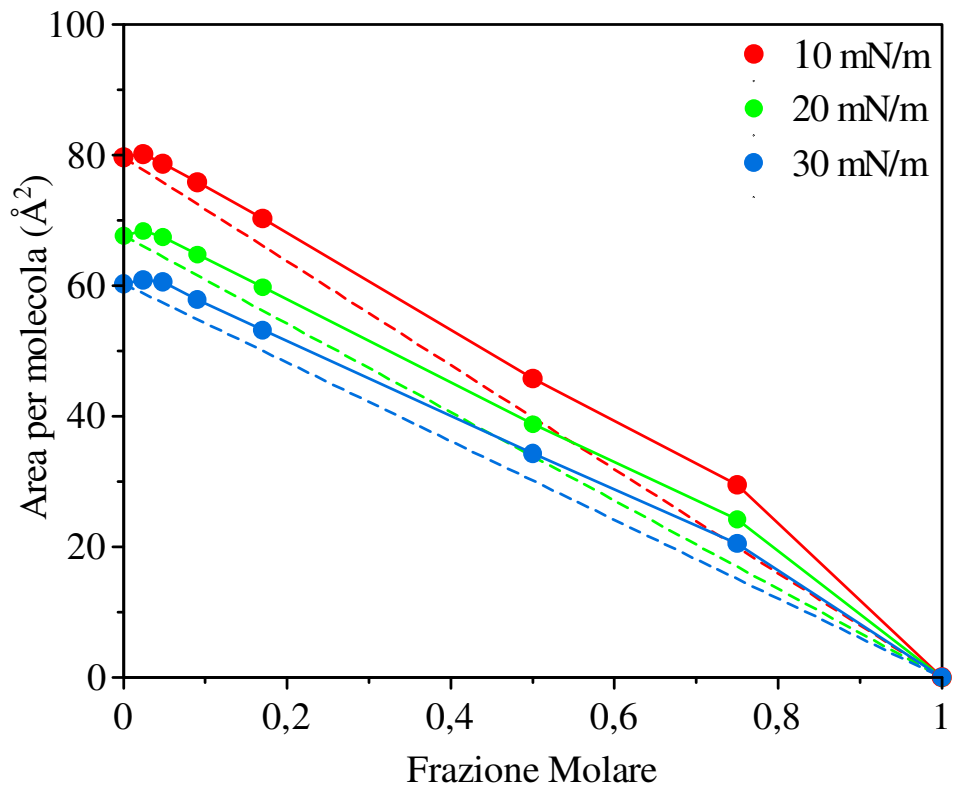


Figura 6.10. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Scopoletina a frazioni molari crescenti di Scopoletina, a 37 °C.

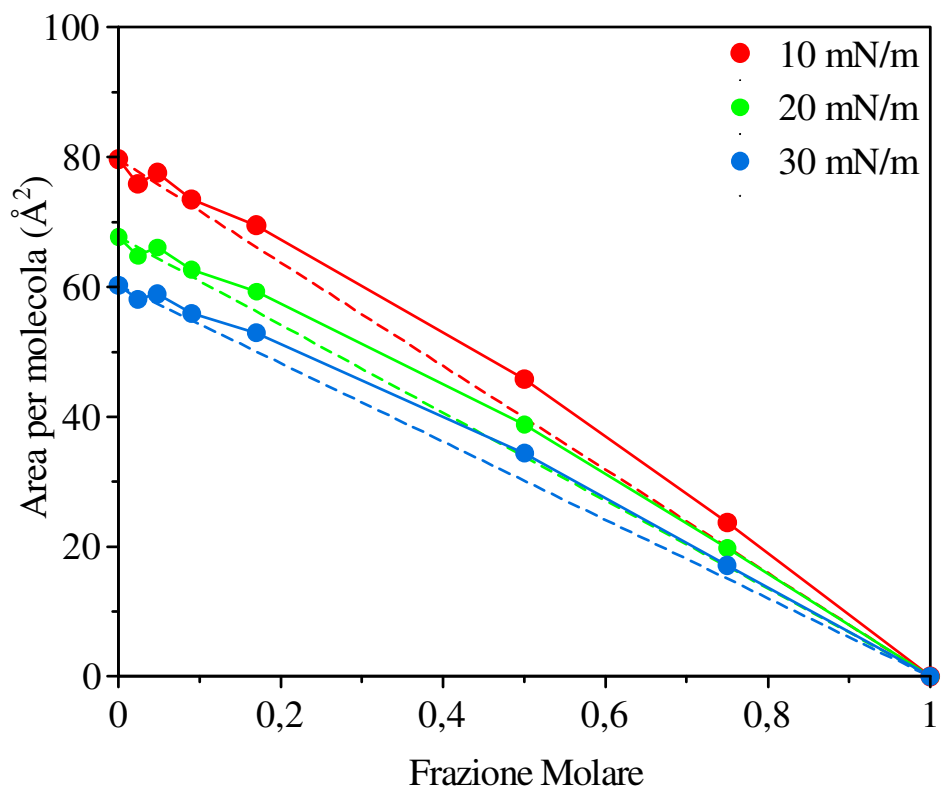


Figura 6.11. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Esculetina a frazioni molari crescenti di Esculetina, a 37 °C.

La Figura 6.11 mostra l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/Esculetina in funzione della frazione molare di Esculetina alla temperatura di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

Il composto, sia a 10 che a 20 e 30 mN/m mostra una piccola deviazione negativa alla frazione molare 0,024, ciò indica che si hanno piccole interazioni attrattive tra l'Esculetina e la DMPC. A partire dalla frazione molare 0,048 comincia ad esserci una piccola deviazione positiva dei valori di area per molecola per tutti e tre i valori di pressione superficiale che aumenta all'aumentare della frazione molare.

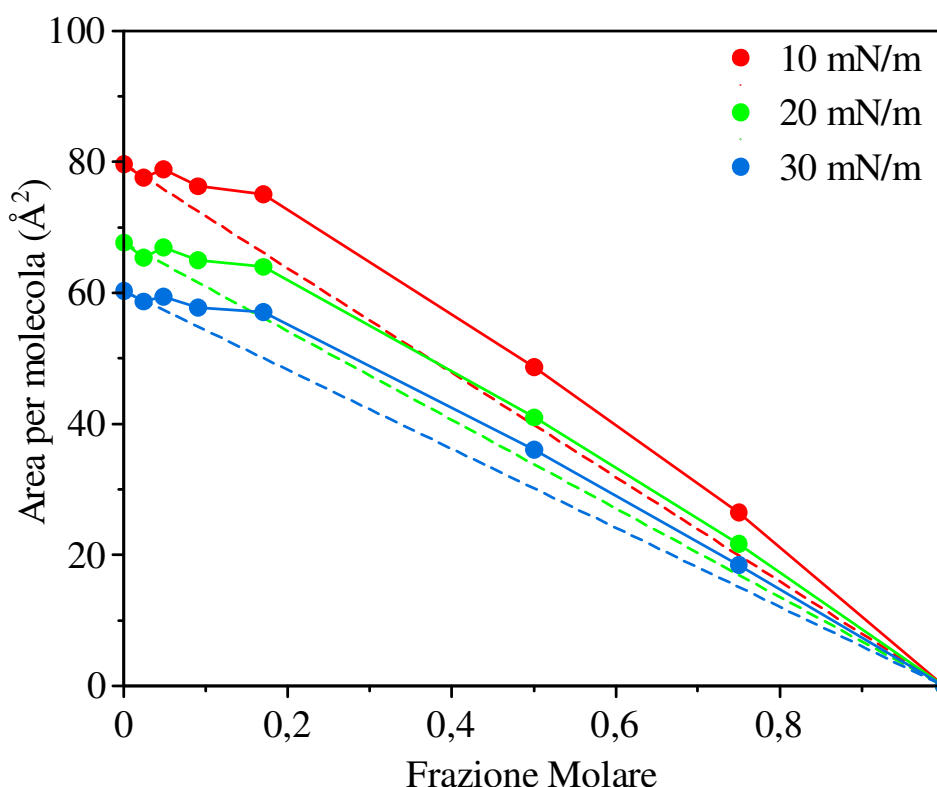


Figura 6.12. Area media per molecola (\AA^2) per miscele di DMPC/Esculetina a frazioni molari crescenti di Esculetina, a 37 °C.

La Figura 6.12 mostra l'andamento dell'area per molecola, in funzione della frazione molare di Esculetina delle miscele DMPC/Esculetina, alla temperatura di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

A 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m, per la frazione molare più bassa si osserva una sovrapposizione dei valori della miscela con quelli della retta ideale e a partire dalla frazione molare 0,048 si osserva una deviazione positiva dei valori di area per molecola che aumenta alla frazione molare 0,17 mantenendo lo stesso andamento anche per le frazioni molari successive (0,5 e 0,75).

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare coloro che mi hanno supportato in questi anni ed hanno reso possibile la realizzazione di questo lavoro:

- il mio tutor, Prof. Francesco Castelli che ha seguito il lavoro da me svolto presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania, sede consorziata del Dottorato di Ricerca;
- la Prof.ssa Maria Grazia Sarpietro, sempre disponibile ad offrire il suo prezioso aiuto;
- il Coordinatore del Collegio dei Docenti, Prof. Gaetano Giammona ed il gruppo del laboratorio di Tecnologie Farmaceutiche del Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Palermo.

BIBLIOGRAFIA

- Albrecht O., Gruler H., Sackmann E., *Polymorphism of phospholipid monolayers*. Le Journal de Physique, **1978**, 39: 301-313.
- Alexander J.W., *Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids*. Nutrition, **1998**, 14: 627-633.
- Ali S., Minchey S., Janoff A., Mayhew E., *A Differential Scanning Calorimetry study of phosphocholines mixed with Paclitaxel and its bromoacylated taxanes*. Biophys. J., **2000**, 78: 246-256.
- Ansari M.T., Igbal I., Sunderland V.B., *Dihydroartemisinin-cyclodextrin complexation: solubility and stability*. Arch. Pharm. Res., **2009**, 32: 155-165.
- Bach Knudsen K.E., Hessov I., *Recovery of Inulin from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) in the small intestine of man*. Brith. J. Nutr., **1995**, 74: 101-113.
- Bader H., Dorn K., Huofer B., Ringsdorf H., *Polymeric monolayers and liposomes as models for biomembranes*. Adv. Polym. Sci., **1985**, 64: 1-62.
- Balfour H.H., Chace B.A., Stapleton J.T., Simmons R.L., Fryd D.S., *A randomized, placebo-controlled trial of oral acyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of renal allografts*. The New England Journal of Medicine, **1989**, 320: 1381-1387.
- Basini G., Tringali C., Baioni L., Bussolati S., Spatafora C., Grasselli F., *Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues*. Mol. Nutr. Food Res., **2010**, 2: S236-243.
- Béduneau A., Saulnier P., Benoit J.P., *Active targeting of brain tumors using nanocarriers*. Biomaterials, **2007**, 28: 4947-4967.

- Beije B., Möller L., *2-nitrofluorene and related compounds: prevalence and biological effects*. Mutat. Res., **1988**, 196: 177-209.
- Belguendouz L., Fremont L., Linard A., *Resveratrol inhibits metal ion dependent peroxidation of porcine low-density lipoproteins*. Biochem. Pharm., **1997**, 53: 1347-1355.
- Biedrzycka E., Bielecka M., *Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization*. Food Sci. Tech., **2004**, 15: 170-175.
- Blennow K., de Leon M.J., Zetteberg H., *Alzheimer's disease*. Lancet, **2006**, 368: 387-403.
- Brown T., Havlin K., Weiss G., Cagnola J., Koeller J., Kuhn J., Rizzo J., Phillips J., VonHoff D., *A phase-I trial of taxol given by 6-hour infusion*. J. Clin. Oncol., **1991**, 9: 1261-1262.
- Cadenhead D.A., *Monomolecular films as biomembrane models*. Structures and Properties of Cell Membranes. CRC press, **1985**.
- Campbell J., Crumplin G.C., Garner J.V., Martin C.N., Rutter A., *Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons: potent bacterial mutagens and stimulators of DNA repair synthesis in cultured human cells*. Carcinogenesis, **1981**, 2: 559-565.
- Cantos E.C., Garcia V.S., De Pascual T., Tomas Berberan F.A., *Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of c. v. Napoleon table grapes*. J. Agric. Food Chem., **2000**, 48: 4606-4612.
- Cardile V., Lombardi L., Spatafora C., Tringali C., *Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues*. Biorganic Chemistry, **2005**, 33: 22-33.

- Castelli F., Conti B., Maccarrone D.E., Conte U., Puglisi G., *Comparative study of “in vitro” release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres*. Int. J. Pharm., **1998**, 176: 85-98.
- Castelli F., Giunchedi P., La Camera O., Conte U., *A calorimetric study on the Diflunisal release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres by monitoring the drug effect on Dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. Temperature and drug loading influence*. Drug Delivery, **2000a**, 7: 45-53.
- Castelli F., Librando V., Sarpietro M.G., *Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes*. Environ. Sci. Technol., **2002**, 36: 2717-2723.
- Castelli F., Messina C., Pignatello R., Puglisi G., *Effect of pH on diclofenac release from Eudragit RS100 microparticles. A kinetic study by DSC*. Drug Deliv., **2001**, 8: 173-177.
- Castelli F., Messina C., Sarpietro M.G., Pignatello R., Puglisi G., *Flurbiprofen release from Eudragit RS and RL aqueous nanosuspensions: a kinetic study by DSC and dialysis experiments*. AAPS Pharm. Sci. Tech., **2002**, 3: E9.
- Castelli F., Pitarresi G., Giammona G., *Influence of different parameters on drug release from hydrogel systems to biomembrane model. Evaluation by differential scanning calorimetry technique*. Biomaterials, **2000b**, 21: 821-833.
- Castelli F., Pitarresi G., Tomarchio V., Giammona G., *Effect of pH on the transfer kinetics of an anti-inflammatory drug from polyaspartamide hydrogels to lipid model membrane*. J. Control. Release, **1997**, 45: 103-111.
- Castelli F., Puglia C., Sarpietro M.G., Rizza L., Bonina F., *Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry*. Int. J. Pharm. **2005**, 304: 231-238.

- Castelli F., Puglisi G., Giammona G., Ventura C.A., *Effect of the complexation of some non steroidal anti-inflammatory drugs with β -cyclodextrin on the interaction with phosphatidylcholine liposomes*. Int. J. Pharm., **1992**, 88: 1-8.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Ceruti M., Rocco F., Cattel L., *Characterization of lipophilic Gemcitabine prodrugs-liposomal membranes interaction by differential scanning calorimetry*. Mol. Pharmaceutics, **2006a**, 3: 737-744.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Miceli D., Stella B., Rocco F., Cattel L., *Enhancement of gemcitabine affinity for biomembranes by conjugation with squalene: differential scanning calorimetry and Lagmuir-Blodgett studies using biomembrane models*. J. Colloid Interface Sci., **2007a**, 316: 43-52.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Miceli D., Trombetta D., Saija A., *Differential scanning calorimetry evidence of the enhancement of β -sitosterol absorption across biological membranes mediated by β -cyclodextrins*. J. Agric. Food Chem., **2006b**, 54: 10288-10233.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Miceli D., Ottimo S., Pitarresi G., Tripodo G., Carlisi B., Giammona G., *Differential scanning calorimetry study on drug release from an inulin-based hydrogel and its interaction with a biomembrane model: pH and loading effect*. Eur. J. Pharm. Sci., **2008**, 35: 76-85.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Rocco F., Ceruti M., Cattel L., *Interaction of lipophilic gemcitabine prodrugs with biomembranes models studied by Lagmuir Blodgett technique*. J. Colloid Interface Sci., **2007b**, 313: 363-368.
- Chabner B., Longo D.L., *Cancer Chemotherapy and biotechnology*. **1982**.
- Chen H., Chen T., Hu J., Wang C., *Nano aggregates of biodegradable amphiphilic poly(hydroxyethylaspartamide-co-propyl aspartamide) grafted with poly(D,L-lactide)*. Colloids Surf. A, **2005**, 268: 24-29.

- Chen Y.L., Huang H.C., Weng Y.I., Yu Y.J., Lee Y.T., *Morphological evidence for the antiatherogenic effect of scoparone in hyperlipidaemic diabetic rabbits*. *Cardiovasc. Res.*, **1994**, 28: 1679-1685.
- Cohen S., Bernstein H., *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*. Eds Marcel Dekker, New York, **1996**.
- Cotton M.L., Hux R.A., *Diflunisal*. In: *Analytical profiles of drug substances*. Florey K. Ed., Vol. 14. Academic Press Inc., **1985**, 491-526.
- Craparo E.F., Cavallaro G., Ognibene M.C., Teresi G., Bondi M.L., Giammona G., *Amphiphilic poly(hydroxyethylaspartamide) derivative-based micelles as drug delivery systems for ferulic acid*. *J. Drug Target*. **2009**, 17: 78-88.
- Damian F., Van DE Mooter G., Smyrn C., Kinget R., *In vitro biodegradation study of acetyl and methyl inulins by Bifidobacteria and inulinase*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1999**, 47: 275-282.
- Demel R.A., Dorrepaal E., Ebskamp M.J.M., Smeekens J.C.M., de Kruijf B., *Fructans interact strongly with model membranes*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1375: 36-42.
- Dickson D.W., Lee S.C., Mattiace L.A., Yen S.H., Brosnan C., *Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer disease*. *Glia*, **1993**, 7: 75-83.
- Dyeberg J., Bang H.O., *A hypothesis on the development of acute myocardial infarction in Greenlanders*. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **1982**, 161: 7-13.
- Egan D., O'Kennedy R., Moran E., Cox D., Prosser E., Thornes R.D., *The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds*. *Drug Metab. Rev.*, **1990**, 22: 503-529.

- Egan D., O'Kennedy R., *Rapid and sensitive determination of coumarin and 7-hydroxycoumarin and its glucuronide conjugate in urine and plasma by high-performance liquid chromatography.* J. Chromatogr., **1992**, 582: 137-143.
- Ehehalt R., Füllekrug J., Pohl J., Ring A., Herrmann T., Stremmel W., *Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane-lipid rafts and fatty acid transport proteins.* Mol. Cell. Biochem., **2006**, 284: 135-140.
- Elion G.B., Furman P.A., Fyfe J.A., DeMiranda P., Beauchamp L., Schaeffer H.J., *Selectivity of action of an antiherpetic agent 9-(2-hydroxyetoxymethyl)guanine.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1977**, 74: 5716-5720.
- Eriksen J.L., Sagi S.A., Smith T.E., Weggen S., Das P., McLendon D.C., Ozols W., Jessing K.W., Zavitz K.H., Koo E.H., Golde T.E., *NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo.* J. Clin. Invest., **2003**, 112: 440-449.
- Finn G.J., Kenealy E., Creaven B.S., Egan D.A., *In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines.* Cancer Lett., **2002**, 183: 61-68.
- Freeman D.J., Sheth N.V., Spruance L., *Failure of topical Acyclovir in ointment to penetrate human skin.* Antimicrob. Agents Chemother., **1986**, 730-732.
- Fremont L., *Biological effects of resveratrol.* Life Sci., **2000**, 66: 633-673.
- Fujioka T., Furumi K., Fujii H., Okabe H., Mihashi K., Nakano Y., Matsunaga H., Katano M. and Mori M., *Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of Angelica japonica.* Chem. Pharm. Bull. Tokyo, **1999**, 47: 96-100.
- Fyfe J.A., Keller P.M., Furman P.A., Miller R.L., Elion G.B., *Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyetoxymethyl)guanine.* J. Biol. Chem., **1978**, 253: 8721-8727.

- Gaines G.L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces (chapter 6)*. Wiley-Interscience, New York, **1996**.
- Galasko D.R., Graff-Radford N., May S., Hendrix S., Cottrell B.A., Sagi S.A., Mather G., Laughlin M., Zavitz K.H., Swabb E., Golde T.E., Murphy M.P., Koo E.H., *Safety, tolerability, pharmacokinetics, and Abeta levels after short-term administration of R-flurbiprofen in healthy elderly individuals*. Alzheimer Dis. Assoc. Disord., **2007**, 21: 292-299.
- Gao D. and Rytting J.H., *Use of solution calorimetry to determine the extent of crystallinity of drugs and excipient*. Int. J. Pharm., **1997**, 151: 183-192.
- Gehm B.D., McAndrews J.M., Chien P.Y., Jameson L., *Resveratrol a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1997**, 94: 14138-14143.
- Giammona G., Carlisi B., Palazzo S., *Reaction of α,β -poly(N-hydroxyethyl)-dl-aspartamide with derivatives of carboxylic acid*. J. Polym. Sci., **1987**, 25: 2813-2818.
- Gibson G.R., Roberfroid M.B., *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. J. Nutr., **1995**, 125: 1401-1414.
- Griffin W.S., Stanley L.C., Ling C., White L., MacLeod V., Perrot L.J., White C.L. 3rd, Araoz C., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci., **1989**, 86: 7611-7615.
- Guggenheim EA., *Thermodynamics*. Amsterdam, North-Holland, **1952**.
- Gusman J., Malonne H., Atassi G., *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*. Carcinogenesis, **2001**, 22: 1111-1117.
- Hahn S.K., Park J.K., Tominatsu T., Shimoboji T., *Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels*. Int. J. Biol. Macromol., **2007**, 40: 374-380.

- Hanes J.W., Zhu Y., Parris D.S., Johnson K.A. *Enzymatic therapeutic index of acyclovir*. The Journal of Biological Chemistry, **2007**, 282: 25159-25167.
- Hauß T., Dante S., Dencher N.A., Haines T.H., *Squalene is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier*. Biochim. Biophys. Acta, **2002**, 1556: 149-154.
- Haynes P., Lambert T.R., Mitchell I.D., *Comparative in vivo genotoxicity of antiviral nucleoside analogues; penciclovir, acyclovir, ganciclovir and xanthine analogue, caffeine in the mouse bone marrow micronucleus assay*. Mutation Research, **1996**, 369: 65-74.
- Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*. Biochim. Biophys. Acta, **1985**, 812: 55-65.
- Hope M.J., Nayar R., Mayer L.D., Cullis P.R., *Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicle by extrusion techniques*. In: Liposome Technology. Gregoriadis G. Ed., Vol. I. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, **1993**, 123-140.
- Hovgaard L., Brondsted H., *Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery*. J. Control. Release, **1995**, 36: 159-166.
- Jain M.K., *Introduction to biological membranes*. John Wiley and Sons, New York, **1988**.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Metha R.G., Moon R.C., Pezzutto J.M., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, **1997**, 275: 218-220.

- Jang M., Pezzuto J.M., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol*. Drug under Experimental and Clinical Reserch, **1999**, 25: 65-77.
- Jeandet P., Bessis R., Gautheron B., *The production of resveratrol [3,5,4-trihydroxystilbene] by grape berries in different development stages*. J. Enol. Vit. **1991**, 42: 41-46.
- Jones M., Leroux J., *Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers*. Eur. J. Biopharm., **1999**, 48: 101-111.
- Jorgensen K., Ipsen J.K., Mouritsen O.G., Bennet D., Zuckermann M.J., *The effects of density fluctuations on the partitioning of foreign molecules into bilayers: application to anaesthetics and insecticides*. Biochim. Biophys. Acta, **1991**, 1067: 241-253.
- Kabanov A.V., Lemieux P., Vinogradov S., Alakhov V., *Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy*. Adv. Drug Deliv. Rev., **2002**, 21: 223-233.
- Kalant D., Cianflone K., *Regulation of fatty acid transport*. Curr. Opin. Lipidol., **2004**, 15: 309-314.
- Kamp F., Zakim D., Zhang F., Noy N., Hamilton J.A., *Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast*. Biochemistry, **1995**, 34: 11928-11937.
- Katzung G.B., *Farmacologia generale e clinica*. Quarta edizione italiana; Piccin, Padova, **1997**.
- Keating G.J. and O’Kennedy R., *The chemistry and occurrence of coumarins*. In: O’Kennedy & Thornes, **1997**, 23-66.
- Kelavkar U.P., Hutzley J., Dhir R., Kim P., Allen K.G., McHugh K., *Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6:omega-3 ratio in diet*:

athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy. Neoplasia, **2006**, 8: 112-124.

King L.C., Jackson M., Ball L.M., Lewtas J., *Binding of 1-nitro[¹⁴C]pyrene to DNA and protein in cultured lung macrophages and respiratory tissues*. Cancer Letters, **1983**, 3: 241-246.

Koonen D.P., Glatz J.F., Bonen A., Luiken J.J., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochim. Biophys. Acta, **2005**, 1736: 163-180.

Kreuter J., *Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain*. J. Nanosci. Nanotechnol., **2004**, 4: 484-488.

Kreuter J., Ränge P., Petrov V., Hamm S., Gelperina S.E., Engelhardt B., Alyautdin R., von Briesen H., Begley D.J., *Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drug to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles*. Pharm. Res., **2003**, 20: 409-416.

Krull U.J., Thompson M., Vanderberg E.T., Wong H.E., *Langmuir-Blodgett film characteristics and phospholipids membrane ion conduction*. Analytica Chimica Acta, **1985**, 174: 83-94.

Lacy A. O'Kennedy R., *Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer*. Current Pharmaceutical Design, **2004**, 10: 3797-3811.

Lambros M.P., Rahman Y.E., *Effects of cyclosporin A on model lipid membranes*. Chem. Phys. Lipids, **2004**, 131: 63-69.

Landvik N.E., Gorria M., Arlt V.M., Asare N., Solhaug A., Lagadic-Gossmann D., Holme J.A., *Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: possible*

- implications for their mutagenic and carcinogenic effects. Toxicology, 2007, 231: 159-174.*
- Langman M.J.S., Weil J., Wainwright P., Lauson D.H., Rawlins M.D., Logan R.F.A., Murph M., Vessey M.P., Colin-Jones D.G., *Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. Lancet, 1994, 343: 1075-1078.*
- Langmuir I., *The constitution and fundamental properties of solids and liquids, II. Liquids. J. Am. Chem. So., 1917, 39: 1848-1852.*
- Larizza P., Riva C.M., *Trattato delle malattie del sangue. 1985.*
- Lewtas J., *Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. Mutat. Res., 2007, 636: 95-133.*
- Li Y.S., Fu P.P., Church J.S., *The conformation of some nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Mol. Struct., 2000, 550-551: 217-223.*
- Licciardi M., Campisi M., Cavallaro G., Cervello M., Azzolina A., Giammona G., *Synthesis and characterization of polyaminoacidic polycations for gene delivery. Biomaterials, 2006, 27: 2066-2075.*
- Lin J.H., Lu A.Y., *Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. Pharmacol. Rev., 1997, 49: 403-449.*
- Lleó A., Berezovska O., Herl L., Raju S., Deng A., Bacskai B.J., Frosch M.P., Irizarry M., Hyman B.T., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation. Nat. Med., 2004, 10: 1065-1066.*
- Lu Z., Cheng B., Hu Y., Zhang Y., Zou G., *Complexation of resveratrol with cyclodextrin: solubility and antioxidant activity. Food Chem., 2009, 113: 17-20.*

- Lunn J., Theobald H.E., *The health effects of dietary unsaturated fatty acids*. Nutr. Bull., **2006**, 31: 178-224.
- Maccarrone M., Lorenzon T., Guerrieri P., Finazzi Agrò A., *Resveratrol prevents apoptosis in K 562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity*. Eur. J. Biochem., **1999**, 265: 27-34.
- MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P.M., Takeshita K., Subbarao N.K., Hu L., *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*. Biochim. Biophys. Acta, **1991**, 1061: 297-303.
- Malejka-Giganti D., Niehans G.A., Reichert M.A., Bennett K.K., Bliss R.L., *Potent carcinogenicity of 2,7-dinitrofluorene, an environmental pollutant, for the mammary gland of female Sprague-Dawley rats*. Carcinogenesis, **1999**, 20: 2017-2023.
- Mannila E., Talvitie A., Kolehmainen E., *Anti-leukaemic compounds derived from stilbenes in Picea abies bark*. Phytochemistry, **1993**, 33: 813-816.
- Marshall T.C., Royer R.E., Li A.P., Kusewitt D.F., Brooks A.L., *Acute and genetic toxicity of 1-nitropyrene and its fate after single oral doses to rats*. J. Toxicol. Environ. Health, **1982**, 10: 373-384.
- Matern U., Lüer P., Kreusch D., *Biosynthesis of coumarins*. In: Barton D., Nakanishi K., Meth-Cohn O. and Sankawa U. (eds.): Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1, Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. Elsevier Science Ltd., Oxford, UK., **1999**, 623-637.
- Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R., *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure*. Biochim. Biophys. Acta, **1986**, 858: 161-168.
- Mayser P., Mayer K., Mahloudjian M., Benzing S., Krämer H.J., Schill W.B., Seeger W., Grimminger F., *A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3*

- versus n-6 fatty acid-based lipid infusion in atopic dermatitis.* J. Parenter. Enteral Nutr., **2002**, 23: 151-158.
- Mcadows K.C., Dressman J.B., *Mechanism of Acyclovir uptake in rat jejunum.* Pharm. Res., **1990**, 7: 299-303.
- McGeer P.L., McGeer E.G., *Inflammation and the degenerative diseases of aging.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **2004**, 1035: 104-116.
- Michaelis K., Hoffmann M.M., Dreis S., Herbert E., Alyautdin R.N., Michaelis M., Kreuter J., Langer K., *Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin-nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **2006**, 317: 1246-1253.
- Miñones J., Sandez Macho M.I., Iribarnegaray E., Sanz Pedrero P., *A comparative study of synthetic lecithin and cephalin monolayers spread on substrates of different pH.* Colloid & Polimer Sci., **1981**, 259: 382-390.
- Morihara T., Chu T., Ubeda O., Beech W., Cole G.M., *Selective inhibition of Abeta42 production by NSAID R-enantiomers.* J. Neurochem., **2002**, 83: 1009-1012.
- Morishita M., Kajita M., Suzuki A., Takayama K., Chiba Y., Tokiwa S., Nagai T., *The dose-related hypoglycaemic effects of insulin emulsions incorporating highly purified EPA and DHA.* Int. J. Pharm., **2000**, 201: 175-185.
- Mouritsen O.G., Bloom M., *Mattress model of lipid-protein interactions in membranes.* Biophys. J., **1984**, 46: 141-153.
- Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C., *Farmacologia.* Seconda edizione italiana; Zanichelli editore, Bologna, **2000**.
- Nicolosi G., Spatafora C., Tringali C., *Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives.* J. Mol. Catal. B: Enzim., **2002**, 16: 223-229.

- Nishimori H., Fujii N., Maeda Y., Matsuoka K., Takenaka K., Shinagawa K., Ikeda K., Matsuo K., Harada M., Tanimoto M., *Efficacy and feasibility of IDEA therapy for refractory or relapsed non-Hodgkin's lymphoma*. *Anticancer Res.*, **2009**, 29: 1749-1754.
- O'Brain J.J., Campoli-Richards D.M., *Acyclovir: an updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy*. *Drugs*, **1989**, 37: 233-309.
- Ohnishi Y., Kinouchi T., Manabe Y., Tsutsui H., Otsuka H., Tokiwa H. Otofujii T., *Nitro compounds in environmental mixtures and food*. In: Waters M.D., Shandhu S.S., Lewtas J., Claxton L., Strauss G., Nesnow S. Eds. *Short-Term. Genetics Bioassays in the evaluation of complex environmental mixtures*. Plenum Press, New York, **1985**, pp. 195-204.
- Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.P., Soleas G., Goldberg D.M., *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*. *Clin. Chim. Acta*, **1995**, 235: 207-219.
- Pace-Asciak C.R., Rounova O., Hahn S.E., Diamandis E.P., Goldberg D.M., *Wines and grape juice as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects*. *Clin. Chim. Acta*, **1996**, 246: 163-182.
- Palumbo F.S., Pitarresi G., Mandracchia D., Tripodo G., Giammona G., *New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: synthesis and characterization*. *Carbohydrate Polymers.*, **2006**, 66: 379-385.
- Park J.H., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J., *Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47: 7284-7288.
- Pedersen D.U., Durant J.L., Taghizadeh K., Hemond H.F., Lafleur A.L., Cass G.R., *Human cell mutagens in respirable airborne particles from the northeastern*

United States. 2. Quantification of mutagens and other organic compounds. Environ. Sci. Technol., **2005**, 39: 9547-9560.

Peppas N.A., Mikos A.G., *Preparation methods and structure of hydrogels.* In: Hydrogels in medicine and pharmacy. Peppas N.A. Ed.; Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL, **1986**, 1-25.

Phillips M.C., Chapman D., *Monolayers characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interfaces.* Biochim. Biophys. Acta, **1968**, 163: 301-313.

Pitts J.N. Jr., Van Cauwenberghe K.A., Grosjean D., Schmid J.P., Fitz D.R., Belser W.L., Knudson G.P., Hynds P.M., *Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives.* Science, **1978**, 202: 515-519.

Prentice H.G., Gluckman E., Powles R.C., Ljungman P., Milpied N.J.F., Ranada J.M.F., Madelli F., Kho P., Kennedy L., Bell A.R., *Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group.* Lancet, **1994**, 343: 749-753.

Purohit V., Basu A.K., *Mutagenicity of nitroaromatic compounds.* Chem. Res. Toxicol., **2000**, 13: 673-692.

Qiu Y., Park K., *Environment sensitive hydrogels for drug delivery.* Adv. Drug Deliver. Rev., **2001**, 53: 321-339.

Rafii M.S., Aisen P.S., *Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics.* BMC Med., **2009**, 7: 7.

Raudino A., Castelli F., *Modelling specific heat transient anomalies during permeation of liposomes by water-soluble substances.* J. Colloid Interf. Sci., **1998**, 200: 52-58.

- Rizzo R., Riley C., VonHoff D., Kuhn J., Philips J., Brown T., *Analysis of anticancer drug in biological fluids: determination of taxol with application to clinical pharmacokinetics*. J. Pharm. Biomed. Anal., **1990**, 8: 159-160.
- Roberfroid M.B., *Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **1993**, 33: 103-148.
- Rogers J., Cooper N.R., Webster S., Schultz J., McGeer P.L., Styren S.D., Civin W.H., Brachova L., Bradt B., Ward P., et al., *Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci., **1992**, 89: 10016-10020.
- Ronkart S., Blecker C., Fougnyes C., Van Herck J.C., Wouters J., Paquot M., *Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: an X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study*. Carbohydr. Polym., **2006**, 63: 210-217.
- Rose D.P., Connolly J.M., *Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents*. Pharmacol Ther., **1999**, 83: 217-244.
- Rouser G., Fleischer J., Yamamoto A., *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. Lipids, **1970**, 5: 494-496.
- Rowinsky E.K., Cazenave L.A., Donehover R.C., *Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent*. J. Natl. Cancer Inst., **1990**, 82:1247-1259.
- Rowinsky E.K., Donehover R.C., *Paclitaxel (Taxol[®])*. N. Engl. J. Med., **1995**, 332: 1004-1014.
- Rowinsky E.K., Donehover R.C., *The clinical pharmacology of paclitaxel (Taxol[®])*. Semin. Oncol., **1993**, 20: 16.

- Sarig P., Zuzkhi Y., Monjauze A., Lusker N., Ben-Arie R., *Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to Rhizopus Stolonifer*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, **1997**, 50: 337-347.
- Sarpietro M.G., Spatafora C., Tringali C., Miceli D., Castelli F., *Interaction of resveratrol and its trimethyl and triacetyl derivatives with biomembrane models studied by differential scanning calorimetry*. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55: 3720-3728.
- Sasaki S., Horacek M., Kesteloot H., *An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality*. *Prev. Med.*, **1993**, 22:187-202.
- Schiff P.B., Fant J., Horwitz S.B., *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. *Nature*, **1979**, 277: 665-667.
- Shaw C.Y., Chen C.H., Hsu C.C., Chen C.C., Tsai Y.C., *Antioxidant properties of scopoletin isolated from Sinomonium acutum*. *Phytother Res.*, **2003**, 17: 823-825.
- Simard J.R., Pillai B.K., Hamilton J.A., *Fatty acid flip-flop in a model membrane is faster than desorption into the aqueous phase*. *Biochemistry*, **2008**, 47: 9081-9089.
- Simopoulos A.P., *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases*. *J. Am. Coll. Nutr.* **2002**, 21: 495-505.
- Singer S.J., Nicholson G.L., *Fluid mosaic model of structure of cell-membrane*. *Science*, **1972**, 175: 720-731.
- Singla A.K., Garg A., Aggarwal D., *Paclitaxel and its formulations*. *Int. J. Pharm.*, **2002**, 235: 179-192.
- Sinha V.R., Singh A., Kumar R.V., Singh S., Kumria R., Bhinge J.K., *Oral colon-specific drug delivery of protein and peptide drugs*. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **2007**, 24: 63-92.

- Smith C.C., Bennet P.M., Pearce H.M., Reynolds D.J.M., Aroson J.K., Grahame-Smith D.G., *NSAIDs and gut toxicity*. *Lancet*, **1994**, 344: 56-57.
- Soine T.O., *Naturally occurring coumarins and related physiological activities*. *J. Pharm. Sci.*, **1964**, 53: 231-264.
- Spencer C.M., Faulds D., *Paclitaxel*. *Drugs*, **1994**, 48: 794-847.
- St.Clair M.H., Furman P.A., Lubbers C.M., Elion G.B., *Inhibition of cellular alpha and virally induced deoxyribonucleic acid polymerases by triphosphate of acyclovir*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1980**, 18: 741-745.
- Stevens C.V., Meriggi A., Booten K., *Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource, and its industrial applications*. *Biomacromolecules*, **2001**, 2: 1-16.
- Sun W., Xie C., Wang H., Hu Y., *Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain*. *Biomaterials*, **2004**, 25: 3065-3071.
- Sutton D., Nasongkla N., Blanco E., Gao J., *Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery*. *Pharm. Res.*, **2007**, 24: 1029-1046.
- Szejtli J., *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. *Chem. Rev.*, **1998**, 98: 1743-1753.
- Taufel K., Steinbach K.J., *The mechanism of selective hydrolysis of inulin*. *Nahrung*, **1959**, 3: 464-488.
- Taylor K.M.G., Morris R.M., *Thermal analysis phase transition behaviour in liposomes*. *Thermochim. Acta*, **1995**, 248: 289-301.
- Tenchov B., *On the reversibility of the phase transitions in lipid-water system*. *Chem Phys. Lipids*, **1991**, 57: 165-177.

- Tocanne J.F., Teissiè J., *Ionization of phospholipids and phospholipids supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model system*. Biochim. Biophys. Acta, **1990**, 1031: 111-142.
- Tokumura T., Muraoka A., Machida Y., *Improvement of oral bioavailability of flurbiprofen from flurbiprofen/beta-cyclodextrin inclusion complex by action of cinnarizine*. Eur. J. Pharm. Biopharm., **2009**, 73: 202-204.
- Torchilin V.P., *Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives*. Pharm. Res. **2007**, 24: 1-16.
- Trissel L.A., Xu Q.A., Gilbert D.L., *Compatibility and stability of paclitaxel combined with doxorubicin hydrochloride in infusion solutions*. Ann. Pharmacother., **1998**, 32: 1013-1016.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristiani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., *Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes*. Antimicrob. Agents Chemother., **2005**, 49: 2474-2478.
- Tu J., Wang L., Yang J., Fei H., Li X., *Formulation and pharmacokinetic studies of acyclovir controlled-release capsules*. Drug Development and Industrial Pharmacy, **2001**, 27: 687-692.
- Turner L., *Supplement spotlight: Resveratrol. Vitamin Retailer™*. The Dietary Supplement Industry's Leading Magazine, **1999**.
- Van Loo J., Coussement P., De Leenheer L., Hoebregs H., Smits G., *On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **1995**, 36: 525-552.
- Van Tamelen E.E., *Bioorganic chemistry: sterols and acyclic terpene terminal epoxides*. Accounts of Chemical Research, **1968**, 1: 111-120.

- Vervoot L., Van den Mooter G., Augustijns P., Kinget R., *Inulin hydrogels. I. Dynamic and equilibrium swelling properties*. Int. J. Pharm., **1998**, 172: 127-135.
- Wang S., Ding Y., Yao Y., *Inclusion complexes of fluorofenidone with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin*. Drug Dev. Ind. Pharm., **2009**, 31: 1-6.
- Wang X., Gibson G.R., *Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine*. J. Appl. Bacteriol., **1993**, 75: 373-380.
- Weggen S., Eriksen J.L., Das P., Sagi S.A., Wang R., Pietrzik C.U., Findlay K.A., Smith T.E., Murphy M.P., Bulter T., Kang D.E., Marquez-Sterling N., Golde T.E., Koo E.H., *A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity*. Nature, **2001**, 414: 212-216.
- Weinmann I., *History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds*. In: O'Kennedy & Thornes, **1997**, 1-22.
- White S.H., *Studies of physical chemistry of planar bilayer membranes using high-precision measurements of specific capacitance*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **1977**, 303: 243-265.
- Wiernik P.H., Schwartz E.L., Einzig A., Strauman J.J., Lipton R.B., Dutcher J.P., *Phase I trials of taxol given as 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma*. J. Clin. Oncol., **1987a**, 5: 1232-1233.
- Wiley J.S., Taupin J., Janieson G.P., Snook M., Sawyer W.H., Finch L.R., *Cytosine arabinoside transport and metabolism in acute leukemias and T cell lymphoblastic lymphoma*. J. Clin. Invest., **1985**, 75: 632-642.
- Yamashima T., *A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory*. Prog. Neurobiol., **2008**, 84: 105-115.

Zakim D., *Fatty acids enter cells by simple diffusion*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **1996**, 212: 5-14.

Zhao L., Feng S.S., Go M.L., *Investigation of molecular interactions between Paclitaxel and DPPC by Langmuir Film Balance and Differential Scanning Calorimetry*. J. Pharm. Sci. **2004**, 93: 86-98.

Zimmerman A.W., Veerkamp J.K., *New insights into the structure and function of fatty acid-binding protein*. Cell Mol. Life Sci., **2002**, 59: 1096-1116.